



HAL
open science

Evaluation du métabolisme protéique comme déterminant des variations individuelles d'efficacité alimentaire chez le bovin en engraissement

Pablo Guarnido-Lopez

► **To cite this version:**

Pablo Guarnido-Lopez. Evaluation du métabolisme protéique comme déterminant des variations individuelles d'efficacité alimentaire chez le bovin en engraissement. Science des productions animales. Université Clermont Auvergne, 2022. Français. NNT : 2022UCFAC007 . tel-03859767

HAL Id: tel-03859767

<https://theses.hal.science/tel-03859767v1>

Submitted on 18 Nov 2022

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.



École doctorale Sciences de la Vie, Santé, Agronomie, Environnement

Laboratoire : INRAE, UMR 1213 Herbivores, Saint Genès Champanelle, France

Présentée à l'Université Clermont Auvergne à **Clermont-Ferrand** pour l'obtention du grade de Docteur d'université, discipline : Physiologie et nutrition animale

Soutenue publiquement le **25/02/2022**

Guarnido-Lopez Pablo

Evaluation du métabolisme protéique comme déterminant des variations individuelles d'efficacité alimentaire chez le bovin en engraissement

Membres du jury de thèse

Président :

LOBACCARO Jean-Marc, Professeur, Université Clermont Auvergne, CNRS 6293, France.

Rapporteurs :

LAPIERRE Hélène, Professeur, Agriculture et Agri-Food Canada, J1M 0C8, Canada

LE FLOC'H Nathalie, Directrice de recherche, INRAE, UMR 1348 PEGASE, 35590, France.

Examineurs :

CANTALAPIEDRA-HIJAR Gonzalo, Chargé de recherche, **Co-encadrant**, INRAE, UMR 1213 Herbivores, France

LABUSSIÈRE Etienne, Chargé de recherche, INRAE, UMR 1348 PEGASE, 35590, France.

LERCH Sylvain, Chercheur associé, Ruminant Research Unit, AGROSCOPE, 1725, Suisse.

GILBERT Hélène, Directrice de recherche, INRAE, UMR1388 GenPhySE, 31326, France.

ORTIGUES-MARTY Isabelle, Directeur de Recherche, **Directrice de thèse**, INRAE, UMR 1213 Herbivores, France.

Résumé en Français

Le turnover protéique correspond au taux de synthèse et de dégradation protéique ne donnant pas lieu à un changement de masse protéique mais servant à renouveler les protéines corporelles, ce qui est vital pour l'entretien et la survie des animaux. Néanmoins, ce mécanisme impacte fortement les dépenses énergétiques de l'animal ainsi que l'utilisation métabolique de l'azote. Le turnover protéique a été suggéré comme étant un déterminant majeur des variations inter-individuelles de l'efficacité alimentaire (EA) chez le ruminant. Les animaux de rente les plus efficaces seront ceux qui adoptent une stratégie conduisant à un faible turnover protéique mais probablement en détriment de leur robustesse. Le travail de thèse vise à i) évaluer à l'échelle individuelle le lien existant entre le taux de transfert de l'azote alimentaire dans le gain [efficacité d'utilisation de l'azote (EUA): N retenu/N ingéré] et le classement des animaux selon différents indices d'EA, ii) étudier l'effet du classement de l'ingéré résiduel (IR) des animaux sur le métabolisme et le turnover protéique, la composition corporelle et les dépenses énergétiques et iii) analyser les mécanismes moléculaires mis en jeu dans les différences de turnover protéique observées. Cette étude a été réalisée chez des taurillons Charolais alimentés avec deux régimes d'engraissement contrastés (riche en amidon vs riche en fibre) au cours de deux études différentes. Dans la première, l'EUA a été évaluée à travers un biomarqueur plasmatique ($\delta^{15}\text{N}$) sur 600 jeunes bovins. Dans la deuxième étude l'IR a été évalué sur 100 jeunes bovins phénotypés avec les deux mêmes régimes contrastés après un premier test d'EA. Les 32 animaux les plus extrêmes (8 efficaces vs 8 inefficaces par régime) ont été sélectionnés pour réaliser des mesures de turnover protéique avec des méthodes de référence (excrétion urinaire de 3-méthyl-histidine) ou indirectes (turnover isotopique). La rétention d'azote a été mesurée chez les animaux extrêmes à partir des résultats de bilan d'azote réalisé en stalle de digestibilité (10 j) et à partir de la composition corporelle déterminée au début du test d'EA et à l'abattage. La dépense énergétique a été estimée d'après la consommation d'oxygène mesurée par Greenfeed® sur les animaux extrêmes. Enfin les tissus musculaires et hépatiques prélevés à l'abattoir ont été analysés par western-blot et analyses enzymatiques afin d'évaluer les voies moléculaires impliquées dans la synthèse et la dégradation protéique. Avec l'utilisation du $\delta^{15}\text{N}$ plasmatique, une corrélation négative a été démontrée entre l'EUA et les valeurs d'IR quel que soit le régime utilisé. Les animaux les moins efficaces selon l'IR semblent plus gaspiller l'azote alimentaire que les animaux les plus efficaces quel que soit le régime alimentaire utilisé. Ce lien a été ensuite confirmé avec un sous-dispositif d'animaux extrêmes sur l'IR lorsque la rétention azotée a été estimée à partir des données de composition corporelle, mais pas en revanche à partir du bilan d'azote. La plus grande EUA des animaux efficaces a été accompagnée d'une dépense énergétique plus faible, d'une taille du rumen plus petite et d'un rendement carcasse plus élevé avec une forte proportion de muscle dans la carcasse. Cependant, des tendances numériques observées avec les deux dispositifs expérimentaux suggèrent une plus forte relation entre l'EUA et l'IR chez des animaux nourris avec un régime riche en amidon comparé à un régime riche en fibre. Le turnover protéique pourrait être à l'origine de cette relation régime-dépendant entre l'IR et l'EUA. Ainsi, les animaux efficaces selon l'IR ont présenté un turnover protéique plus faible, en termes de dégradation protéique du muscle squelettique, que les animaux inefficaces mais seulement avec le régime riche en amidon. Une absorption de nutriments glucogéniques contrastée, mais aussi probablement plus rapide, entre les deux régimes semble être responsable d'une réponse insulinaire très différente, signal clé de l'état d'activation des voies moléculaires de la synthèse et dégradation protéique. Les résultats de cette thèse confirment l'hypothèse d'un métabolisme protéique ralenti mais plus efficace chez les animaux efficaces quant à leur ingéré résiduel lorsque les animaux sont alimentés avec des régimes riches en amidon.

Mots-clés : Efficacité alimentaire ; Variabilité individuelle ; Turnover protéique ; Bovin viande

Abstract in English

Protein turnover is the rate of protein synthesis and degradation that does not result in a change in protein mass but serves to renew body proteins, which is vital for the maintenance and survival of animals. Nevertheless, this mechanism strongly impacts the energy expenditure of the animal as well as the metabolic use of nitrogen. Protein turnover has been suggested as a major determinant of inter-individual variation in feed efficiency (FE) in ruminants. The most efficient livestock will be those that adopt a strategy leading to low protein turnover but probably at the expense of their robustness. The aim of this study is to i) evaluate at the individual level the link between the rate of transfer of dietary N into gain [N use efficiency (NUE): retained N/intake N] and the ranking of animals according to different indices of FE, ii) study the effect of the ranking of residual feed intake (RFI) of animals on metabolism and protein turnover, body composition and energy expenditure and iii) analyze the molecular mechanisms involved in the observed differences in protein turnover. This study was carried out in Charolais bulls fed two contrasting fattening diets (high starch vs. high fiber) in two different studies. In the first study, protein efficiency was assessed through a plasma biomarker ($\delta^{15}\text{N}$) in 600 young cattle. In the second study FE was evaluated on 100 young cattle phenotyped with the same two contrasting diets after an initial FE test. The 32 most extreme animals (8 efficient vs 8 inefficient per diet) were selected to measure protein turnover using reference (urinary 3-methyl-histidine excretion) or indirect (isotope turnover) methods. Nitrogen retention was determined in extreme animals from nitrogen balance data performed in digestibility stall (10 d) and from body composition determined at the beginning of the EA test and at slaughter. The energy expenditure was estimated from the oxygen consumption measured by Greenfeed® on the extreme animals. Finally, muscle and liver tissues collected at slaughter were analyzed by western-blot and enzymatic analyses to evaluate the molecular pathways involved in protein synthesis and degradation. With the use of plasma $\delta^{15}\text{N}$, a negative correlation was demonstrated between NUE and RFI values regardless of the diet used. The least efficient animals by RFI appeared to waste more dietary N than the most efficient animals regardless of diet used. This link was then confirmed with a sub-set of extreme animals on RFI when nitrogen retention was estimated from body composition data, but not from nitrogen balance. The improved NUE of efficient animals was accompanied by lower energy expenditure, smaller rumen size and higher carcass yield with a higher proportion of muscle in the carcass. However, numerical trends observed with both experimental set-ups suggest a stronger relationship between NUE and RFI in animals fed a high starch diet compared to a high fiber diet. Protein turnover could be at the origin of this diet-dependent relationship between RFI and NUE. Thus, the RFI-efficient animals showed a lower protein turnover, in terms of skeletal muscle protein breakdown, than the inefficient animals but only on the high starch diet. A contrasted, but probably also faster, absorption of glucogenic nutrients between the two diets seems to be responsible for a very different insulin response, a key signal of the activation state of the molecular pathways of protein synthesis and degradation. The results of this thesis support the hypothesis that protein metabolism is slowed down but more efficient in animals that are efficient in their residual feed intake when fed starch-rich diets.

Key words: Feed efficiency; Individual variability; Protein turnover; Beef cattle

Liste des abréviations

AAs : Acides aminés

ACP : Analyse en composantes principales

AGV : Acide gras volatil

Anova : Analyse de variance

CV : Coefficient de variation

dMO : Digestibilité apparente de la matière organique

EA : Efficience alimentaire

EUA : Efficience d'utilisation de l'azote

EM : Energie métabolisable

EN : Energie nette

GR : Gain résiduel

GLM : Modèle linéaire généralisé

GMQ : Gain moyen quotidien

IR : Ingéré résiduel

JB : Jeune bovin

MAT : Matières azotées totales

MOF : Matière organique fermentescible dans le rumen

MSI : Matière sèche ingérée

NDF : Neutral detergent fiber (Fibre neutre détergent)

PDI : Protéines digestibles dans l'intestine grêle

PDIA : Protéine digestible dans l'intestine grêle d'origine alimentaire

PDIM : Protéine digestible dans l'intestine grêle d'origine microbienne

PV : Poids vif

RMSE : Residual mean square error (Erreur standard résiduelle moyenne)

UEB : Unité d'encombrement bovin

UF : Unité fourragère

UFV : Unité fourragère viande



Esta tesis está dedicada a mi familia por su gran apoyo y en concreto a *mi Padre*, que es quien me inspiro con su propio ejemplo a querer ser siempre el mejor y que con esfuerzo todo puede lograrse, los mejores ídolos lo son sin pretenderlo, y tú eres uno de los míos,

Te quiero Papa

Remerciements

Ce travail a été réalisé à l'Unité Mixte de Recherches sur les Herbivores au sein de **l'équipe DINAMIC à INRAE de Clermont-Ferrand-Theix**.

Je remercie en premier lieu mes encadrants **Isabelle Ortigues-Marty** et **Gonzalo Cantalapiedra-Hijar** pour avoir encadré et dirigé ce travail de thèse avec autant d'implication et d'efforts. Je remercie également le département Phase d'INRAE ainsi qu'APISGENE pour le financement de thèse dont j'ai bénéficié et l'extension accordée en raison du COVID-19.

Je remercie les membres du jury : **Sylvain Lerch**, **Etienne Labussiere**, **Hélène Gilbert** et **Jean-Marc Lobaccaro** pour avoir accepté d'évaluer ce travail et tout particulièrement **Hélène Lapierre** et **Nathalie Le Floc'h** pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ma thèse.

A l'ensemble des membres de mon comité de thèse : **Sophie Tesseraud**, **Hélène Fouillet**, **Didier Rémond**, **Pauline Martin** et **Carine Capel**, sincères remerciements pour votre implication, compréhension et conseils.

Egalement, je remercie toutes les personnes qui ont collaboré à ce projet de thèse :

- le **personnel d'Herbipôle** : **Bernard Sepchat**, **Dominique Chassaignes**, **Etienne Astier** et **Sébastien Alcouffe** pour avoir travaillé main à la main avec nous dans la manip et spécialement **Pascal Faure**, qu'aujourd'hui je considère comme un vrai ami,
- le personnel du laboratoire : **Céline Chantelauze**, **Lorène Salis**, **Marine Gauthier** et **Arnaud Delavaud** pour votre rapidité et précision dans le travail et aussi votre implication dans la manip,
- les voisins de la partie digestive : **Pierre Nozière**, **Cécile Martin**, **Yvonne Rochette**, **Donato Andueza** et **Fabienne Picard**, merci de toute votre implication et aussi pour votre aide dans mon travail,
- l'équipe IMPROVE de l'UNH avec **Sergio Polakof** pour la collaboration et la participation à ce travail de thèse et **Jérémie David** pour ta professionnalité et pour avoir rendu les heures de laboratoire beaucoup plus joyeuses et amusantes, merci,
- l'Unité GABI du département Génétique Animale : **Sébastien Taussat** et **Gilles Renand**, pour votre collaboration pour la première partie de cette thèse et pour autant d'échanges constructifs et intéressants,
- le reste de **l'équipe DINAMIC** pour toute votre aide pendant ces années de thèse, merci pour tout, pour votre accueil chaleureux, tous les bons moments passés autour du café ou de nos fameux petits déjeuners d'équipe.

- **l'équipe BIOMARQUEURS** et spécialement à **Isabelle Cassar-Malek** pour l'aide et la collaboration tant au projet de thèse qu'à moi personnellement.

Je me rappelle toujours du jour que j'ai reçu le mail de Gonzalo en disant : Pablo, j'ai une thèse qui commence en décembre, dis-moi si ça t'intéresse... Comme vétérinaire qui travaillait en nutrition avec le système Inra cette proposition était un vrai honneur pour moi. Je l'ai dit plusieurs fois, j'admire beaucoup mes encadrants comme chercheurs et pour moi c'est un vrai plaisir les avoir eu comme encadrants. Je suis une personne très passionnée et proactive avec une tendance à me disperser, je sens que j'ai beaucoup évolué depuis que je suis arrivé et c'est grâce à vous deux qui m'avez converti dans le chercheur que je suis aujourd'hui, donc, encore merci pour tout.

A **Isabelle** : pour ta rigueur scientifique et manière de faire, tu as vraiment façonné mon esprit scientifique et m'as encouragé dans les moments difficiles.

A **Gonzalo** : mon grand maître pendant ces trois années de thèse, c'est incroyable tout ce que j'ai appris avec toi, je te remercie particulièrement de ton dynamisme et ta disponibilité à toute épreuve durant ces 3 années ce qui m'a permis de conduire ce projet dans des conditions scientifiques exceptionnelles, merci vraiment d'avoir autant contribué à me convertir en chercheur.

Maintenant il faut que je continue ma carrière sans mes encadrants, il ne sera pas facile car je suis déjà habitué à votre soutien scientifique, mais la suite ne peut pas être avec une meilleure personne, **Mohammed Benaouda**. Mohammed, mon ami, tu es un des premières personnes que j'ai connues ici à l'INRA, encore merci de tous tes cours particuliers en statistique et pour tout ce que tu m'as appris. Il me semble quasiment philosophique d'avoir commencé ma thèse à côté de toi alors que nous étions tous les deux à l'INRA de façon temporaire et de commencer ma carrière comme scientifique aussi à côté de toi. Merci amigo pour tout et spécialement pour ton soutien, c'est un vrai plaisir t'avoir ici en France, on va faire de grandes choses ensemble.

I would like to thank **Luis Tedeschi**, from TAMU, for your support and help in writing my first proposal, you really motivated me and I really hope to be part of your team next year.

Merci aussi aux thésards de mon équipe ou des autres équipes : **Pauline, Lucille, Ezequiel, Chloé, Mélia, Dulce, Laura, Solveig, Louise Fourteau, Agathe, Lucie, Abdel, Moïse** et **Nathalia** pour avoir rendu mes soirées beaucoup plus amusantes.

Por el lado personal, me gustaría agradecer a mi familia, que no me ha podido apoyar más y mejor. Esta tesis se la dedico a mi padre enteramente así que hablaré de **mi hermano** y de **mi madre**, esa mujer que para mí representa el verdadero significado del amor incondicional. Gracias omá por

todo tu cariño y tu apoyo eres la mejor madre del mundo. Pedro, te lo he dicho mil veces, si no fueses mi

hermano seríamos amigos, estoy orgulloso de ti, gracias por ser como eres, te quiero. Al resto de la familia, a los **Cordones** y a los **Guarnidos**, gracias por hacerme mis vacaciones las mejores del mundo!!

Je continue avec mes deux personnes favorites de toute la France, **Bertrand Deroche**, mon ami, merci pour toutes ces années de discussions, rires, blagues et auto-connaissance, tu es une grande personne, merci pour tout ton soutien et amitié, vraiment. **Louise Bacher**, ma petite Louise, on a commencé la thèse quasiment au même moment, on a vécu mille histoires, merci d'être la première personne qui m'a montré la culture française hors de l'INRA et pour tout ce qu'on a vécu ensemble, aujourd'hui je te considère comme ma meilleure amie de France.

Al pive **Martin**, ché un plaser haber compartido despacho y asados con vos, sos re-piola, espero verte en Australia pronto hermano, mil gracias por haberme alegrado las mañanas de curro!

Je veux aussi remercier spécialement mon amie **Rahma**, je te l'ai dit plusieurs fois, tu es comme une lumière de bonheur et de sourire, merci d'être comme tu es ! C'est magnifique de pouvoir travailler avec des gens comme toi. سأحتفظ بذكرى رائعة عنك ، شكراً جزيلاً لك على كل شيء. wallah !

A mi familia francesa, que difícil es salir de casa y encontrar una verdadera familia como la que considero que tengo con vosotros, **Ceci, Solene, Rai, Estrella** y especialmente a mis dos hermanos **Ernesto y Juanan**. Chavales, no sois conscientes de lo mucho que me habéis alegrado estos tres años de tesis, tenéis una casa a donde quiera que yo esté, mil gracias con todo mi corazón y un poco menos de gracias de parte de mi hígado.

Au reste des amis de Clermont, **Ylias, les deux Amines, Carlitos, Mihail**, et **Lucia**, vous êtes les meilleurs ! Merci d'avoir formé le groupe d'amis que je vais garder pour toujours, on se voit n'importe où.

Gracias a mi **Guille**, mi alma gemela, gracias por haber estado ahí en todos esos momentos hermano, de verdad que es un placer tenerte en mi vida, por muchos años más de fraternidad y de seguir evolucionando, eres lo mejor que saqué de aquella carrera que llaman veterinaria, donde también conocí a mis dos grandes soles, mis chicas y mis amores **Nerea y Sara**. A mis grandes amigos de Málaga, **Natan, Segura, Márquez, Miguelon, Tony, Rocío y Anilo**, con una mención especial a **Marcos**, mi mejor amigo, gracias por toooodos esos momentos de diversión, risas y disfrute, os quiero chavales, sois un regalo. A **Laurita**, estuviste en el final de mi carrera y ahora estas en el final de mi doctorado, espero que estés en el final de muchos otros proyectos, gracias por todo lo que me das.

Tanto a mi familia de sangre como a mis amigos, la familia que he elegido, mil gracias por todo este apoyo durante estos años, sin vosotros no habría sido posible, os quiero.

Plan de la thèse

Plan de la thèse	9
Liste des figures	11
Liste des tableaux.....	13
Liste des publications.....	14
Introduction	16
Un contexte global qui incite à une meilleure utilisation des ressources alimentaires	17
Particularités du système bovin viande en France	19
L'efficacité alimentaire chez les bovins viande	21
Phénotypage de l'efficacité alimentaire chez le bovin viande	22
Indices basés sur des ratios : Index de consommation ou rapport du gain sur l'ingéré.....	22
Indices basés sur les valeurs résiduelles : l'ingéré résiduel et le gain résiduel.....	23
La sélection génétique par l'efficacité alimentaire chez le bovin viande.....	25
Héritabilité et répétabilité de l'efficacité alimentaire chez le bovin	25
Variabilité individuelle et potentiel de sélection.....	27
Conséquences de la sélection génétique pour l'efficacité alimentaire.....	29
Mécanismes physiologiques associés à la variabilité individuelle de l'efficacité alimentaire.....	31
Mécanismes biologiques mineurs contribuant aux variations d'efficacité alimentaire	32
Mécanismes biologiques majeurs contribuant aux variations d'efficacité alimentaire.....	33
Objectif de la thèse	36
Etude bibliographique du métabolisme protéique et association avec l'efficacité alimentaire ...	37
Devenir des matières azotées dans le rumen	37
Digestibilité et absorption intestinale des matières azotées.....	39
Métabolisme hépatique des composés azotés.....	41
Métabolisme protéique des tissus périphériques	43
Métabolisme azoté intracellulaire : synthèse et dégradation protéique	45
Facteurs de régulation de la synthèse et de la dégradation protéique	47
Turnover protéique.....	49
Les nutriments ingérés comme facteur de régulation du turnover protéique.....	51
La composition corporelle comme facteur de régulation du turnover protéique.....	54
Lien entre le métabolisme protéique et la variabilité individuelle de l'efficacité alimentaire	56
Utilisation de l'azote au niveau digestif associée aux variations individuelles de l'efficacité alimentaire	56
Utilisation métabolique de l'azote en lien avec les variations individuelles de l'efficacité alimentaire	58
Stratégie et démarche scientifique de la thèse	61
Résultats et travaux de la thèse	65
Premier article de la thèse	66

Deuxième article de la thèse	107
Complément : Une approche biomoléculaire pour étudier le métabolisme protéique.	153
Discussion générale	154
Relation entre l'ingéré résiduel et l'efficacité d'utilisation de l'azote chez le bovin viande	157
Contribution de l'effet régime à la relation entre l'efficacité alimentaire et l'efficacité d'utilisation de l'azote	163
Le turnover protéique est-il associé au classement IR des animaux ?	166
Quels mécanismes pourraient expliquer une relation régime-dépendante entre le turnover protéique et l'IR chez le bovin à viande ?	171
Influence du turnover protéique sur l'EA chez le bovin viande	173
Conclusions et perspectives	176
Références bibliographiques	179
Annexes	204
Annexe 1 : Une approche intra-cellulaire pour étudier le métabolisme protéique.....	204
Annexe 2 : Poster présenté au congrès 3R 2020.	217
Annexe 3 : Poster présenté au congrès EAAP 2021	218
Annexe 4 : Résumé de la thèse présentée aux journées de l'école doctorale 2020.....	219
Annexe 5 : Relations entre l'ensemble des variables analysés dans cette thèse	220

Liste des figures

Introduction

Figure 1 : Consommation de viande moyenne (kg) par personne per an en 2018	17
Figure 2 : Production et consommation de viande bovine en France pour l'année 2019	19
Figure 3 : Performances des jeunes bovins viande en France par période d'âge et distribution des différents ingrédients alimentaires du régime par kilo de matière sèche.	20
Figure 4 : Définition et calcul des indices de consommation (IC) et du rapport du gain sur l'ingéré (RGI), en l'anglais FCR et FCE, respectivement	22
Figure 5 : Régression entre la matière sèche ingérée (MSI) observée et la MSI prédite pour le calcul de l'ingéré résiduel (IR).	23
Figure 6 : Relation entre la matière sèche ingérée (MSI) observée et la MSI théorique dans un modèle d'IR.	24
Figure 7 : Contribution des déterminants de l'efficacité alimentaire chez le bovin viande	31
Etude bibliographique	
Figure 8 : Principales flux d'azote dans le rumen.	39
Figure 9 : Principales réactions enzymatiques du métabolisme protéique dans le foie	42
Figure 10 : Principaux flux de protéine et acides aminés arrivant au foie, devenir hépatique, transport dans le plasma et métabolisme dans les tissus périphériques.	43
Figure 11 : Principales voies d'entrée des acides aminés dans le pool intracellulaire.	45
Figure 12 : Mécanismes en jeu lors de la synthèse et de la dégradation protéique à l'intérieur de la cellule.	46
Figure 13 : Interaction entre la synthèse et dégradation protéique par rapport à la concentration des acides aminés dans le pool intracellulaire.	48
Figure 14 : Schéma graphique des flux d'azote du turnover protéique dans le bovin viande.	49
Figure 15 : Schéma illustrant la quantité des protéines synthétisées et dégradées par rapport aux protéines ingérées et retenues chez un bovin en engraissement	50

Figure 16 : Dépôt de protéine en fonction de l'apport de protéine journalier	52
Figure 17 : Représentation de la contribution de la synthèse protéique, masse protéique totale et dépense énergétique des organes et tissus corporelles chez le bovin.	54
Figure 18 : Relation entre l'efficacité de synthèse protéique par rapport à l'énergie fermentescible et la protéine dégradable du rumen	57
Figure 19 : Comparaison de deux animaux ayant la même quantité de protéine retenue mais avec un taux de renouvellement protéique différent.	58
Discussion générale de la thèse	
Figure 20 : Relations entre l'IR et l'EUA déterminée d'après l'abondance naturelle de l'azote 15 et la concentration d'urée dans le plasma dans le dispositif à grande échelle.	158
Figure 21 : Relation entre l'IR et l'EUA mesurée avec le biomarqueur $\delta^{15}\text{N}$ par régime lorsque cette relation a été établie avec des données qui représentent la variabilité individuelle du $\delta^{15}\text{N}$	163
Figure 22 : Efficacité d'utilisation de l'azote mesurée dans le dispositif analytique à partir du bilan d'azote et estimée d'après le biomarqueur isotopique du $\delta^{15}\text{N}$	164
Figure 23 : Synthèse protéique intra-cellulaire mesurée sur les animaux extrêmes selon l'IR et alimentés à base d'un concentré fibreux ou d'un concentré riche en amidon.	169
Figure 24 : Schéma conceptuel présentant mes hypothèses sur le lien entre le métabolisme protéique (EUA) et l'IR avec le turnover protéique comme déterminant majeur de cette relation.	173
Annexes	
Figure 25, dans l'annexe 5 : Analyse en composantes principales des variables analysées dans cette thèse pour évaluer la relation entre l'IR et le métabolisme protéique chez le bovin viande.	220

Liste des tableaux

Introduction

Tableau 1 : Corrélations génétiques moyennes entre les indices d'efficacité alimentaire et les variables productives 26

Tableau 2 : Coefficient de variation des principaux caractères productifs dans l'élevage de différentes espèces. 28

Etude bibliographique

Table 3 : Flux des AAs essentiels (g/j) dans les différentes parties de l'intestin grêle chez les vaches laitières 41

Tableau 4 : Profil en acides aminés du muscle squelettique chez le bovin viande 44

Tableau 5 : Régulation de la synthèse ou dégradation protéique par l'apport d'énergie ou protéine. 51

Tableau 6 : Régulation hormonale de la synthèse et dégradation protéique 52

Tableau 7 : Synthèse des travaux de littérature ayant évalué la relation entre le turnover protéique et l'ingéré résiduel chez le bovin viande. 59

Discussion générale de la thèse

Tableau 8 : Synthèse des travaux publiés et de nos résultats sur l'EUA du bovin viande déterminé par bilan d'azote en stalle de digestibilité 157

Tableau 9 : Résumé des différentes approches d'étude de l'EUA dans cette thèse 159

Tableau 10 : Turnover protéique évalué avec deux approches différentes chez des jeunes bovins en engraissement qui diffèrent sur leur efficacité alimentaire mesurée selon deux critères 167

Liste des publications

Articles scientifiques principales de la thèse

Guarnido-Lopez, P., Ortigues-Marty, I., Taussat, S., Fossaert, C., Renand, G., Cantalapiedra-Hijar, G. (2021). Plasma proteins $\delta^{15}\text{N}$ vs plasma urea as candidate biomarkers of between-animal variations of feed efficiency in beef cattle: Phenotypic and genetic evaluation. *Animal*, 15(8), 100318.

Guarnido-Lopez, P., Isabelle Ortigues-Marty, Lorène Salis, Céline Chantelauze, Agathe Bes, Pierre Nozière, Gonzalo Cantalapiedra-Hijar. Protein metabolism, body composition and oxygen consumption in extreme residual feed intake young bulls fed two contrasted diets (En revision modérée au journal *Animal*).

Guarnido-Lopez, P., Isabelle Ortigues-Marty, Jeremie David, Sergio Polakof, Gonzalo Cantalapiedra-Hijar. Protein metabolism at intra-cellular level could explain efficiency in bulls selected by residual feed intake fed two contrasting diets (En préparation).

Autres articles scientifiques

Cantalapiedra-Hijar, G., **Guarnido-Lopez, P.**, Schiphorst, A. M., Robins, R. J., Renand, G., & Ortigues-Marty, I. (2020). Natural ^{15}N abundance in specific amino acids indicates associations between transamination rates and residual feed intake in beef cattle. *Journal of Animal Science*, 98(6), skaa171.

Bes, P. Nozière, G. Renand, Y. Rochette, P. **Guarnido-Lopez**, G. Cantalapiedra-Hijar, C. Martin. Individual relationships between gas flows (methane, carbon dioxide, dihydrogen, oxygen) and feed efficiency in growing bulls are similar across two contrasted diets. (Soumis au journal *Animal* le 12/11/2021).

Communications orales à des congrès

Guarnido-Lopez, P., Nasrollahi¹, C. Chantelauze, G. Renand, C. Fossaert, I. Ortigues-Marty, G. Cantalapedra-Hijar. Plasma natural 15N abundance may predict both feed conversion efficiency and residual feed intake in beef cattle across different dietary conditions. Présenté à l'ISEP 2019 en Belo Horizonte, Brasil.

Gonzalo Cantalapedra-Hijar, Pablo **Guarnido-Lopez**, Sébastien Taussat, Gilles Renand, Isabelle Ortigues Marty. Plasma biomarkers of feed efficiency differ across two contrasting diets in growing beef cattle. Présenté à l'EAAP à Porto, Portugal.

Guarnido Lopez. P., Ortigues Marty. I, Faure. P, Chantelauze. C, Cantalapedra-Hijar. G. Efficient RFI bulls presented lower fractional synthesis rates of plasma proteins when fed corn but not grass based diets. Présenté à l'ASAS 2021 en Louisville, Etats Unis.

Guarnido Lopez. P., Ortigues Marty. I, Cantalapedra-Hijar. G. Nitrogen use efficiency is proportionally more improved when young bulls are ranked on residual body gain rather than on residual feed intake. Présenté à l'ASAS 2021 en Louisville, Etats Unis.

Communications affichées à des congrès

Guarnido-Lopez. P., Ortigues Marty. I, Cantalapedra-Hijar. G. Comparaison entre deux méthodes différentes (expérimentales courtes/directes vs longues/indirectes), du bilan d'azote chez bovines viande extrêmes selon RFI et RG avec deux régimes contrastés. Présenté comme poster au congrès 3R 2020 à Paris, France. Annexe 2.

Guarnido-Lopez P., Chantelauze C., Ortigues-Marty I., Cantalapedra-Hijar G. Whole-body protein turnover rates are positively related to individual variation of feed conversion efficiency in growing cattle regardless the diet. Présenté comme poster au congrès EAAP 2021 à Davos, Suisse. Annexe 3.

Bes, P. Nozière, Y. Rochette, P. Faure, G. Cantalapedra-Hijar, P. **Guarnido-Lopez**, G. Renand, C. Martin. Enteric methane emissions are positively associated to RFI in growing beef cattle. Présenté comme poster au congrès EAAP 2021 à Davos, Suisse.

Introduction

Un contexte global qui incite à une meilleure utilisation des ressources alimentaires

La population mondiale augmente : les estimations prévoient 9,7 milliards de personnes sur la planète d'ici à 2050, au lieu de 7,8 milliards actuellement (De Wrachien et al., 2021). Cette augmentation est principalement due aux pays en voie de développement, qui ont un taux de natalité très élevé (ex : l'Afrique et l'Asie du Sud-Ouest) qui compense la baisse du taux de natalité des pays développés (ex. l'Europe, l'Amérique et Japon). Le problème de cette croissance démographique inégale est que certains des pays à croissance de population rapide n'auront pas les niveaux de production adéquats pour couvrir les besoins alimentaires accrus d'ici à 2050 (FAOSTAT, 2011). C'est la raison pour laquelle la demande en produits animaux augmente considérablement, notamment dans les pays en développement, où la consommation de viande en général est proportionnellement moins importante que dans des pays développés (Sans et Combris, 2015). En réalité, la consommation de viande bovine varie beaucoup entre pays et ne suit pas les différences entre pays de densité de population de bovins (Figure 1). Les pays développés comme les États-Unis ou l'Europe consomment 110 et 80 kg / habitant / an, respectivement, tandis que les pays comme l'Afrique ne consomment que 10 kg / habitant / an (Carriquiry et al., 2010).

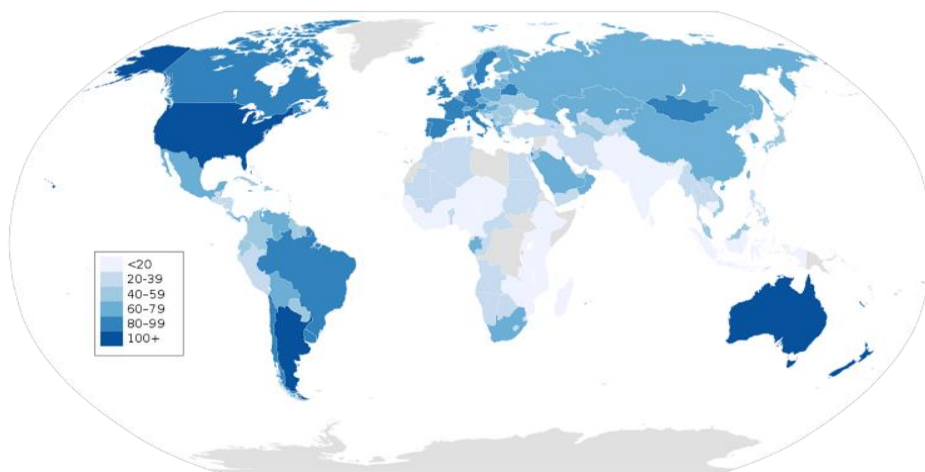


Figure 1 : Consommation de viande moyenne (kg) par personne par an en 2018.
Source : <http://livestock.geo-wiki.org/graphics/>

Pour répondre à l'accroissement de la demande de viande en général et bovine en particulier, la production bovine mondiale a augmenté significativement depuis la dernière décennie (Hocquette et al., 2018) dans un contexte de surface agricole limitée ce qui a conduit à une intensification des productions animales (Simpson et Conrad, 1993). Dans le cas de l'Europe, où l'intensification est aussi due à l'augmentation des prix de production, le nombre d'exploitations a diminué de 3%, tandis que la superficie agricole n'a augmenté que de 0,33% (Agreste et Puccio, 2011). Cette augmentation de l'intensification des productions animales a trois conséquences principales :

1. Une réduction considérable de la surface de pâturage, ce qui oblige les éleveurs à acheter des concentrés pour satisfaire les besoins alimentaires des animaux. Les concentrés sont plus coûteux.

teux que les fourrages, surtout avec l'augmentation continue du prix des céréales, ce qui impacte fortement la rentabilité économique des agriculteurs (Veysset et al., 2019).

2. L'augmentation de l'utilisation des concentrés pour les animaux a provoqué une compétition entre l'alimentation animale et l'alimentation humaine pour les ressources (ex. : blé, maïs, soja) (Mottet et al., 2017).
3. Une forte augmentation des rejets animaux tels que les gaz à effet de serre (méthane), et l'azote vers l'environnement (Gerber et al., 2013).

Du point de vue environnemental, économique et sociétal, la situation démographique représentera un défi pour les productions animales dans les années à venir. Ainsi l'efficacité des productions animales doit augmenter pour satisfaire l'accroissement de la demande tout en respectant la durabilité des productions (Makkar et Beever, 2012). Dans le dernier rapport FAO de 2012 (Makkar et Beever, 2012), les principales consignes pour affronter la situation actuelle étaient d'utiliser l'efficacité alimentaire (EA) comme critère de sélection sur les animaux de rente et prioriser les régimes fourragers pour les ruminants. Pour ceux-ci, le type de régime est très dépendant du type de système productif, intensif ou extensif qui diffère par la quantité et la concentration des déchets excrétés par les animaux et par la quantité et proportion des achats de l'extérieur (Laisse et al., 2019). Dans les systèmes extensifs les excréments servent à fertiliser le sol et contribuent aux cycles du carbone et de l'azote tandis que dans les systèmes intensifs ces ressources s'accumulent en empêchant son entrée dans leur cycle respectif (Steinfeld et Wassenaar, 2007). Des systèmes alternatifs de production animale en lien avec l'économie circulaire ont aussi été proposés. Ils reposent sur une utilisation moindre des concentrés à base des graines de céréales dans l'alimentation animale, une meilleure utilisation des ressources naturelles (pâturage, fourrages et coproduits de l'industrie alimentaire) et une réutilisation des déchets d'élevage pour favoriser le retour des matières organiques au sol (OCDE-FAO, 2017). Cependant, la productivité de ces systèmes a tendance à être faible, et certains pays développés, tels que la Nouvelle-Zélande, ont proposé comme faisant partie de l'économie circulaire des systèmes de pâturage plus intensifs qui permettent d'augmenter la production de viande bovine de 17% et celle d'agneau de 17% (Lesschen et al., 2011). Sur le terrain, les nouveaux courants de production sont basés sur une intensification durable, qui allie l'intensification des productions et le respect de l'environnement (Smith et al., 2012).

Les consignes de la Commission Européenne pour le futur des productions animales en Europe ont été résumées par Peyraud et MacLeod (2020) qui défendent le point de vue que l'élevage, et en particulier l'élevage de ruminants, peut être partie de la solution et non du problème grâce à des changements dans l'alimentation animale, avec une augmentation de la part des ressources fourragères et :

- Un changement de conduites d'élevage avec des systèmes intensifs plus durables,
- Une augmentation de la santé et du bien-être animal,
- Une augmentation de l'efficacité alimentaire.

Particularités du système bovin viande en France

Les pratiques agricoles varient énormément en fonction de la zone géographique et des conditions météorologiques, ce qui peut expliquer la grande variété de systèmes d'élevage existant en Europe et en France. On peut souligner les systèmes les plus importants (Institut de l'élevage, 2018) :

Système herbager naisseur. C'est un système où l'éleveur s'occupe seulement des vaches allaitantes et des males reproducteurs. Dans ce système, extensif l'alimentation est à base de pâturage où les animaux peuvent être supplémentés certaines époques de l'année en fonction de la météorologie. Les veaux nés de ces vaches sont nourris à base de lait et pâture de l'herbe. Une fois sevrés, ils sont vendus pour être engraisés ailleurs de manière intensive.

Système naisseur engraisseur semi-extensif. Ce système c'est similaire au précédent, mais les veaux sevrés sont engraisés dans l'exploitation avec des régimes concentrés et un accès éventuel au pâturage.

Système engraisseur. Dans ce système les veaux, normalement sevrés, sont nourris à base de régimes énergétiques jusqu'au poids commercial d'abattage.

Ces systèmes, classés de plus à moins extensifs, se différencient principalement par l'alimentation utilisée avec une part plus ou moins importante de concentrés, céréales ou produits achetés à l'extérieur, et de produits issus de l'exploitation comme le foin ou le pâturage.

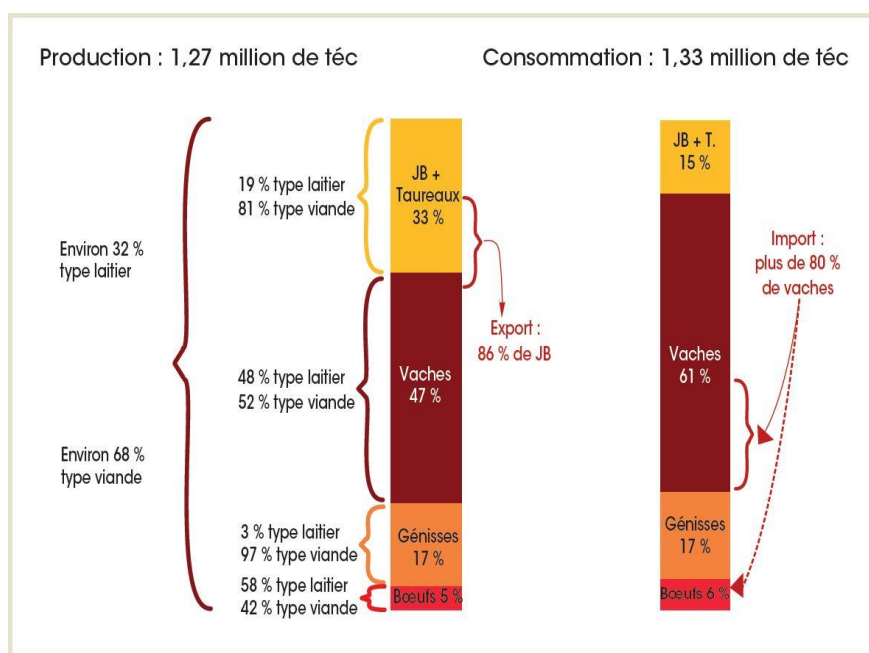


Figure 2 : Production et consommation de viande bovine en France pour l'année 2019. Source : Institut de l'Élevage (2020).

Les derniers chiffres de production et de consommation de viande bovine en France datent de 2019 (Figure 2). La production des bovins à viande était de 872.363 animaux (Institut de l'Élevage, 2020). Parmi ces animaux, 35% sont des vaches allaitantes, 25% des génisses, 2% des bœufs et 38% des taureaux (jeunes bovins). 86% des taureaux produits ont été exportés, essentiellement vers des pays Eu-

ropéens. En cohérence avec ces chiffres, la consommation de viande en France (≈ 25 kg / habitant) correspondait à 83% de femelles ou mâles castrés et seulement une faible proportion de jeunes bovins.

Ce projet de thèse se focalise sur les jeunes bovins, dont le cheptel représente environ 339.471 animaux engraisés en France ou à l'étranger. Les principales races bovines à viande sont les races Charolaise (18%), Limousine (15%), Montbéliarde (8%) et Blonde d'Aquitaine (6%). Même si les jeunes bovins ne représentent qu'une faible proportion de la production bovine Française, leur utilisation des ressources agricoles est significativement supérieure à celle des vaches allaitantes, génisses ou bœufs (Veysset et al., 2019). En conséquence, l'amélioration de l'EA et l'implémentation de stratégies d'alimentation de précision sont très importants pour ce type de production.

La Figure 3 résume les principales caractéristiques du système de production de jeunes bovins à viande en France, y compris l'utilisation des ressources pour l'engraissement.

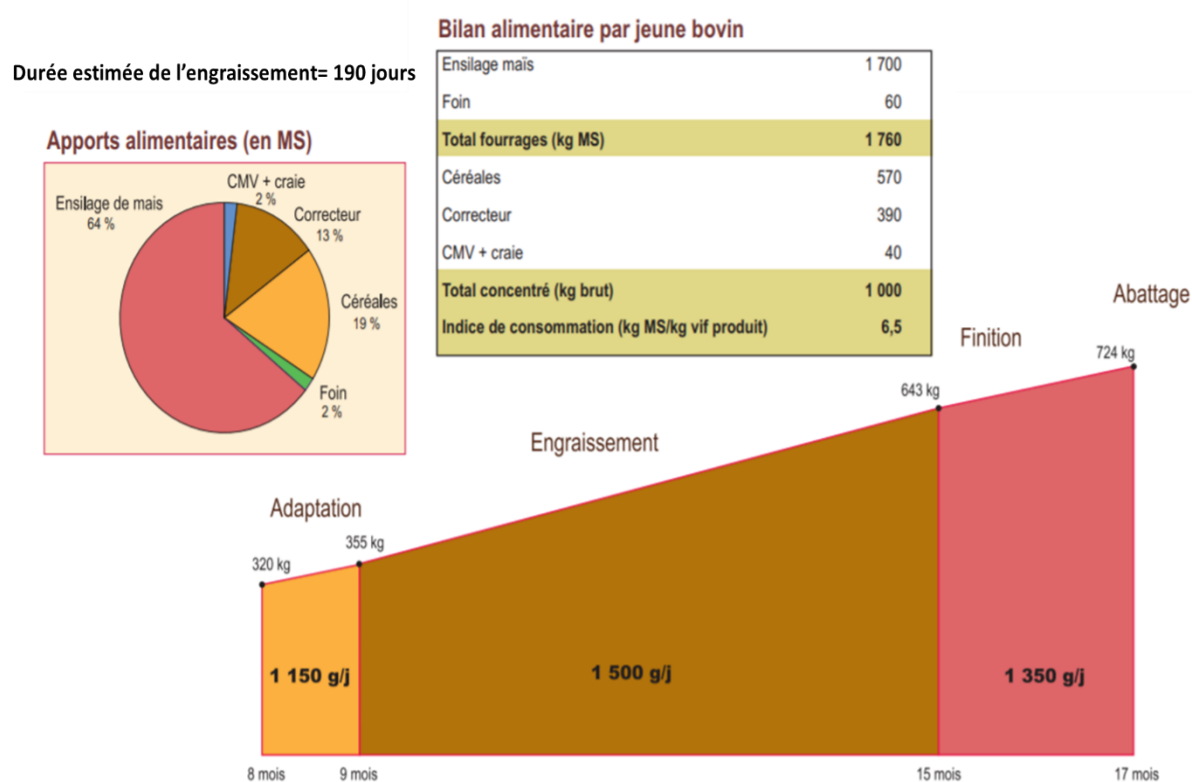


Figure 3 : Performances des jeunes bovins viande en France par période d'âge avec un régime typiquement utilisé dans l'engraissement et distribution des différents ingrédients alimentaires du régime par kilo de matière sèche sur l'ensemble de la période d'engraissement. Source : Institut de l'élevage (2020).

En résumé, dans toute stratégie d'augmentation de l'EA chez le bovin viande par sélection génétique, il faut tenir en compte des particularités du système de production ciblé (système intensif ou extensif) et type d'alimentation (fourrage vs concentré).

L'efficacité alimentaire chez les bovins viande

Je vais tout d'abord définir la notion d'efficacité. Le mot « efficacité » est un mot anglais et sa traduction littérale en français est « efficacité ». Mais dans leur usage courant, le mot « efficacité » est associé à la réalisation des objectifs tandis que la notion d'efficacité est associée à une conversion économe des ressources en résultats. L'EA est définie comme la capacité des animaux à transformer les produits alimentaires (fourrages ou concentrés) en produits animaux (ex. lait, viande ou œufs) (Hill, 2012), avec l'objectif d'une utilisation économe des moyens.

Dans le cas des ruminants, l'efficacité de transformation des aliments en produits animaux est faible. Les bovins à l'engrais ont une EA comprise entre 5 et 25% contre par exemple 45 à 60% chez les porcs (Tolkamp, 2010). En outre, chez le bovin viande seulement 6% de l'énergie brute du régime est transformée en gain de poids (Lobley, 2003). Cette faible efficacité du ruminant est le prix à payer pour sa capacité unique à utiliser des produits riches en cellulose, non consommables par les omnivores ou carnivores (Dijkstra et al., 2005).

Pour cette raison, l'EA des ruminants doit être améliorée, et ceci plus que pour d'autres espèces animales de rente. Deux principales voies d'amélioration existent, l'optimisation des régimes alimentaires et la sélection génétique (Makkar et Beever, 2012). L'optimisation des régimes alimentaires a été largement étudiée chez les ruminants et a abouti à proposer des stratégies nutritionnelles et des systèmes d'alimentation applicables à des groupes d'animaux et non pas à des individus (NRC, 2016 ; INRA, 2018). Aujourd'hui étant données la situation environnementale et la compétition entre les ressources pour l'Homme et les animaux, beaucoup de ces stratégies (ex teneur élevée des régimes en amidon dégradable) ne sont plus considérées comme durables (Tamminga, 1996).

En conséquence, dans le présent projet de thèse l'EA sera abordée du point de vue de la sélection génétique (généticiens) et zootechnique (sélection faite dans une même ferme par les éleveurs) des animaux pour phénotyper les individus les plus efficaces (Archer et al., 1999). Cette sélection devra être accompagnée de régimes formulés de manière précise pour ces individus efficaces comme le propose l'alimentation de précision (Vaintrub et al., 2021).

Phénotypage de l'efficacité alimentaire chez le bovin viande

L'EA est exprimée en tenant compte de la consommation d'aliments et des produits finaux. Plusieurs indices existent. Les plus utilisés sont de deux ordres (Archer et al., 1999) ; d'une part des ratios et plus récemment des valeurs résiduelles (Arthur et Herd, 2012).

Indices basés sur des ratios : Index de consommation ou rapport du gain sur l'ingéré

L'index de consommation (IC) et le rapport gain / ingéré (RGI) peuvent être définis comme des indices d'efficacité brute. Ils sont calculés selon des ratios entre les inputs (consommation journalière de matière sèche et les outputs (le gain de poids journalier) (Figure 4). Le RGI (en anglais Feed Conversion Efficiency, FCE) est le rapport du gain de poids sur la matière sèche ingérée (MSI), et l'IC (en anglais Feed Conversion Ratio, FCR) est l'inverse, soit le rapport entre la MSI et le gain de poids (Carstens et Tedeschi, 2006).

Ces deux indices étant l'inverse l'un de l'autre, leur interprétation sera inversée. Des valeurs FCE élevées signifient que les animaux génèrent un gain de poids élevé pour chaque kg de MSI consommé. Des valeurs de FCR élevées signifient une consommation de MSI élevée par kg de gain de poids vif (PV), ce qui implique de l'inefficacité. Avec les deux indices l'efficacité s'explique soit par une augmentation du gain soit une réduction de la consommation. Ces indices ont été utilisés traditionnellement comme indices technico-économiques, généralement au niveau du groupe pour comparer différents traitements, car il est facile de savoir combien mange un lot entier d'animaux et de connaître le poids à l'entrée et à la sortie des animaux (Andersen, 1978).

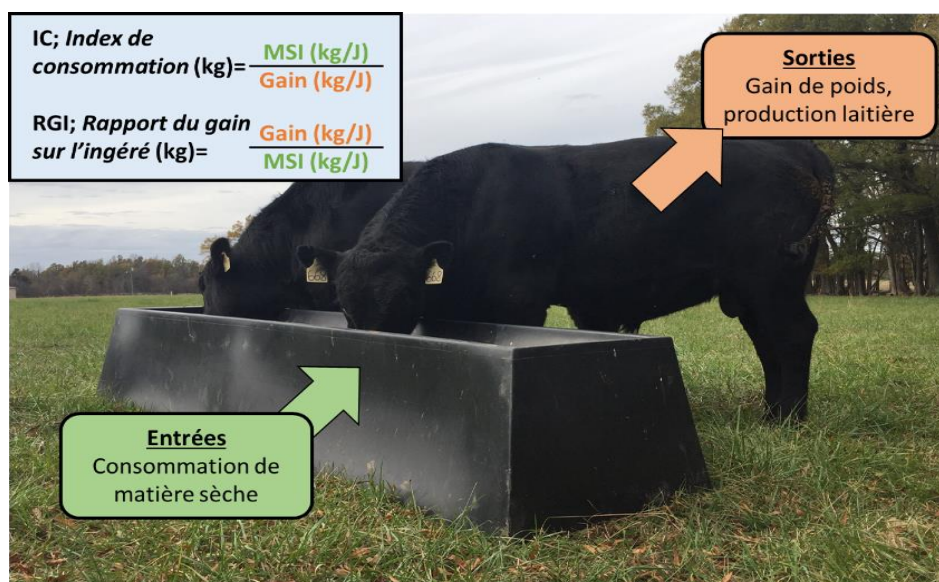


Figure 4 : Définition et calcul des indices de consommation (IC) et du rapport du gain sur l'ingéré (RGI), en l'anglais FCR et FCE, respectivement. Source de l'image: <https://photos.com/featured/friesian-cows-feeding-from-trough-on-montyrakusen.html>.

Du point de vue biologique les corrélations entre la matière sèche ingérée et ces ratios n'ont été pas totalement démontrées. Hill (2012) a résumé plusieurs études génétiques dans lesquelles l'ingéré était corrélé soit positivement, soit négativement soit pas corrélé avec ces ratios. Par contre, le gain a toujours été associé phénotypiquement et génétiquement ($r = -0,61$ à $-0,95$) à ces indices d'EA (Ceacero et al., 2016 ; Taussat et al., 2019). Almeida Santana et al. (2016) ont trouvé des associations génétiques avec l'IC qui montrent que cet index est lié à des mécanismes biologiques associés au gain, comme une synthèse protéique et dégradation plus élevées chez les animaux efficaces.

Pour prendre en compte la concurrence dans l'utilisation des ressources pour les alimentations humaine et animale, les indices basés sur des ratios ont évolués et la notion d'EA nette est apparue. L'EA nette correspond au ratio entre 1) la quantité d'aliments non comestibles pour les humains (fourrages, pailles ou coproduits) ingérés par les animaux, et 2) la quantité de produits animaux (viande, lait, œufs) consommables par l'homme (Laisse et al., 2019). Ce rapport augmente avec l'utilisation par les animaux de ressources non consommables par l'homme (Laisse et al., 2019).

L'avantage majeur des deux indices basés sur des ratios est la facilité de calcul et d'interprétation (Berry et Crowley, 2013). Les inconvénients sont nombreux : 1) l'erreur associée aux valeurs d'efficacité est élevée car elle résulte de l'erreur de chaque terme, 2) les fortes corrélations entre le ratio lui-même et son numérateur, ainsi la réponse d'une sélection basée sur un ratio est plus difficile à prédire à cause de l'antagonisme entre le numérateur et le dénominateur (Gunsett, 1984), 3) la sélection pour le gain de poids (très corrélé à FCE) augmente le PV de l'animal mûre, ses besoins d'entretien (Archer et al., 1999) et ses difficultés de vêlage (dus à la taille du fœtus et à des gestations légèrement plus longues ; Cundiff et al., 1986).

Indices basés sur les valeurs résiduelles : l'ingéré résiduel et le gain résiduel

Les indices d'EA basés sur des valeurs résiduelles ont été proposés pour les bovins en engraissement dès par Koch, (1962). Ces auteurs ont proposé que l'efficacité soit calculée comme une fonction issue de l'interrelation entre les principales performances animales (PV, gain de poids) et les quantités de MSI.

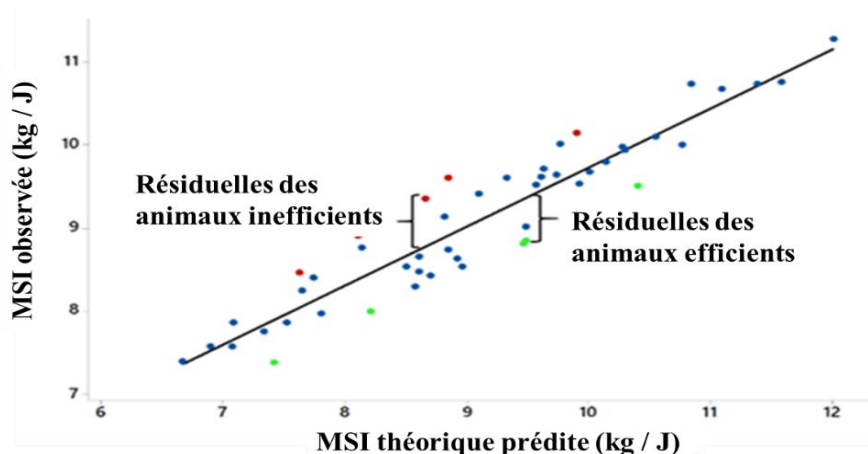


Figure 5 : Régression entre la matière sèche ingérée (MSI) observée et la MSI prédite pour le calcul de l'ingéré résiduel (IR). Chaque point représente un animal. Les points rouges représentent des animaux ayant une consommation observée plus élevée que la consommation prédite par rapport les poids et gains moyens quotidiens. Les points verts correspondent à des animaux ayant une consommation plus faible que la MSI prédite, ce qui les rend efficaces.

Les indices d'efficacité résultant de ce travail sont l'ingéré résiduel [IR ; en anglais « residual feed intake » (RFI)] et le gain résiduel [GR ; en anglais « residual gain » (RG)]. Ces indices sont calculés comme étant les résiduelles de MSI et du gain de poids en covariant les autres variables. Ainsi dans le cas de l'IR les résiduelles seront les différences entre la MSI observée et la MSI théorique de l'animal prédite intra-groupe sur la base du PV et du gain de poids (Figure 5). Dans le cas de IR, il a été suggéré que ces valeurs peuvent donner une idée sur la partition de la MSI destinée à l'entretien (poids) ou à la production (gain).

Dans son même article sur l'efficacité d'utilisation des aliments, Koch et al. (1962) propose un autre indice d'efficacité, le gain résiduel (GR), qui consiste en une régression entre le gain de poids journalier observé et le gain théorique obtenu d'après le poids métabolique des animaux et la quantité de MSI. Comme pour l'IR, les animaux efficaces sur la base de GR ont un gain moyen quotidien (GMQ) plus important que les prévisions, pour un niveau de performances similaire (Koch et al., 1962). Dans ce projet de thèse on va surtout se focaliser sur l'IR plus utilisé dans des programmes de sélection génétique en raison de sa répétabilité et de son héritabilité (tels que discuté plus loin), même si le GR sera aussi abordé.

Les animaux efficaces sur la base de l'IR ont une consommation de MS inférieure aux prévisions (valeurs de IR négatives) pour des performances identiques (Koch et al., 1962). IR résulte par calcul d'un modèle incluant le PV et le gain de poids, d'un point de vue biologique il est donc uniquement associé à l'ingestion contrairement aux indices exprimant le gain. Le calcul d'IR nécessite la mesure journalière de la MSI et la mesure fréquente du PV ainsi que l'identification (et l'élimination) des valeurs aberrantes.

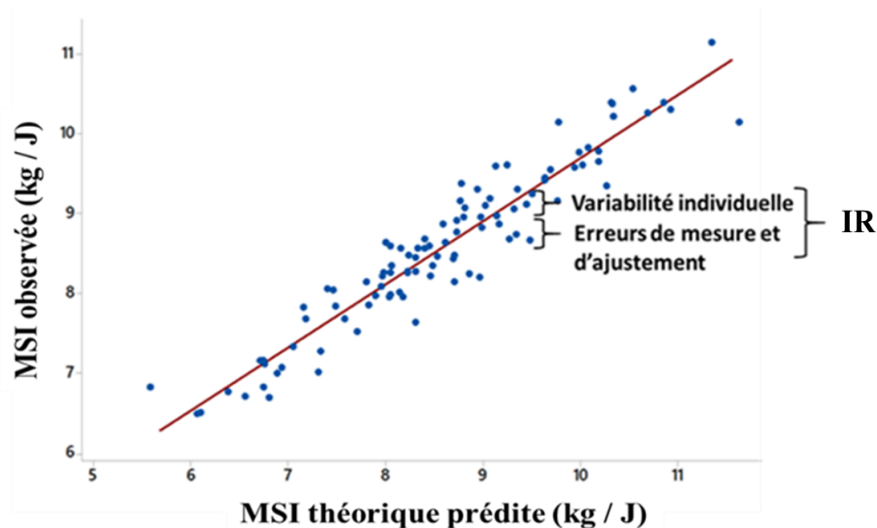


Figure 6 : Relation entre la matière sèche ingérée (MSI) observée et la MSI théorique dans un modèle d'IR. La valeur d'IR d'un animal se compose de la variabilité individuelle de l'ingéré et aussi des erreurs de mesure et ajustement.

L'identification de valeurs aberrantes est plus difficile pour le PV que pour la MSI car celui-ci varie avec les contenus digestifs et fécaux et présente de fortes variations individuelles (Watson et al., 2013). Pour limiter l'influence de la variation des contenus digestifs sur les poids vifs, il est conseillé de peser les animaux à jeun et si c'est possible deux jours en suite pour obtenir une valeur moyenne,

notamment lors des pesées initiales et finales. Le GMQ est généralement calculé par régression en utilisant toutes les pesées disponibles (Green et al., 2013).

De plus, pour gagner en précision, certains auteurs incluent dans le modèle utilisé pour le calcul d'IR des variables de composition corporelle, telles que l'épaisseur de gras sous-cutané ou intra musculaire mesurée par échographie ou ultrason (Montanholi et al., 2009). Dans ces cas-là, le modèle IR sera une fonction de la MSI par rapport au PV, au gain de poids et des proxys de composition corporelle.

L'interprétation de l'IR est rendue délicate par l'erreur qui y est associée et qui a deux origines différentes, 1) les erreurs de mesure d'ingestion ou de poids, 2) l'erreur d'ajustement du modèle (Figure 6). L'erreur du modèle ajoute de la variabilité aux résultats, Fischer et al. (2018) ont calculé que 50% de l'erreur associée aux valeurs de l'IR et le GR peuvent être due aux erreurs du modèle ou de mesure et non à la variabilité individuelle.

La sélection génétique par l'efficacité alimentaire chez le bovin viande

Avant de commencer à aborder la sélection génétique par l'EA, il faut définir deux concepts très importants, la répétabilité et l'héritabilité. La répétabilité est la proportion de la variance totale qui est présente dans plusieurs mesures d'un trait (ex. MSI) et qui est due aux différences entre les individus. C'est un outil utile pour quantifier la stabilité de la variable dans le temps (Hayes and Jenkins, 1997). La répétabilité prend en compte la génétique et des facteurs environnementaux du caractère étudié. Par contre, l'héritabilité est la proportion de la variance des caractères phénotypiques d'une population qui n'est attribuée qu'à la variation génotypique. Si l'héritabilité d'un caractère est élevée, la variabilité phénotypique de ce caractère sera liée à la génétique et donc, transmissible à la descendance (Visscher et al., 2008). En fait, la répétabilité représente la valeur maximale possible de l'héritabilité qui ne prend en compte que la partie génétique (Dohm, 2002). Pour conduire la sélection génétique en faveur de l'EA, les indices utilisés doivent montrer une répétabilité et donc, une héritabilité au moins modérée (Vallimont et al., 2011).

Héritabilité et répétabilité de l'efficacité alimentaire chez le bovin

La répétabilité de l'EA, à composition de régimes constante, est modérée/haute pour l'IR [0,4-0,62 (Kelly et al., 2010 ; Gomes et al., 2012)] et la répétabilité de la classification des animaux selon leur IR est aussi modérée [0,52 (Durunna et al., 2012)]. Si l'on considère la répétabilité de chacune des variables intervenant dans le modèle de calcul de l'IR, celle de la matière sèche ingérée est toujours élevée [0,60-0,70 (Kelly et al., 2010 ; Manafiazar et al., 2016)], ce qui pourrait expliquer la répétabilité modérée/haute de l'IR. Cependant, celle du gain de poids est faible [0,11 (Kelly et al., 2010)], probablement en raison du fait que le gain suit une courbe de croissance semi-exponentielle et non pas linéaire (Winsor, 1932). Le gain expérimente une croissance linéaire associée à l'augmentation de poids (Oltjen et al., 1986) et dépendrait donc de l'état de croissance et de maturité des animaux. Pour cette raison le gain de poids change pendant la vie des animaux proportionnellement plus que la matière sèche ingérée, qui a tendance à suivre une trajectoire linéaire (Herd et al., 2014), ce qui peut expliquer une répétabilité de la MSI considérablement supérieure à celle du gain.

En ce qui concerne l'héritabilité des indices d'EA, peu d'informations sont disponibles puisque les recherches sont récentes. Les indices les plus étudiés sont l'index de consommation et l'IR. Les premières mesures d'héritabilité réalisées avant 1999, avec un petit nombre d'animaux (< 2000 individus) et des imprécisions sur les mesures de quantités ingérées individuelles, indiquent des valeurs variant entre 0,16 et 0,40 pour l'IC et entre 0,14 et 0,28 pour l'IR (Archer et al., 1999). Plus récemment (2000-2012), Hill (2012) dans une synthèse des travaux conduits chez le bovin viande (n=18) montre une héritabilité de $0,25 \pm 0,12$ pour l'IC et de $0,30 \pm 0,12$ pour l'IR, ce qui est plus en accord la répétabilité de ces deux indices. Berry et al., (2014a :2014b) ont aussi observé une héritabilité de $0,33 \pm 0,013$ (min = 0,07 et max = 0,62) pour l'IR et de $0,23 \pm 0,013$ (min = 0,06 et max = 0,46) pour l'IC dans des animaux en croissance.

En plus de l'héritabilité, lorsque l'on sélectionne pour l'EA il faut identifier les autres performances qui sont génétiquement associées à l'EA. L'EA est un caractère déterminé par différentes familles de gènes (Grion et al., 2014), et une sélection pour ce caractère peut conduire à une co-sélection d'autres caractères. Le Tableau 1 détaille les principales corrélations génétiques entre les indices d'EA (IC et IR) et d'autres performances animales.

Tableau 1 : Corrélations génétiques moyennes entre les indices d'EA et les variables productives (Adapté de Hill, 2012).

Variables	Ingéré résiduel		Index de consommation	
	moyenne	écart-type	moyenne	écart-type
Matière sèche ingérée	0,56	0,26	0,12	0,39
Gain de poids	0,01	0,14	-0,59	0,13
Poids métabolique	0,01	0,16	-0,16	0,37
Poids au vêlage	-0,27	0,16	-0,19	0,12
Poids d'un an	-0,04	0,25	-0,22	0,37
Gras de la cote	0,12	0,26	0,18	0,27
Surface de la cote	-0,15	0,16	-0,11	0,18
Gras intramusculaire	0,22	0,45	0,11	0,04
Index de consommation	0,58	0,18	1,00	0,00

Le Tableau 1 montre une corrélation entre les deux indices d'EA ; l'IR est positivement corrélé au IC de manière modérée/haute ($r = 0,58$), et donc, un animal efficient selon l'IR sera en moyenne aussi efficient selon l'IC, comme déjà démontré par Bouquet et al. (2010). De plus, comme attendu d'après la construction de chaque index, l'IR est génétiquement associé à la MSI tandis que l'IC est associé au gain de poids. Plus récemment, Taussat et al. (2019) a obtenu sur le diapositif BEEFALIM dont fait partie ce travail de thèse, une héritabilité de l'EA de $0,36 \pm 0,07$ pour l'IR et de $0,35 \pm 0,07$ pour l'IC. Ils ont aussi observé une corrélation phénotypique (r_p) et une corrélation génétique (r_g) négatives entre l'IR et le rendement de carcasse ($r_p = -0,16$, $r_g = -0,18$) et entre l'IR et le pourcentage du muscle ($r_p = -0,27$, $r_g = -0,47$) et positives entre l'IR et le pourcentage du gras ($r_p = 0,31$, $r_g = 0,48$) et entre l'IR et la taille de certains organes comme l'abomasum, les intestines, le foie ou les rognons ($r_g > 0,36$).

En résumé, l'EA est répétable et héritable et peut donc être un critère de sélection génétique, spécialement l'IR qui a une héritabilité plus élevée que l'IC. Cependant, ces indices d'efficience, et concrètement l'IR, sont associés à certaines performances, comme la composition corporelle dont il faut tenir en compte.

Variabilité individuelle et potentiel de sélection

La sélection génétique par l'EA a commencé il y a des décennies sur plusieurs espèces d'animaux de rente. Dans le cas de poulets chair, où la sélection par l'EA a commencé quasiment en premier, ce caractère a augmenté de près de 50% depuis 1957 (Zuidhof et al., 2014). Cependant, dans le cas des bovins viande, peu de pays (uniquement l'Australie et le Canada) ont mis en place un programme de sélection génétique guidé par l'EA. Par conséquent, l'EA, plus faible chez le ruminant que chez d'autres espèces animales (Tolkamp, 2010), n'a pas bénéficié d'une amélioration génétique au même niveau que celle constatée chez le porc et la volaille. L'absence d'une sélection génétique forte sur l'EA chez le ruminant devrait se traduire sur une variabilité individuelle plus élevée. Cependant, d'après les données de la littérature la variabilité individuelle de l'EA, en termes du coefficient de variation, est similaire à celle observée chez d'autres espèces d'animaux de rente (Tableau 2).

La variabilité individuelle d'un caractère peut être définie (Hill, 2012) comme la variabilité que présente ce caractère entre individus de même race, même sexe, même âge et mêmes caractéristiques morphologiques, élevés dans les mêmes conditions : même lieu de production, même période d'étude et même régime (ce qui définit un groupe contemporain). Elle s'exprime par le coefficient de variation et en effet, la variabilité individuelle des performances est plus importante chez les bovins viande que chez les autres espèces d'animaux de rente (Tableau 2). La variabilité individuelle du gain est toujours légèrement plus élevée que celle de l'ingéré (CV de 15,7% vs 12,7%) ce qui pourrait expliquer que la variabilité des indices d'EA liés au gain, IC ou GR, soit aussi plus élevée que celle de l'indice lié à la MSI, IR (Kelly et al., 2010).

Au jour d'aujourd'hui, c'est grâce à la grande variabilité individuelle de l'EA observée chez le bovin viande que des progrès notables sont attendus de la sélection génétique. Archer et al. (1999) ont suggéré que cette grande variabilité individuelle de l'EA représente une grande opportunité pour améliorer ce caractère de manière significative.

Tableau 2 : Coefficient de variation des principaux caractères productifs dans l'élevage de différentes espèces.

Auteurs	Animal	Race	N	MSI	GMQ	IC/RGI	IR	GR
Taussat et al., 2020	Bovins	Taurillons Charolais	1477	12	14	14	7,7	9,6
	Bovins	Taurillons Charolais	4674	10	16	15	4,1	12
Berry & Crowley., 2015	Bovins	Taureaux viande	3531	14	18	19	8,0	13
Nascimento et al., 2016	Bovins	Génisses Nellore	575	15	25	-	7,3	15
Renaud & Krauss., 2002	Bovins	Taureaux Charolais	946	9,4	-	14	7,0	-
Almeida Santana et al., 2019	Bovins	Nellore	9079	20	31	27	11,0	-
Arthur et al., 2001	Bovins	Taurillons Angus	1180	14	19	17	7,6	-
Bouquet et al., 2010	Bovins	Blonde d'Aquitaine	558	10	-	12	3,6	-
	Bovins	Limousin	495	7	-	14	3,0	-
Torres-Vazquez et al., 2019	Bovins	Angus	2220	13	22	22	7,4	15
Lancaster et al., 2014a	Bovins	Brangus	114	12	16	15	8,2	-
Archer et al., 1997	Bovins	-	760	9,7	12	9,6	5,0	-
Nkrumah et al., 2007	Bovins	Génisses viande	464	15	18	17	8,4	-
Mujibi et al., 2011	Bovins	Génisses viande	728	12	18	-	6,9	-
Lancaster et al., 2014b	Bovins	Santa Gertrudis	990	12	13	13	6,7	-
Schenkel et al., 2003	Bovins	Taureaux viande	2284	16	15	17	13	-
François et al., 2002	Brebis	-	981	13	15	10	6,5	-
Jiao et al., 2014	Porcs	Duroc	972	14	11	15	13	-
	Porcs	Duroc	7388	15	10	15	13	-
Do et al., 2013	Porcs	Landrace	4773	16	9	13	12	-
	Porcs	Yorkshire	4751	16	9	12	12	-
Hoque et al 2008	Porcs	Porcs Duroc	1642	8,7	13	6,4	4,9	-
Gilbert et al., 2014	Porcs	Porcs en croissance	115	10	10	8,9	5,2	-
Yuan et al., 2015	Volailles	White Legorn	3749	8,6	-	-	7,1	-
	Volailles	White Legorn	2447	7,6	-	27	6,7	-
			Moyenne globale	12,4	15,7	15,1	7,8	12,9

Abréviations : MS, Matière sèche ingérée ; GMQ, gain de poids moyen quotidien ; IC, index de consommation ; IR, Ingéré résiduel ; GR, gain résiduel.

Conséquences de la sélection génétique pour l'efficacité alimentaire

La sélection génétique pour l'EA peut s'accompagner d'effets indésirables (1), et peut faire l'objet d'interactions avec le régime alimentaire (2), limitant les progrès attendus.

1) Effets indésirables de la sélection génétique pour l'efficacité alimentaire

Le programme Australien (BREEDPLAN Australia), après 3 générations, a mis en évidence non seulement les effets bénéfiques mais aussi les effets indésirables de la sélection pour l'IR (Arthur et al., 2001). Parmi les bénéfiques, aucune différence n'a été observée entre le poids initial, le poids adulte et le gain de poids moyen des animaux entre les groupes. Cela est important car si le poids adulte des vaches allaitantes n'est pas affecté, leurs besoins d'entretien ne le seront pas non plus. Ces effets s'accompagnent d'une consommation de matière sèche plus faible de -5% chez les animaux efficaces selon l'IR en moyenne sur toutes les expérimentations (Richardson et al., 2001). Mais des conséquences négatives sur d'autres caractères et différents mécanismes physiologiques, ont été démontrées dans des études d'association génétique et génomique (Do et al., 2014 ; Ding et al., 2018 ; Brito et al., 2020 ; Brunet et al., 2021), résultant en une co-sélection de caractères non désirés ou indésirables.

Lorsque les généticiens ont commencé à sélectionner animaux par des indices basés sur des ratios, il a été conclu que la sélection pour un caractère productif, tel que le gain de poids ou la production laitière, augmentait l'efficacité générale [la sélection pour la production laitière représente 70-95% de la sélection pour l'efficacité elle-même (Korver, 1988)]. La sélection génétique sur un caractère donné (production laitière ou gain) s'accompagnerait d'une co-sélection des mécanismes indirectement associés à l'EA, tels que par exemple une glandule mammaire plus efficace ou un gain de poids plus efficace (Blake et Custodio, 1984). De plus, la sélection sur le ratio de gain de poids ou le ratio de conversion alimentaire chez les bovins d'engraissement augmentait le gain de la même façon (Mrode et al., 1990). La sélection génétique pour le gain de poids explique 81% de la réduction du IC en comparaison de la sélection pour l'indice lui-même (Koch et al., 1962).

La sélection pour des indices basés sur des résiduelles, en particulier IR, s'accompagne d'une modification de répartition des nutriments et de bilan d'énergie corporelle en raison d'une consommation d'aliments réduite pour des performances identiques (Rauw, 2012). Cette modification dans la répartition des nutriments, et spécialement dans la partition d'énergie permettrait de consacrer plus d'énergie pour la production et moins pour d'autres fonctions telles que la reproduction ou l'immunité (Rauw et al., 1998). En effet, certaines études ont observé une co-sélection entre l'IR et une baisse de la motilité spermatique des taurillons (Wang et al., 2012), des gestations plus longues chez des vaches allaitantes (Basarab et al., 2011) ou des systèmes immunitaires moins actifs (Mpetile, 2015 ; Zerjal et al., 2021). Cependant, toutes les études ne montrent pas de co-sélection négative sur la reproduction (ex Hafla et al., 2013) ou l'immunité (Rakhshandeh et al., 2012) entre porcs ou ruminants sélectionnés pour l'IR.

2) Interaction entre la sélection génétique par l'efficacité alimentaire et l'effet régime

Le type de régime influence la sélection génétique pour l'EA (Kause et al., 2006 ; Carré et al., 2008) ; les animaux sélectionnés expriment leur potentiel de façon différente selon les types de régime. Dans le cas du bovin viande, qui peut recevoir des régimes très différents selon le système de production ou au cours de sa vie productive, cet effet doit être pris en compte. La plupart des bovins viande, surtout en Europe et en France, sont élevés avec des régimes principalement fourragers dans la phase de croissance mais avec des régimes à base des concentrés pendant l'engraissement (Kenny et al., 2018). Or, les taurillons génotypés et utilisés pour commercialiser les semences d'animaux à haute EA (ou autres caractères désirés) sont nourris avec des régimes à base de concentrés et non pas fourrages. Les différences d'alimentation entre taureaux génotypés et leurs descendants peut poser problème, puisque certaines études suggèrent l'existence d'une interaction entre l'EA et le régime. La répétabilité de l'IR des taurillons en engraissement diminue lorsque les animaux passent d'un régime de croissance à un régime d'engraissement, tous les deux à base de concentrés mais différents en la teneur énergétique (Durunna et al., 2011; Cassady et al., 2016). Lorsque le changement alimentaire est plus marqué, en passant d'un régime fourrager à un régime concentré, la répétabilité de l'EA est encore moins élevée (Coyle et al., 2016). Ainsi, le type de régime (ou les caractéristiques du régime) interagit avec l'EA.

Conclusion intermédiaire

Pour guider la sélection pour l'EA sans impacter la résilience et la robustesse des animaux (Zerjal et al., 2021) et adapter le régime à l'EA des animaux (Lovarelli et al., 2020) ou éviter des variations d'EA selon le régime, un certain nombre d'auteurs (Richardson et Herd, 2004; Herd et Arthur, 2009; Cantalapiedra-Hijar et al., 2018) se sont intéressés aux mécanismes physiologiques associés à l'EA. Dans ce projet de thèse, je m'intéresse aussi à ces mécanismes et aux interactions avec le régime.

Mécanismes physiologiques associés à la variabilité individuelle de l'efficacité alimentaire

Herd et al. (2004) et Richardson et Herd (2004) ont été les premiers à identifier et quantifier les déterminants physiologiques de l'EA (Figure 7). Dans leur première étude, ils ont identifié d'après les articles publiés les principaux déterminants biologiques impactant l'EA (IR). La Figure 7 (Panel A) résume ces déterminants. La thermogénèse postprandiale représentait 9% (Corbett et al., 1990), la digestion 14% (Richardson et al., 1996), la composition corporelle 5% (Richardson et al., 2001) et l'activité physique 5% (Richardson et Herd, 2004) de la variance totale de l'EA.

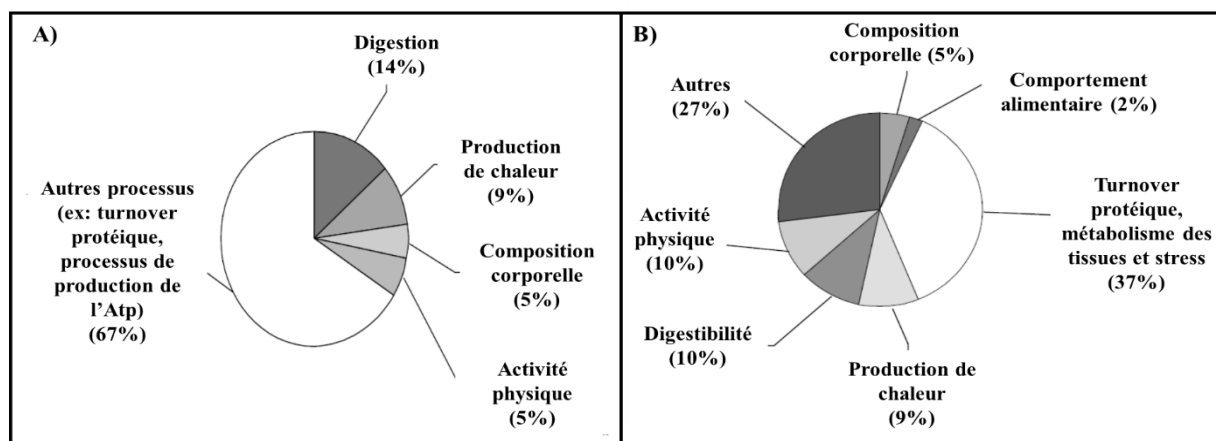


Figure 7 : Contribution des déterminants de l'efficacité alimentaire chez le bovin viande. Le panneau A correspond à une synthèse bibliographique et le panneau B à une analyse issue du programme Australien de sélection. Sources : Herd et al. (2004) ; Richardson et Herd (2004).

Dans leur deuxième étude (Figure 7b), Richardson et Herd (2004) ont précisé leurs estimations. Ils ont raisonné sur un dispositif animal appartenant au programme de sélection génétique Australien (deuxième génération d'animaux sélectionnés pour l'IR) et engraisés après sevrage en feedlot. Les animaux extrêmes selon l'IR (efficaces et inefficaces) ne différaient que de 0,42 kg MSI / j, ce qui est faible mais qui s'explique par le petit nombre de générations de sélection. Ils ont cherché à estimer les paramètres qui contribuaient à la variation de l'EA et ils ont développé une équation linéaire pour prédire l'IR à partir d'indicateurs de mécanismes physiologiques. Leur objectif était d'extraire d'une analyse de variance la contribution de chaque mécanisme biologique étudié à l'EA. Les indicateurs considérés ont été l'aspartate amine-transférase (AST), et la viscosité sanguine comme indicateurs du turnover protéique et stress, la créatinine et la leptine plasmatique ainsi que des mesures échographiques lombaires d'épaisseur de gras comme indicateurs de la composition corporelle, le cortisol et le beta-OH plasmatique comme indicateurs de stress, et la digestibilité de la matière sèche mesurée en stalle pendant 7 jours. A notre avis, la contribution des différents mécanismes biologiques ciblés à la variabilité individuelle de l'EA tels qu'étudiés par ces auteurs (5% composition corporelle, 2% comportement alimentaire, 9% thermogénèse postprandiale, 10% digestibilité, 10% activité physique, ou 37% turnover protéique) ne peut pas être considérée comme définitive car elle a été obtenue par association avec des biomarqueurs. Cette étude a le mérite de poser des premières hypothèses fortes sur les principaux mécanismes associés à l'EA. Elle a été actualisée par Cantalapiedra-Hijar et al. (2018)

d'après les études réalisées depuis l'année 2005. Les principaux mécanismes physiologiques associés à l'EA chez le bovin viande (Figure 7) sont abordés ci-dessous selon cinq grandes catégories : comportement alimentaire et activité physique, digestion, composition corporelle, métabolisme énergétique et métabolisme protéique. Sur la base de leur contribution à la variabilité individuelle de l'EA, j'ai distingué les contributeurs mineurs, expliquant moins de 35% de la variance totale (Comportement alimentaire et activité des animaux, Digestion, Composition corporelle) des contributeurs majeurs (Métabolisme énergétique et Métabolisme protéique). Il faut noter que la plupart des études a été réalisée avec un petit nombre d'animaux extrêmes en IR ou IC ($N < 45$) et que seules des études d'association ont travaillé avec un nombre plus important d'animaux.

Mécanismes biologiques mineurs contribuant aux variations d'efficacité alimentaire

Comportement alimentaire et activité des animaux

Le comportement alimentaire se réfère à l'activité associée à la consommation de matière sèche ; la fréquence des repas, le nombre de visites à l'auge, la quantité ingérée à chaque visite et le temps passé par visite, qui dépendent tous du régime alimentaire (Fitzsimons et al., 2017). La majeure partie de ces travaux a été réalisée avec des animaux extrêmes en utilisant des dispositifs de mesure des visites et quantités ingérées grâce à des colliers d'identification connectés à une auge peseuse en temps réel. Kenny et al. (2018) ont observé au travers d'une méta-analyse que les animaux inefficients passent plus de temps (+12%) à ingérer et qu'ils ont une vitesse d'ingestion (g MSI / min) plus élevée que les efficaces. Des études plus récentes ont corroboré ces résultats et démontré que les animaux inefficients font aussi plus de visites à l'auge (Parsons et al., 2020 ; 2021). Comme indiqué par Kenny et al. (2018), ces différences de comportement alimentaire sont associées à la digestibilité de la matière sèche.

Le comportement alimentaire est aussi associé à des différences d'activité physique journalière et donc de dépenses énergétiques. Richardson et al. (2004) ont trouvé une corrélation significative ($r = 0,32$) entre l'activité mesurée avec un podomètre et l'IR, suggérant que les animaux inefficients ont eu une plus grande activité physique et donc des dépenses énergétiques plus élevées que les efficaces. De même, Munro et al. (2019) ont trouvé une fréquence cardiaque plus élevée chez les animaux inefficients selon l'IR, ce qui pourrait être expliqué par une activité physique plus importante et des dépenses énergétiques supérieures.

Digestion

La digestion est le processus dans lequel les animaux transforment les aliments en nutriments. Il a été observé que les animaux efficaces selon l'IR présentent une digestibilité supérieure (+4%) de la MSI (Bonilha et al., 2017 ; Johnson et al., 2019), ce qui pourrait être expliqué par une quantité ingérée plus faible associée aux rumens plus petits (Colucci et al., 1982), ce qui est aussi lié à une vitesse d'ingestion plus faible par rapport à un temps de rétention de l'aliment supérieur et donc, plus de temps de fermentation (Basarab et al., 2003)]. Cependant, Cantalapiedra-Hijar et al. (2018) ont suggéré que cette augmentation de digestibilité est fondamentalement due à une quantité ingérée plus faible car la capacité de digestion et fermentation ruminales augmentent lorsque les animaux ingèrent des

petites quantités. Ces différences d'ingestion et de fermentation sont également associés à la production de méthane.

D'un point de vue théorique, des quantités ingérées plus importantes (d'un même régime et à même digestibilité) devraient être associées à des émissions de méthane supérieures (Sauvant et Nozière, 2016). Ainsi les animaux inefficients devraient produire plus de méthane. Cependant, une augmentation de quantités ingérées chez les inefficients peut être contrebalancée par à une digestibilité ruminale moins élevée (taux de rétention plus faible par kg de MSI) et moins de production de méthane alors que chez les efficaces la digestibilité ruminale est plus élevée (taux de rétention plus élevé) conduisant à une plus grande production de méthane. Par conséquent certaines études n'ont pas mis en évidence de différences de production de méthane (Alemu et al., 2017 ; Flay et al., 2019;) ou au contraire une production de méthane plus faible chez les inefficients (Dini et al., 2019; Johnson et al., 2019) lorsque les différences de digestibilité ruminale étaient plus fortes que les différences de niveau d'ingestion. Une variabilité individuelle a été notée pour le microbiote ruminal entre animaux élevés dans les mêmes conditions et avec le même régime (Malmuthuge et Guan, 2017). Certains types de bactéries seraient associés aux individus efficaces (Pope et al., 2011), comme *Succinivibrio* (Hernandez-Sanabria et al., 2010, 2012), qui pourrait orienter l'utilisation de l'hydrogène vers la production de succinate et non de méthane, améliorant ainsi l'efficacité de conversion digestive de l'énergie (Zhou et al., 2010).

Composition corporelle

La composition corporelle a été associée à l'EA de manière phénotypique et génétique, par le biais d'une corrélation négative entre animaux efficaces selon l'IR et le rendement de carcasse (Renand and Krauss, 2002 ; Taussat et al., 2019). Cette relation peut être associée aux différences de dépenses énergétiques des tissus corporels (Lobley, 2003), plus élevés pour les viscères que pour le muscle squelettique ou la carcasse (Ortigue et Doreau, 1995). Kenny et al. (2018) ont fait une synthèse bibliographique des travaux ayant mesuré la composition corporelle d'animaux extrêmes selon l'IR (avec un écart d'ingestion 0.43-0.95 kg / j) et montré que la taille du tractus digestif était plus importante chez les inefficients, conduisant à des dépenses énergétiques plus élevées et donc une EA plus faible (Fitzsimons et al., 2017).

Mécanismes biologiques majeurs contribuant aux variations d'efficacité alimentaire

Métabolisme énergétique

Le métabolisme énergétique regroupe une chaîne de processus associés à l'obtention, la production et l'utilisation d'énergie, du niveau sub-cellulaire avec l'activité mitochondriale jusqu'à l'animal entier (Johnson et al., 2003). Au niveau sub-cellulaire, plusieurs études ont trouvé une activité mitochondriale de la chaîne d'électrons supérieure à cause d'une production mineure de radicaux libres chez des animaux avec des index de consommation plus importants ou efficaces selon l'ingéré résiduel (Bottje and Carstens, 2009 ; Lancaster et al., 2014), Une production d'ATP plus efficace peut contribuer à une plus grande quantité d'énergie nette pour une même quantité d'énergie ingérée.

Au niveau de l'animal entier, des différences de thermorégulation ont été observées, avec une température corporelle plus basse chez les animaux efficaces que chez les inefficaces, conduisant à des dépenses énergétiques plus importantes pour la thermorégulation (DiGiacomo et al., 2014). Comme décrit avant, lorsque les animaux ont des poids de viscères plus importants les dépenses énergétiques augmentent réduisant la proportion d'énergie utilisés à des fins productives (Ferrell and Jenkins, 1988). Une étude réalisée en chambres respiratoires avec des porcs mâles adultes a montré des dépenses énergétiques d'entretien plus faibles pour les animaux efficaces (-10%) selon l'IR (Barea et al., 2010). Chez les ruminants Nkrumah et al. (2006) ont trouvé des corrélations négatives entre l'IR et l'énergie digestible ($r = -0.41$; $P < 0.05$) et métabolisable ($r = -0.44$; $P < 0.05$) et des corrélations positives entre l'IR et les dépenses énergétiques ($r = 0.68$; $P < 0.001$), suggérant une meilleure utilisation de l'énergie chez les individus efficaces selon l'IR.

Récemment, Guinguina et al. (2020) ont étudié la contribution de plusieurs facteurs associés au métabolisme énergétique aux variations d'EA (IR). Ils ont trouvé que même si la digestibilité ou la production de méthane (indirectement associées au métabolisme énergétique) ont contribué à une meilleure utilisation de l'énergie métabolisable, ce sont surtout les différences d'énergie pour l'entretien qui étaient associées aux animaux extrêmes selon l'IR. Il est considéré que les variations de dépenses énergétiques sont une conséquence directe des variations du métabolisme protéique notamment et une conséquence des différences de composition corporelle (Lobley et al., 1980). Caton et al. (2000) ont estimé que le coût énergétique de la synthèse protéique représentait 23% des dépenses énergétiques journalières du bovin viande. Gill et al., (1989a) ont mesuré directement le coût énergétique du turnover sur des agneaux, en estimant un 19% de toute la dépense énergétique corporelle. Gill et al., (1989a) ont même estimé la contribution du turnover des tissus à ce pourcentage global de la dépense énergétique (tractus gastro-intestinale : 25-27%, muscle : 21-26%, peau : 23-26%, et le foie : 13%).

Métabolisme protéique

Le métabolisme protéique englobe tous les processus associés à l'utilisation des composés protéiques. Parmi tous les processus du métabolisme protéique, ceux qui peuvent impacter le plus l'EA sont :

- Le turnover protéique, qui représente le renouvellement, c'est-à-dire la synthèse et la dégradation continue des protéines corporelles (Waterlow, 2006a)
- La partition des acides aminés (AAs) vers l'anabolisme ou catabolisme au niveau des tissus splanchniques (Lapierre et al., 2002)

Ces processus ont été associés à l'EA parce qu'ils influencent l'efficacité d'utilisation de l'azote. En plus, chez le bovin viande où le principal produit final c'est du muscle, le métabolisme protéique est associé à l'efficacité du gain de muscle et aussi à la partition de l'azote alimentaire vers le gain de poids (Lobley, 2003). La recirculation de l'urée c'est un processus qui influence aussi l'efficacité d'utilisation de l'azote (Tan and Murphy, 2004), mais étant donné qu'il s'agit d'un composé azoté et non pas d'une protéine je ne l'inclurai pas dans les processus du métabolisme protéique.

Parmi ces processus, le turnover protéique a été signalé par plusieurs auteurs comme un déterminant possible majeur de l'EA en raison de son coût énergétique élevé (Lobley, 2003 ; Richardson et al., 2004; Cantalapiedra-Hijar et al., 2018). Le turnover protéique est essentiel pour la fonction d'entretien comme le remplacement des protéines défectueuses ou anciennes et pour la croissance, donc. Il a aussi été associé au processus de robustesse (ex : adaptation à l'environnement ou réponse immunitaire),

pouvant expliquer la co-sélection de caractères observée chez des animaux efficients (Rauw, 2012). La synthèse bibliographique publiée par Cantalapiedra-Hijar et al., (2018) suggère un turnover protéique plus faible chez les animaux efficients malgré des résultats contradictoires. Le turnover protéique étant très affecté par le régime et le niveau d'alimentation (Reeds et Fuller, 1983), l'étude de ce mécanisme en association avec l'EA pourrait aussi aider à expliquer l'interaction observée entre EA et l'effet régime.

Objectif de la thèse

L'objectif de la thèse s'inscrit dans une démarche d'amélioration de l'EA des jeunes bovins viande et du développement de l'alimentation à base de régimes riches en fibres. Ils se focalisent sur l'étude des mécanismes physiologiques associés à la variabilité inter-individuelle de l'EA, et aux interactions avec le type de régime utilisé. Parmi l'ensemble des mécanismes impliqués, mon projet de thèse a ciblé le métabolisme protéique qui, d'après la littérature, semble être un déterminant majeur des variations d'EA chez le bovin viande.

Ainsi, l'objectif de la thèse est de :

Comprendre la relation à l'échelle individuelle entre l'efficacité alimentaire et le métabolisme protéique chez le bovin viande en analysant la contribution de l'effet régime à cette relation.

Cet objectif de thèse a été développé dans le cadre du projet EFFI-SCIENCE, méta-tâche 1.2 du programme BEEFALIM 2020, et qui a pour objectif d'analyser la relation existante entre l'EA et l'ensemble des mécanismes physiologiques, tant digestifs que métaboliques, chez le bovin viande. Le projet EFFI-SCIENCE inclut deux projets de thèses différents, l'un visant les mécanismes digestifs, le comportement alimentaire et l'émission de méthane, et l'autre, cette thèse présente, strictement focalisée sur le métabolisme protéique en lien avec la composition corporelle et la dépense énergétique. Ma thèse analysera l'importance du métabolisme protéique comme déterminant des variations individuelles de l'EA en évaluant de mesures allant de l'animal entier à l'échelle biomoléculaire.

Une étude bibliographique du métabolisme protéique et de son lien avec l'EA est présentée en préalable de la stratégie scientifique du travail de thèse.

Etude bibliographique

Métabolisme protéique et efficacité alimentaire

Métabolisme protéique chez le ruminant

Le métabolisme protéique fait référence aux processus chimiques et/ou biologiques responsables de l'absorption, l'excrétion, la synthèse et la dégradation des protéines alimentaires ou corporels. Les substances azotées sont des éléments essentiels à la vie de l'organisme en raison de leurs multiples fonctions. Les protéines, principaux composés azotés du corps, sont constituées d'AAs dont le nombre et l'ordre est défini par codage génétique. Les protéines représentent une proportion variable du PV de l'animal (10-25%) mais forment une part constante de la masse corporelle délipidée (INRA, 1988). Chez le bovin viande en croissance (150-300 kg), la proportion de protéine corporelle varie de 22,7 à 23,1% du PV et diminue légèrement avec l'âge des animaux jusqu'à arriver à 18% à l'engraissement (Andrade et al., 2009).

Les ruminants ont la particularité de digérer les constituants fibreux (principalement cellulose et hémicellulose) présents dans les fourrages (ex : plantes herbacées et arbustives, pâturages et restes de plantes vivrières après la récolte) et coproduits. Cette capacité est permise par l'activité fermentaire du rumen en conditions d'anaérobiose. Cette étude bibliographique décrit le devenir des matières azotées ingérées par l'animal depuis leur fermentation dans le rumen jusqu'au métabolisme dans l'organisme animal.

Devenir des matières azotées dans le rumen

Avant d'aborder le devenir des matières azotées dans le rumen, il faut préciser que les deux facteurs les plus importants sont le taux de passage des aliments par le rumen (exprimé en % / h), le niveau d'ingestion et le pourcentage de concentré dans la ration (INRA, 2018). Ces facteurs affectent le taux de dégradation et la digestibilité des matières azotées dans le rumen. Les matières azotées totales (MAT) qui proviennent des aliments peuvent être divisées en deux groupes, d'une part les protéines et d'autre part les constituants non-protéiques comme les AAs libres, l'urée, l'ammoniaque et les acides nucléiques. Dans le rumen, les enzymes microbiens dégradent une grande partie de la fraction protéique en molécules plus simples, successivement peptides, AAs et ammoniaque. Les protéines les plus dégradables sont très rapidement dégradées en quasi-totalité en ammoniaque, et l'urée, les AAs, ou les acides nucléiques sont considérés comme étant dégradables à 100%. Les protéines non dégradables dans le rumen transitent directement vers l'intestin. La dégradabilité des protéines dépend de leurs caractéristiques chimiques (nature des protéines ou traitement par exemple par la chaleur) et leur accessibilité aux microorganismes du rumen. Les protéines non dégradées dans le rumen représentent en moyenne 20% des protéines digestibles dans l'intestin (PDI) (INRA, 2018) et la fraction non dégradable peut représenter jusqu'à 50% (Storm et Ørskov, 1983).

Lorsque l'aliment arrive au rumen, les microorganismes dégradent les protéines et peptides grâce à des protéases et ils utilisent les AAs pour sa propre synthèse protéique cellulaire (Bach et al., 2005). Pour un même aliment, plusieurs facteurs impactent sa dégradation protéique ruminale comme le pH, le taux de passage, l'interaction avec des autres aliments et la population bactérienne liée à l'hôte et au régime (Bach et al., 2005). Les microorganismes du rumen se divisent en microbes qui dégradent les glucides (glucolytiques), les fibres (cellulolytiques), les protéines (protéolytiques) et les acides gras (Wells et Russell, 1996 ; Or-Rashid et al., 2007). Les microbes se divisent aussi en familles, dont la distribution et les proportions dépendent du régime et de l'animal ; chaque famille ayant une préférence pour des ressources azotées différentes (Russell et al., 1992). L'azote de l'ammoniaque est utilisé pour la synthèse de protéines microbiennes (Huber et Kung, 1981) tandis que d'autres bactéries plutôt protéolytiques utilisent directement les peptides et les AAs pour leurs besoins azotés (environ 43% et 62% respectivement ; Ling et Armstead, 1995). L'ammoniaque ruminal peut avoir plusieurs origines ; il peut provenir de la désamination des AA issus de l'hydrolyse des protéines alimentaires, des microorganismes ou des protéines endogènes (Rémond et al., 1996). Il peut aussi provenir de l'hydrolyse de l'urée ruminale, d'origine alimentaire, salivaire ou du transfert d'urée à travers de la paroi ruminale (Lapierre et Lobley, 2001).

Les AAs issus principalement de la dégradation ruminale des protéines aura un devenir dicté notamment par la disponibilité d'énergie (Tamminga, 1996), celle-ci dépendant de la matière organique fermentescible dans le rumen (MOF). Les produits finaux de la MOF sont les acides gras volatils (AGV), les PDI, les gaz et l'ATP (Firkins et al., 2006). Lorsque l'énergie est disponible, les AA seront incorporés dans la cellule, transaminés et utilisés directement pour la synthèse protéique microbienne tandis que si l'énergie est déficitaire, les AA seront incorporés à la cellule, désaminés et leur squelette carboné est fermenté pour l'obtention d'énergie et d'AGV (Tamminga, 1979). De façon similaire, l'ammoniaque ruminal lorsque l'énergie est disponible sous forme d'ATP, peut être incorporé dans les protéines microbiennes par des processus de transamination donnant lieu au glutamate ou à la glutamine à travers les enzymes glutamate synthétase, glutamate déshydrogénase et glutamine synthétase (Pengpeng et Tan, 2013). En absence de suffisamment d'énergie, l'ammoniaque ne sera pas intégrée dans les protéines microbiennes et sera absorbé à travers les parois ruminale ou intestinale (McDonald, 1948).

La balance protéique du rumen (BPR) est la différence entre d'une part, le flux des MAT à l'entrée du rumen et d'autre part le flux de MAT non ammoniacales s'écoulant au duodénum (INRA, 2018). Cette balance protéique représente la proportion des MAT (en g/kg MS) entrées dans le rumen et transformées en protéine microbienne, MAT alimentaires non dégradées dans le rumen, et une fraction des protéines endogènes. La BPR a été déjà utilisée par des autres systèmes comme indicateur de la différence entre la synthèse microbienne permise par les MAT dégradables disponibles dans le rumen et celle permise par l'énergie issue de la MOF (NRC, 2016). Il a été considéré que la synthèse de protéine microbienne est environ 145 g /kg de MOF et cette synthèse protéique des microbes ainsi que la BPR sont affectées par la MSI et par des facteurs alimentaires tel que rapport de la MOF sur les MAT dégradables dans le rumen, la quantité des glucides non structuraux du régime (Clark et al., 1992).

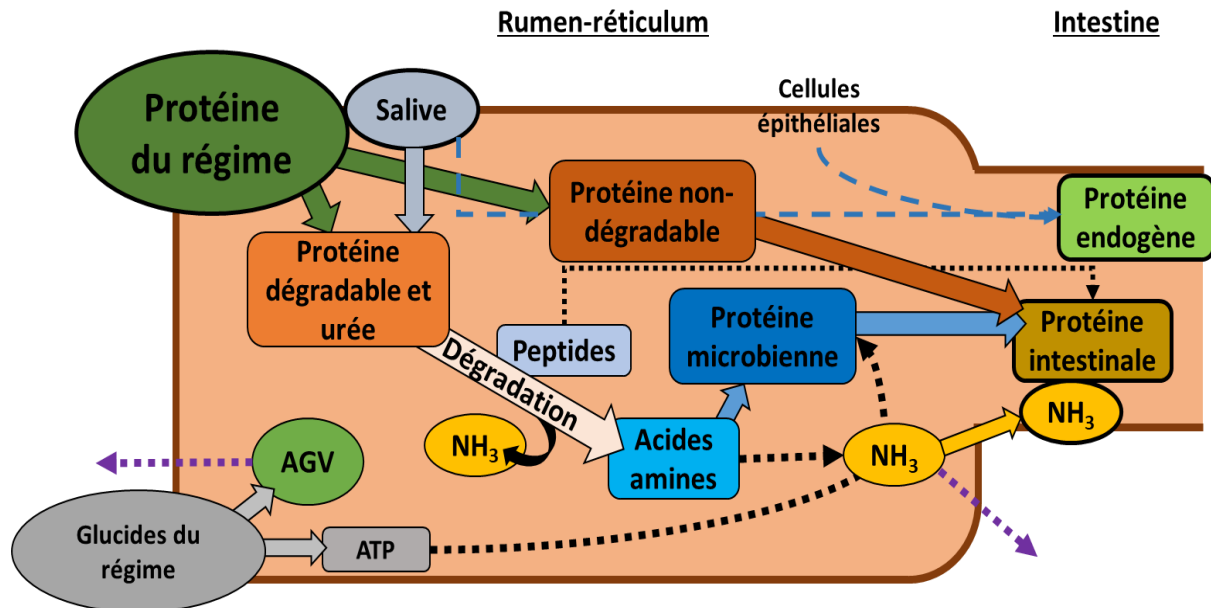


Figure 8 : Principaux flux d'azote dans le rumen.

En résumé, le flux d'azote qui arrive à l'intestin est constitué de quatre fractions protéiques, les protéines alimentaires non dégradables dans le rumen, les protéines microbiennes synthétisées dans le rumen, l'ammoniac et les protéines endogènes (Bach et al., 2005). Les protéines endogènes qui sont difficiles à quantifier et qui proviennent fondamentalement de la salive, des cellules épithéliales desquamées et des enzymes sécrétés, peuvent représenter entre 15 et 30% du flux duodéal chez la vache laitière (Lapierre et al., 2005). Chez les ruminants les principaux facteurs de variation des protéines endogènes qui arrivent à l'intestin sont la MSI et la proportion de cellulose de la ration (Swanson, 1977).

Digestibilité et absorption intestinale des matières azotées

L'intestin est constitué de l'intestin grêle (duodénum, jéjunum, iléon) et du gros intestin (caecum, colon et rectum), qui est le deuxième site de fermentation (notamment le caecum) après le rumen (Dakkak, 1995). Parmi les différentes fractions de protéines qui arrivent à l'intestin (Figure 8), leur contribution varie essentiellement en fonction du niveau d'ingestion et du type de régime, la protéine microbienne est celle qui contribue le plus aux protéines arrivant à l'intestin, en moyenne 66,5% (54,9 à 86,7 % ; Clark et al., 1992). La digestibilité intestinale diffère entre les différentes fractions protéiques. Selon le système d'alimentation des ruminants de l'INRA, la digestibilité réelle des protéines microbiennes est considérée comme étant de 80%, ce qui a été corroboré par des autres travaux (Erasmus et al., 1994), alors que celle des protéines endogènes est de l'ordre de 60-70% chez la vache laitière (Ouellet et al., 2002). Dans l'intestin et plus concrètement dans l'iléon, les protéines endogènes qui proviennent du rumen doivent être ajoutées à celles qui proviennent de l'intestin lui-même, représentées par les cellules épithéliales desquamées et les enzymes digestives (Lapierre et al., 2006). Ainsi, la fraction des protéines endogènes dans l'iléon peut représenter de 32% à 48% de tout le flux d'azote iléal (Van Bruchem et al., 1997).

Selon la nature de la protéine alimentaire non dégradée dans le rumen, la digestibilité peut varier de 55% pour quelques forages secs à 84% pour des forages verts ou certains tourteaux d'oléagineux (INRA, 2018). Similairement, dans une synthèse bibliographique des différentes sources protéiques chez le ruminant, Erasmus et al. (1994) ont évalué la digestibilité intestinale des protéines non-dégradées et ont trouvé des valeurs basses (37-66%) pour les foin et valeurs hautes (> 90%) pour des céréales comme le soja ou le maïs. Donc, l'efficacité ou l'absorption protéique va dépendre de facteurs animaux comme le taux d'ingestion et de facteurs alimentaires comme la quantité et la qualité des fibres et de l'amidon ingéré ainsi que le taux de passage, la MOF et les protéines endogènes, la protéine ingérée, la dégradabilité ruminale et la digestibilité intestinale. Lapierre et al. (2006) ont déclaré que les protéines endogènes ayant une digestibilité intestinale considérablement inférieure à celle de la protéine microbienne ou de la majorité des protéines (non dégradables) des concentrés ou des forages verts, peuvent être une source d'inefficacité non négligeable.

Par conséquent, la quantification des différentes fractions protéiques est primordiale pour déterminer la digestibilité intestinale de la ration (Lapierre et al., 2002). La digestibilité des fractions protéiques détermine la quantité et le profil des AA qui sont absorbés au travers de l'épithélium digestif et drainés par la circulation sanguine en veine mésentérique puis en veine porte et elle est calculée comme la différence entre le flux duodénal et le flux iléal d'AA (Lapierre et al., 2006). En raison des difficultés rencontrées pour maintenir une canula iléale fonctionnelle, les données de digestibilité intestinale sont limitées et cette dernière est fréquemment déterminée d'après la différence entre les flux duodénaux et fécaux des AA (Harmon et Richards, 1997). Toutefois, les protéines que passent vers le gros intestin sont aussi métabolisées par les microbes du caecum et dans ce site anatomique, la perte en AA est plus importante que le gain net, ce qui peut conduire à surestimer la digestibilité intestinale des AA (Berthiaume et al., 2001).

Une fois la protéine (quelle que soit son origine) arrivée à l'intestin elle se dégrade en peptides et AA par l'action des enzymes digestives (peptidases) de l'abomasum (Tamminga, 1979). Les AA qui désormais sont dans le lumen intestinal doivent traverser la paroi de l'iléon, principalement par transport simple ou facilité par les canaux sodium ATP dépendants (Tauqir, 2016). Les tissus drainés par la veine porte (TDVP) utilisent une partie des AA (catabolisme des AA et accréation protéique). En moyenne le prélèvement net des AA par le TDVP représentent entre 38% (Thréonine) jusque 76% (Phénylalanine) du flux total corporelle des AA, étant légèrement plus bas, entre 25 et 32%, pour le cas de l'histidine (MacRae et al., 1997 ; Berthiaume et al., 2001). Les AA digérés et absorbés dans l'intestin sont donc en partie prélevés par les TDVP et utilisés pour ses propres fins métaboliques. Ces tissus reçoivent aussi néanmoins des AA d'origine artérielle, ce qui représente environ 80% du flux des AA totaux utilisés par les TDVP (MacRae et al., 1997). Chez un animal à l'entretien, la masse du tube digestif reste constante, donc l'utilisation (synthèse et catabolisme) des AA par le TDVP est considérée comme étant associée aux fonctions d'entretien. Les TDVP ont un taux métabolique plus élevé que les muscles squelettiques et ils contribuent de manière significative (26%) à la synthèse protéique totale de l'animal alors qu'ils ne représentent que 4 à 8% de toute la masse corporelle (Lobley et al., 1980). Ainsi, l'utilisation des AA par le tube digestif entraîne une perte nette d'AA mais aussi une modification du profil des AA apparaissant en veine porte.

Il n'est pas encore totalement clair si le prélèvement des AA par les TDVP est obligatoire ou est régulé. Certains AA comme la méthionine et la lysine sont obligatoirement prélevés pour les sécrétions endogènes (Lapierre et al., 2006). De plus, ces AA peuvent servir comme source d'énergie pour les cellules épithéliales de l'intestin en produisant du glutamate, comme dans le cas de la lysine (Windmueller et Spaeth, 1980).

Tableau 3 : Flux des AAs essentiels (g/j) dans les différentes parties de l'intestin grêle chez les vaches laitières (adapté de Lapierre et al., 2006)

Lieu	His	Ile	Leu	Lys	Met	Phe	Thr	Val
Duodénum	53	120	189	144	55	111	109	133
Duodénum (endogène)	15	19	20	30	6	19	27	25
Duodénum net	39	101	169	114	49	92	82	108
Iléon	24	38	61	37	19	42	44	55
Iléon (endogène)	7	11	14	16	4	15	18	15
Iléon net	22	73	122	93	35	65	56	68
Absorption portale	22	51	80	60	24	53	28	40
Apparition portale/duodénale	0,42	0,43	0,42	0,42	0,44	0,48	0,26	0,30

Finalement, l'ammoniaque qui arrive en veine porte suite à son absorption essentiellement ruminale contribue relativement peu à l'absorption nette d'azote intestinal comparé aux AA chez le bovin (Lapierre et Lobley, 2001). Cette ammoniaque sera absorbée en quasi-totalité par l'intestin. Il représente 24,5% de tout l'azote ingéré (Huntington, 1982) et entre 20 et 41% de tout l'azote absorbé en veine porte (Parker et al., 1995). L'ammoniaque sera ensuite véhiculée par la veine porte jusqu'au foie où il sera métabolisé (Tan and Murphy, 2004).

Métabolisme hépatique des composés azotés

Le foie est l'organe plus vascularisé de l'organisme (Lobley et al., 2000) et reçoit en premier les nutriments alimentaires absorbés et drainés par la veine porte pour leur utilisation (Reynolds, 1995). Parmi les fonctions du foie on peut citer le métabolisme des sucres (synthèse de glucose et dégradation du glycogène), métabolisme des lipides (synthèse et dégradation de cholestérol, production de triglycérides), métabolisme de détoxification (dégradation des hormones, hémoglobine et substances toxiques), synthèse de la bile et le métabolisme des composés azotés (White, 2020). Dans cette synthèse bibliographique et en lien avec le sujet de thèse un focus particulier sera fait sur le métabolisme hépatique des composés azotés, étant donné son rôle régulateur sur la biodisponibilité en AAs pour les tissus périphériques productifs. En lien avec le métabolisme azoté une des fonctions clés du foie est celle d'assurer l'uréogénèse, mécanisme essentiel pour éliminer de la circulation l'ammoniaque. L'ammoniaque est toxique pour le système nerveux (Lobley et al., 1995), il vient soit de l'apport alimentaire par la veine porte ou soit de la déamination des AAs (glutamine, glycine, lysine, asparagine et histidine) et une fois arrivé au foie, il est transformé en urée (Lobley et Milano, 1997). Une autre fonction hépatique importante est celle du catabolisme des AAs en excès ainsi que d'une contribution à la synthèse des protéines plasmatiques (dont l'albumine et le fibrinogène) ayant un rôle important dans le transport des nutriments, les fonctions immunitaires ou la coagulation sanguine (McBride et Kelly, 1990).

En plus du flux de nutriments apportés via la veine porte (Reynolds et al., 1988), le foie est aussi alimenté par un flux artériel (artère hépatique) qui fournit des nutriments provenant du métabolisme endogène ou de l'alimentation après avoir déjà transité par la circulation périphérique. Le prélèvement hépatique nette en AAs est en moyen d'environ 45% de l'apparition nette portale (Lapierre et al., 2005), ce qui équivaut à une bonne partie des AA absorbés mais une fraction importante reste disponible pour le reste des tissus périphériques (Lapierre et al., 2002 ; Raggio et al., 2007). Cependant, il a

été observé plus récemment que ce pourcentage est beaucoup plus faible pour certains AAs (20-32% de l'apparition nette portale, Tagari et al., 2008). En conséquence, le profil des AAs qui arrivent et qui sortent du foie est certainement différent. Certains AAs sont utilisés (catabolisme pour l'obtention d'énergie ou synthèse des protéines constitutives) par le foie comme l'alanine, l'asparagine, la glycine et la serine, et des autres présentent une émission nette, comme l'aspartate, l'ornithine et le glutamate, qui est spécialement utilisé pour des échanges d'azote avec d'autres tissus (Hanigan, 2005). De façon similaire aux TDVP, le taux métabolique et la synthèse protéique hépatiques sont d'environ 5 fois plus élevés que ceux du muscle (Lobley et al., 1980). Ces valeurs se rapportent à la synthèse des protéines hépatiques totales, qui incluent les protéines constitutives, qui représentent environ 75% (France et al., 1999) et les protéines d'exportation comme l'albumine, qui représentent environ 17% de la synthèse protéique totale dans le foie (O'Connell et al., 1997). Cependant, tous les AAs ne sont pas prélevés par le foie de la même manière. Les études disponibles de prélèvement hépatique des AAs ont étudié l'effet soit du repas, soit d'une infusion d'AAs, souvent marqués. Parmi les AAs essentiels, le prélèvement hépatique le plus important est observé pour la méthionine, et la phénylalanine qui peuvent être prélevés jusqu'à 70% (Hanigan et al., 2004). Par contre, les AAs ramifiés ne sont quasiment pas prélevés par le foie (1-2%) et sont plutôt métabolisés dans les tissus périphériques (Blouin et al., 2002). Chez le ruminant il existe aussi une utilisation importante de certains AAs (serine, glycine, thréonine, histidine et méthionine) pour la synthèse des groupes méthyle dans le foie, tandis que l'utilisation des AAs pour la gluconéogenèse est plus limitée que dans des autres espèces (Lindsay et Reynolds 2005).

Ces AAs prélevés par le foie ne sont pas utilisés que pour la synthèse protéique, mais aussi pour la néoglucogénèse. Le foie représente le principal producteur de glucose du corps (85%) chez le ruminant (Lobley et Milano, 1997). Le principal précurseur hépatique du glucose est le propionate, un AGV provenant des fermentations ruminales des aliments qui contribue pour 30 à 70% à la production totale de glucose (Huntington et al., 2006; Loncke et al., 2020). Cependant, dans certaines conditions physiologiques ou nutritionnelles (ex : manque d'énergie ou des animaux à jeun) le propionate n'est plus le principal précurseur du glucose ; les AAs (corporelles ou alimentaires) comme l'alanine, la glutamine, le glutamate et la glycine peuvent fortement contribuer (2-40%) à la synthèse hépatique de glucose grâce à leur squelette carboné (Danfær et al., 1995).

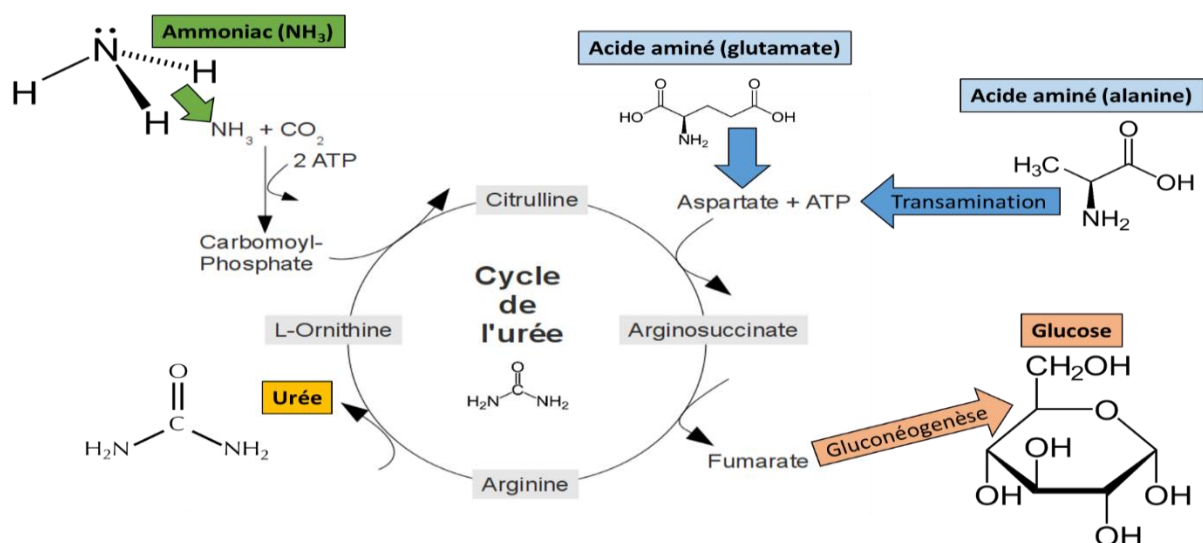


Figure 9 : Principales réactions enzymatiques du métabolisme protéique dans le foie, transamination, rentrée de l'ammoniaque et du glutamate dans le cycle de l'urée, production d'urée (uréogénèse) et de glucose avec les chaînes carbonées des acides aminés (gluconéogenèse). Source de l'image : https://fr.wikipedia.org/wiki/Cycle_de_l%27ur%C3%A9e.

La gluconéogenèse hépatique à partir des AA s'accompagne d'une désamination des AA avec perte du groupe amine (NH_2) qui sera ensuite utilisé dans la voie de l'uréogénèse (Lobley et Milano, 1997). Comme il peut être observé dans la Figure 9, théoriquement il faut un AA catabolisé pour une molécule d'ammoniaque (un seul azote) détoxifiée lors de la synthèse d'urée (deux azotes) (Reynolds et al., 1991). Cependant, les études qui défendent cette théorie ont été conduites avec des ruminants nourris à base de fourrages. Lorsque des régimes plus énergétiques sont utilisés, la contribution des AAs à la formation d'urée peut être plus basse, d'entre 20-40 % et non 50% (Burrin et al., 1990 ; Reynolds et al., 1991). De plus, d'autres études suggèrent que l'azote des AAs comme l'aspartate peut lui-même provenir de l'ammoniaque (Luo et al., 1995). La capacité du foie à prélever l'ammoniaque véhiculé via la veine porte et le transformer en urée est de 1,2-1,5 $\mu\text{mol} / \text{min} / \text{g}$ et la contribution de cette ammoniaque absorbée à la quantité finale d'urée hépatique est compris entre 27 et 110% (Loncke et al., 2020), notamment en fonction de la qualité des protéine alimentaire (ex : vaches en pâturage exposées à des quantités élevées d'ammoniaque) et de la concentration plasmatique d'urée (Symonds et al., 1981).

Métabolisme protéique des tissus périphériques

Le flux des AAs qui arrive au niveau des tissus périphériques comprennent les AA alimentaires qui n'ont pas été métabolisés par les tissus splanchniques, les AAs non essentiels synthétisés par le foie (synthèse de novo) et les AAs endogènes qui proviennent des protéines dégradées (Figure 10). En effet, les AA disponibles pour la synthèse protéique dans les tissus excèdent 2 à 3 fois la quantité d'AAs ingérés (Reeds et Lobley, 1980) du fait de la forte contribution des AAs endogènes au flux d'AA disponibles aux tissus. Estimer la contribution des AAs de chaque origine (alimentaire vs endogène) à la synthèse protéique tissulaire est compliqué et dépend de plusieurs facteurs liés au régime et à l'animal.

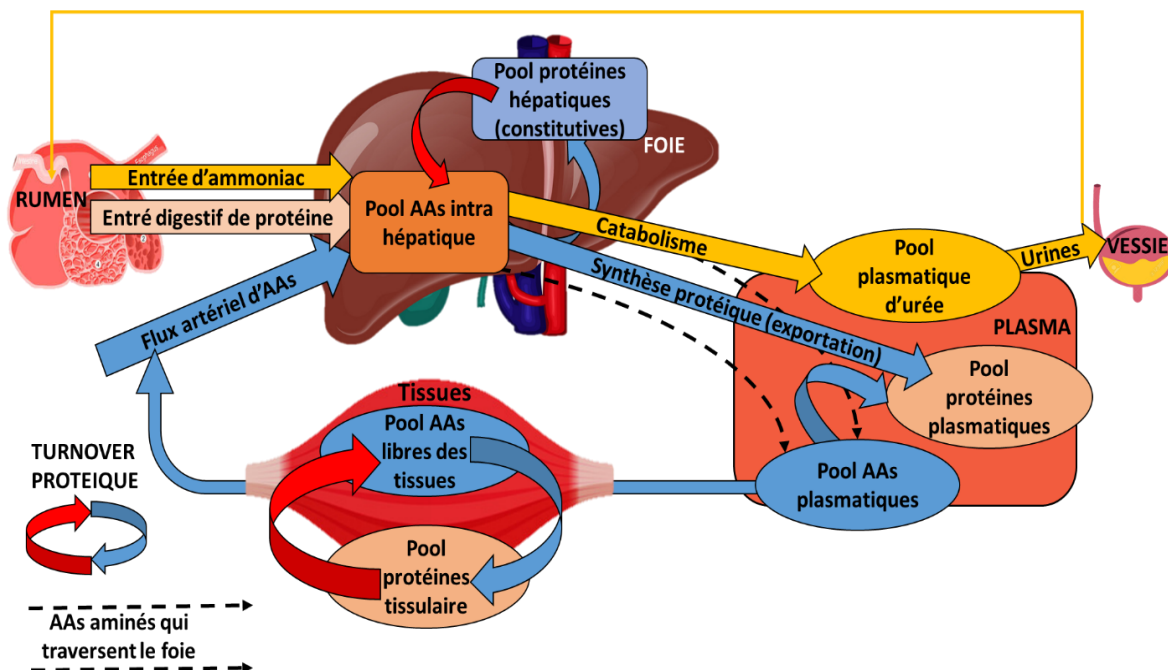


Figure 10 : Principaux flux de protéine et acides aminés arrivant au foie, devenir hépatique de ces acides aminés et transport des acides aminés dans le plasma et leur métabolisme dans les tissus périphériques.

Une étude réalisée chez l'homme détermine que lorsque l'insulinémie est élevée, en situation post-prandiale, la contribution des AAs alimentaire à la synthèse protéique est de 90% tandis que quand l'insulinémie est faible la contribution des AAs alimentaire à la synthèse protéique musculaire est de 40% (Volpi et al., 1996). Le prélèvement des AAs par les tissus périphériques est associé d'une part à la disponibilité et la concentration des AAs dans plasma et dans les tissus périphériques (ou dans le plasma), qui dépend de l'alimentation, du prélèvement des AAs par les tissus splanchniques et des besoins d'énergie de l'animal (AAs ramifiés dans le cas du muscle squelettique et d'autre part de l'utilisation ou du besoin en AAs par ces tissus (Lobley, 1992).

Les tissus périphériques prélèvent et utilisent les AA pour la synthèse protéique, celle-ci permettant à la fois une accréation ou un gain protéique du tissu lui-même (croissance) et une resynthèse des protéines constitutives préalablement dégradées dans les processus de renouvellement ou turnover protéique (Harris et Lobley, 1991). L'utilisation de l'hormone de croissance (GH) favorise le prélèvement des AA par le tissu musculaire et par conséquent l'accréation protéique (Etherton et Bauman, 1998).

Etant donné que le principal site de catabolisme des AAs est le foie puis les TDVP, le prélèvement total ou unidirectionnel de la plupart des AAs par les tissus périphériques, et notamment le muscle, se traduit quasiment complètement en une utilisation pour la synthèse protéique (Boisclair et al., 1993). Les AAs ramifiés (isoleucine, valine et leucine) sont l'exception car ils peuvent être catabolisés dans le muscle (Teleni, 1993), avec une mention spéciale pour la leucine qui est un signal puissant favorisant la synthèse protéique (Lobley et al., 1980). Les AAs ramifiés peuvent être aussi catabolisés dans les tissus adipeux sous-cutanés comme récemment démontré chez la vache laitière (Webb et al., 2020).

Tableau 4 : Profil en acides aminés du muscle squelettique chez le bovin viande ; adapté de Vopálenský et al., (2017).

Acides aminés	Pourcentage du muscle (% par tissu sèche)
Thr	4,60
Val	5,10
Met	2,40
Ile	4,80
Leu	8,20
Phe	4,10
His	3,20
Lys	9,80
Arg	8,00
Asp	9,30
Glu	14,40

Le muscle squelettique représente le pool majeur de protéines corporelles, il a une composition en AA proche de celle des AA du corps entier (Harris et Lobley, 1991), à la différence d'autres tissus, comme la peau ou la laine, qui ont des profils en AA particuliers notamment riches en AA soufrés. Si le profil en AA des protéines microbiennes est comparé à celui des tissus, en supposant que les protéines microbiennes représentent 100% des PDI, le seul AA limitant pour la croissance musculaire est l'histidine tandis que les AA limitants pour la peau ou la laine sont la méthionine ou la cystéine (Storm et al., 1983). Un déséquilibre dans le profil des AA peut être à l'origine d'une utilisation de l'azote alimentaire moins efficace et donc, d'un gain protéique moins important (Storm et Orskov, 1984).

Le Tableau 4 montre le profil moyen en AA du muscle mesuré sur 8 races bovines à viande (Vopálenský et al., 2017). Il peut être observé que la glutamate (Glu) est très important dans le muscle parce qu'il participe au cycle glucose-alanine, et contribue à l'excrétion d'azote dans le pool musculaire en donnant le groupe N-aminé des AAs catabolisés à l'alanine, qui l'apportera au foie pour le transformer en pyruvate et glucose, qui sera de nouveau transporté au muscle pour l'apporter de l'énergie (Felig, 1973). L'azote des AAs ramifiés catabolisés dans le muscle ou d'autres composés d'azote-non-protéique peut être transformé en glutamate à travers l'alanine transférase (ALAT). Le glutamate est transformé en alanine, qui est transporté par voie sanguine jusqu'au foie où il est transformé par l'ALAT en glucose, qui sera de nouveau transporté au muscle squelettique comme source énergétique (Odessey et al., 1974). Cependant, le catabolisme des AAs ramifiés dans le muscle de ruminants est plus limité que celui d'autres espèces et il a été suggéré que le catabolisme de ces AAs ramifiés, spécialement la leucine, est négativement corrélé à la synthèse protéique (Lindsay, 1983).

Métabolisme azoté intracellulaire : synthèse et dégradation protéique

Dans cette partie, les principales voies de la synthèse et dégradation protéique au niveau intracellulaire seront décrites. Dans les cellules, la synthèse protéique à partir des AA sert aux fonctions des organelles et à leur croissance. Dans le sang, les AAs qui ne circulent pas librement sont transportés principalement par les érythrocytes, notamment l'alanine (Felig et al., 1973). L'entrée d'AA dans le pool intracellulaire dépend de plusieurs facteurs (Figure 11), le premier étant la concentration en AA du pool intracellulaire, qui dépend lui-même de l'alimentation, de l'état physiologique de l'animal (ex : croissance, maladie) et de l'utilisation des AA par les autres tissus comme les TDVP et le foie (Loneragan et al., 2010). La concentration en AAs du pool intracellulaire dépend aussi de l'activité et la disponibilité des transporteurs présents au niveau de la membrane cellulaire, qui sont chargés de l'entrée des AA dans la cellule. Ces transporteurs dépendent du gradient d'action de la membrane cellulaire. Finalement la concentration en AAs dans la cellule dépend de l'utilisation de ces AAs et des besoins cellulaires pour la synthèse de protéines (Souba et Pacitti, 1992).

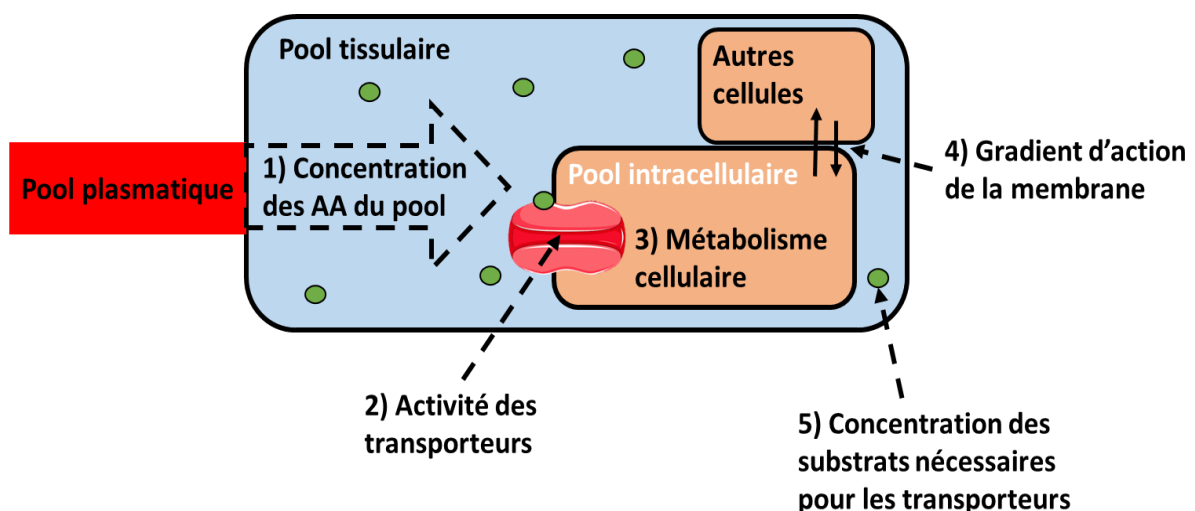


Figure 11 : Principales voies d'entrée des AAs dans le pool intracellulaire. 1) La concentration plasmatique du pool tissulaire, 2) l'activité des transporteurs qui font le transport active des AAs, 3) Le métabolisme et besoins cellulaires en AAs, 4 le gradient d'action de la membrane et la communication avec d'autres cellules adjacents et 5) la concentration des substrats nécessaires pour les transporteurs des AAs.

Dans la cellule, il existe une synthèse et une dégradation continues des organites (turnover du pool intracellulaire) qui sont associées à l'activité de la cellule elle-même (ex : cellule musculaire vs cellule nerveuse), à la durée de vie moyenne des protéines et des organites et aux régulations internes associées à l'énergie disponible (Rechcigl, 1971). Les besoins cellulaires en AAs sont déterminés par les fonctions cellulaires (Eagle, 1955). Dans le cas des besoins pour la croissance, si la concentration intracellulaire en certains AA impliqués dans cette fonction (ex : lysine) n'est pas suffisante, la synthèse de protéines peut être diminuée ou inhibée ou les transporteurs membranaires spécifiques des AA peuvent être activés pour augmenter la concentration de l'AA limitant (Mann et al., 2003). La Figure 12 résume l'ensemble des mécanismes physiologiques de synthèse et dégradation protéique intracellulaires.

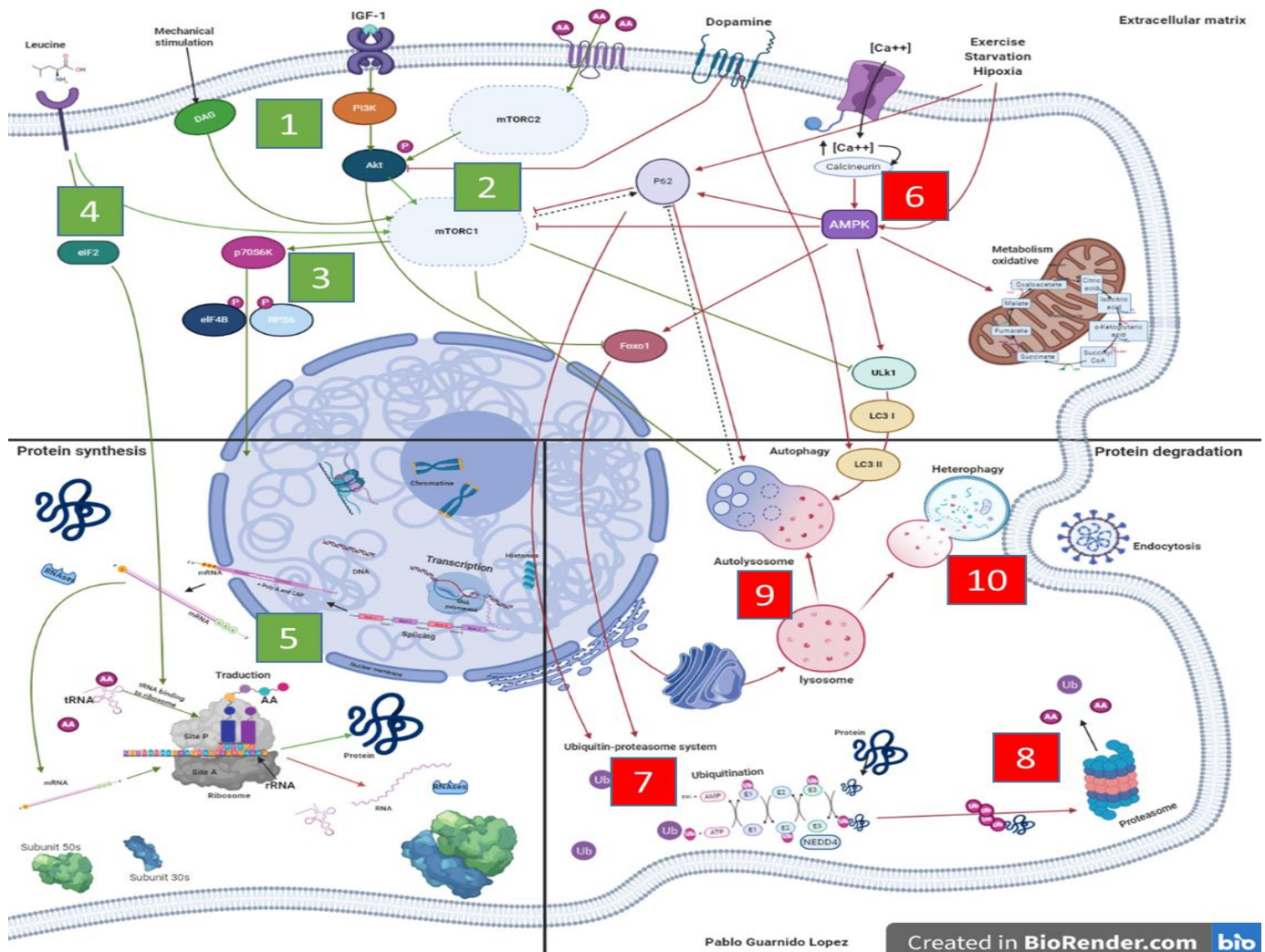


Figure 12 : Mécanismes en jeu lors de la synthèse et de la dégradation protéique à l'intérieur de la cellule. 1) signalisation et activation de la protéine AKT par l'insuline, 2) complexe mTOR, principal régulateur de la synthèse protéique, 3) activation de la protéine SK6 par mTOR et initialisation de la traduction de l'ARN messager (ARNm), 4) facteur reliant l'ARNm au ribosome nécessaire pour initier la transcription, 5) transcription de la protéine (synthèse de la protéine), 6) système AMP, principal système régulateur de l'énergie intracellulaire et qui donne de l'ATP à mTOR pour la synthèse ou dirige les acides aminés vers la dégradation lorsque l'énergie manque, 7) système d'activation de l'ubiquitine avec le substrat Foxo1, qui dépend de l'activation d'AMP pour marquer les protéines à dégrader avec l'ubiquitine, 8) entrée d'un substrat (protéine) marqué par l'ubiquitine dans le protéasome (dégradation protéique), 9) lysosome qui participe à la dégradation des protéines intracellulaires et 10) endocytose permettant de dégrader les molécules extracellulaires au sein du lysosome. Image créée par app.biorender.com

Facteurs de régulation de la synthèse et de la dégradation protéique

La synthèse protéique intracellulaire est régulée par un système complexe de facteurs stimulateurs et inhibiteurs qui entrent en compétition pour augmenter ou diminuer la transcription de l'ARNm en fonction des besoins cellulaires. Parmi les facteurs stimulateurs, mTOR a été proposé comme le principal régulateur de la synthèse protéique intracellulaire (Carbone et al., 2016). Le mTor présente deux complexes (mTORC1 et mTORC2) et il a besoin d'énergie pour déclencher la synthèse protéique. Lorsque l'énergie est disponible (ATP fourni principalement par le système énergétique adénosine mono-phosphate cyclique ou AMPK), le premier complexe (mTORC1) initie la synthèse protéique via l'activation de la protéine S6K, qui commencera la transcription de l'ARNm (Tavares et al., 2015). L'apport d'énergie et d'insuline avec les AAs est le principal facteur qui stimule la synthèse protéique intracellulaire. Les AAs du pool intracellulaire seront utilisés pour la synthèse de protéines corporelles, certains AAs comme la Leu ayant aussi un rôle essentiel dans l'activation de mTor (Pasiakos et McClung, 2011). L'entrée d'énergie dans la cellule est facilitée par des hormones comme l'insuline ou les facteurs de croissance (GH, IGF-1). L'insuline active une protéine (AKt) qui stimule à son tour le complexe mTORC1 et par conséquent la synthèse protéique (Ceseña et al., 2007). La transcription de l'ARNm commence avec le facteur eIF2 qui forme le complexe entre le l'ARNm et le ribosome, puis l'ARNt (ARN transférente) prendra les AAs complémentaires à la chaîne de l'ARNm jusqu'à former une protéine complète (Carbone et al., 2016). En résumé, ils existent deux manières principales d'activer la synthèse protéique dans la cellule, la première fait appel au glucose et à l'insuline pour l'activation de la voie de la AKt puis de mTor, la deuxième fait appel aux AAs ramifiés, notamment la leucine qui active mTor directement. La quantité d'énergie joue aussi un rôle important grâce aux interrelations entre AMPK et mTor.

La dégradation protéique intracellulaire ou protéolyse a un rôle clé dans les cellules des mammifères car elle permet d'éliminer les protéines anormales ou défectueuses en évitant leur accumulation tout en fournissant les AAs lorsqu'il y en a besoin (Combaret et al., 2016). Les protéines défectueuses sont elles-mêmes dégradées par les organelles ou marquées dans un processus connu comme la règle du N-finale car l'accumulation des résidus N-terminales rend insoutenable son activité principale (El-deeb et Fahlman, 2016). Bien qu'il existe au moins 5 systèmes protéolytiques différents, les plus importants sont : 1) le système ubiquitine-protéasome, principal système de dégradation de protéines intracellulaires et 2) l'autophagie, processus de dégradation intra ou extracellulaire qui représente le processus de dégradation le plus important chez les mammifères (Combaret et al., 2016). La voie de dégradation par le système ubiquitine-protéasome présente deux étapes différentes. La première, c'est la dégradation du lien covalent entre l'ubiquitine et le substrat à dégrader par les enzymes. L'ubiquitine est d'abord activée par l'enzyme E1, qui transfère une ubiquitine chargée d'énergie vers l'enzyme E2 et finalement cette ubiquitine est prise par l'enzyme E3 ligase, qui va se joindre au substrat et l'amener au protéasome (Metzger et al., 2012). Ce protéasome est chargé de dégrader la protéine en AAs, qui pourront ensuite être utilisés à nouveau pour la resynthèse parce qu'ils restent à l'intérieur de la cellule (Tomko et Hochstrasser, 2013). L'autophagie consiste quant à elle en des membranes ou vésicules (lysosomes) qui contiennent des concentrations très hautes en acides et hydrolases (glycosides, lipases, nucléases et phosphatases) capables de dégrader différentes molécules (Kirschke et al., 1979). Ces lysosomes peuvent aussi hydrolyser des molécules qui sont dans le milieu extracellulaire, lorsque la cellule inclue ces molécules par endocytose, pinocytose ou phagocytose.

De plus, le lysosome peut digérer des molécules ou organites entiers comme les mitochondries ou le noyau (Roberts, 2005). Dans le pool cellulaire, la synthèse et la dégradation protéiques s'effectuent de manière continue et coordonnée. Bien que cette coordination ne soit pas tout à fait bien comprise actuellement, une communication directe entre le ribosome, comme centre de synthèse protéique, et le protéasome, comme le centre de dégradation protéique intracellulaire a été suggérée (Waterlow, 2006b). Cette coordination semble être possible grâce aux rôles d'activation ou d'inhibition de la synthèse ou de la dégradation protéique associées à la concentration en AAs (Figure 13) et en certaines hormones comme l'insuline en lien avec l'énergie qui peuvent activer ou inhiber la synthèse protéique. De plus, l'insuline joue un rôle clé en synergie avec les AAs en activant la transcription de l'ARNm (Moule et al., 1997).

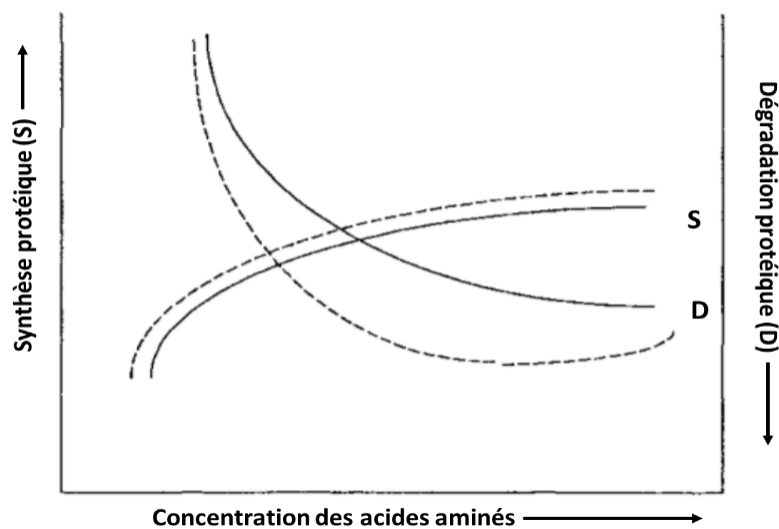


Figure 13 : Interaction entre la synthèse et dégradation protéique par rapport à la concentration des acides aminés dans le pool intracellulaire. La ligne pointillée représente l'effet complémentaire de l'insuline. Adapté de Waterlow (2006b).

Pour maintenir l'homéostasie et une fonction correcte dans la cellule, lorsqu'une protéine est dégradée, les AAs résultants de sa dégradation retournent au pool intracellulaire et la cellule procèdera à la resynthèse de la protéine dégradée (Waterlow, 2006b). Cependant, la totalité des AAs de la protéine dégradée ne peut pas être utilisée pour la resynthèse (Nath et Koch, 1970) et le pool d'AAs tissulaires requiert un flux continu artériel d'entrée de nouveaux AAs.

Turnover protéique

Le terme turnover ou taux de renouvellement protéique a été utilisé pour définir l'état dynamique des protéines corporelles, permettant le remplacement des protéines synthétisées âgées par de nouvelles protéines ainsi que l'échange d'azote entre les différents compartiments corporels (Schoenheimer, 1942). Le turnover protéique fait référence aux interconversions entre différents compartiments (pools) de protéines et d'AAs corporels dans les deux sens à travers la synthèse et la dégradation protéiques (Waterlow, 1984). La notion de compartiment fait référence à un matériel qui est séparable anatomiquement ou fonctionnellement des autres compartiments (ex : compartiment digestif ou hépatique), et dans chaque compartiment ils existent plusieurs pools qui se définissent par leur contenu qui doit être homogène intra-pool (protéines ou AAs du foie) (Waterlow, 2006a). Dans le corps, il existe des échanges entre pools au sein d'un même tissu (ex : pool des AAs du muscle et pool des protéines du muscle) et entre les différents pools corporels (ex : entre le digestif et le périphérique) de manière continue. Plusieurs auteurs ont essayé de modéliser les différents flux et échanges entre pools pour étudier le turnover protéique de tout le corps (Waghorn Et Baldwin, 1984 ; Baldwin et al., 1987 ; Gill et al., 1989b ; Freetly et al., 1993 ; Hanigan et Baldwin, 1994 ; Gerrits et al., 1996). Dans cette thèse, en me basant sur la littérature et les modèles publiés, révisés par Hanigan et al., (1997) et Hanigan et al., (1998), j'ai construit mon propre modèle conceptuel (Figure 14).

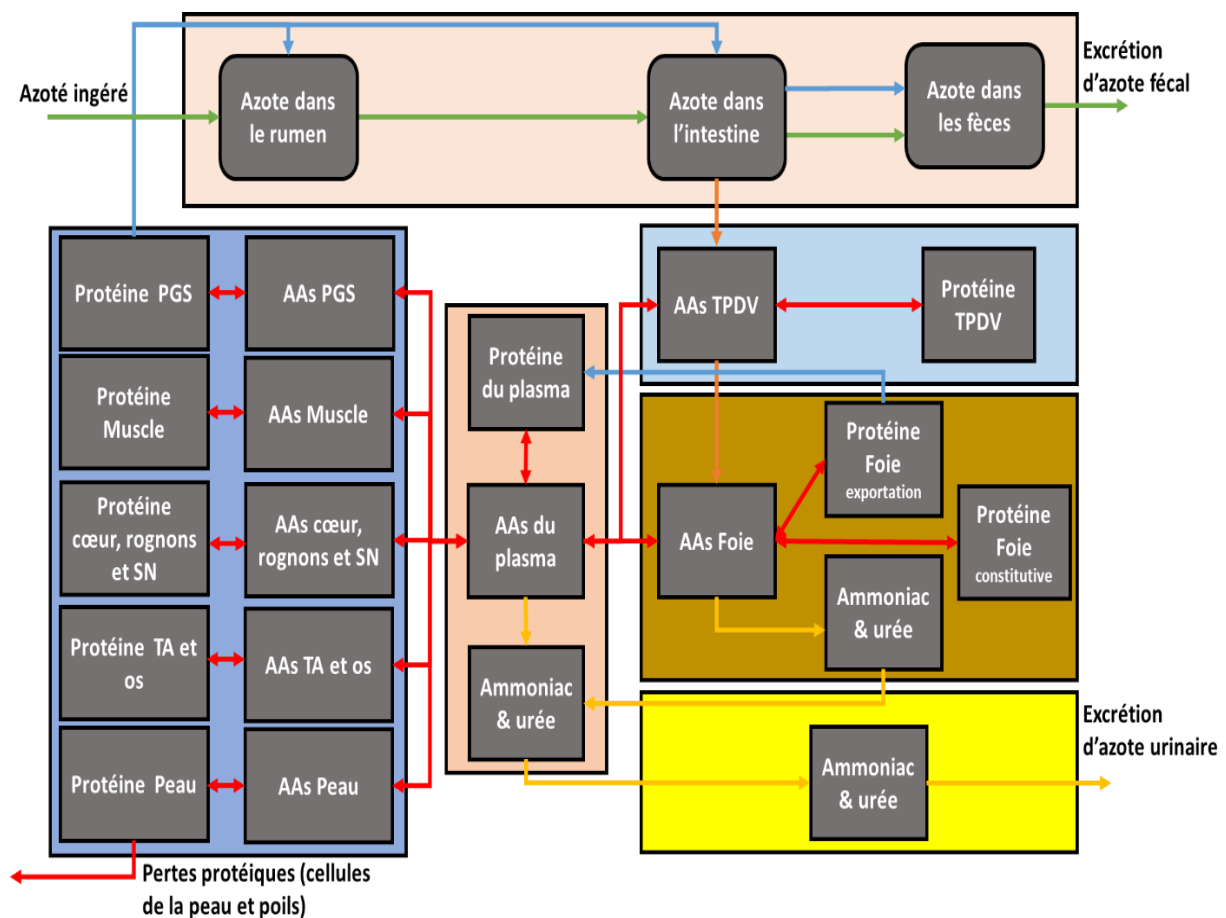


Figure 14 : Schéma graphique des flux d'azote du turnover protéique dans le bovin viande. Abréviations ; PGS : pancréas et glandules salivaires, TDVP : tissus drainés par la veine porte, SN : système nerveux, TA : tissu adipeux.

La représentation graphique de la Figure 14 montre que le pool des AAs plasmatique (pool systémique dans certains travaux) est central à l'échange d'azote entre tissus et organes. Ainsi le flux hépatique et la partition entre l'anabolisme et catabolisme sont fortement influencés par les demandes des tissus périphériques, et situent le foie comme un organe qui répond aux demandes périphériques et qui n'agit pas comme un organe actif (Reynolds, 2006).

D'un point de vue biologique, le turnover protéique semble plus lié à la notion de dégradation protéique car les protéines marquées comme défectueuses (ex : mauvais repliement protéique, défauts fonctionnels, demi-vie utile de la protéine proche à la fin) et postérieurement dégradées seront remplacées grâce aux mécanismes de synthèse (Hawkins, 1991). Il s'agit du renouvellement des protéines. Par conséquent, chez les animaux en croissance, le turnover protéique équivaut (en proportion de masse renouvelé par unité de temps) à la synthèse protéique qui ne génère pas de gain de protéines et dont le taux est donc égal au taux de dégradation protéique (Cantalapiedra-Hijar et al., 2019). Chez des animaux adultes à l'entretien le turnover protéique sera égal à la synthèse (ou dégradation) protéique lorsqu'il n'existe pas un gain de protéines. Chez les animaux en croissance, la synthèse protéique est supérieure à la dégradation protéique ce qui permet d'accroître le pool des protéines corporelles. En plus du renouvellement des protéines, le turnover protéique a d'autres fonctions comme celle de l'adaptation et de la régulation métabolique aux facteurs extérieurs comme l'adaptation aux changements de température à travers des mouvements musculaires, ou l'adaptation aux situations de jeûne où le métabolisme doit maintenir les organes vitaux intacts (Obled et al., 2002) et des facteurs internes comme la mobilisation des protéines ou des AAs suite à une infection ou une blessure (Waterlow et al., 1978). Les facteurs internes comprennent aussi la croissance, le développement du tissu reproducteur (spécialement chez les femelles), ou les transformations corporelles de l'animal avec l'âge conduisant à des changements de la masse musculaire ou osseuse (Klasing et Calvert, 1999).

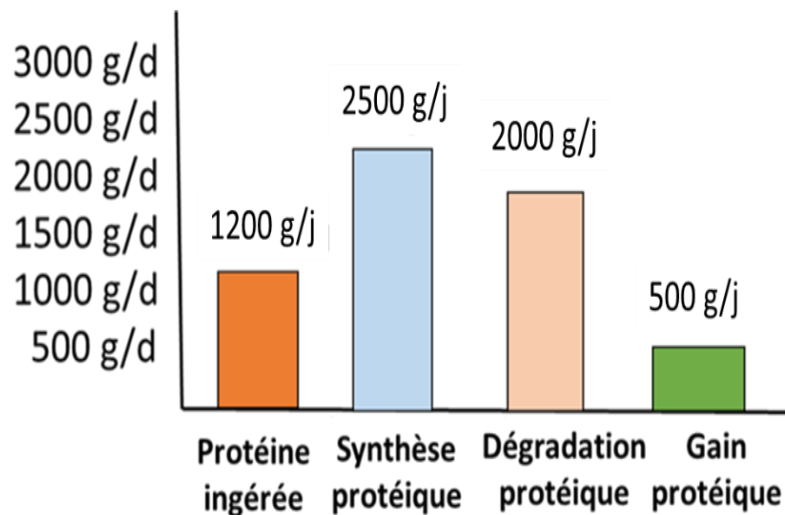


Figure 15 : Schéma illustrant la quantité des protéines synthétisées et dégradées par rapport aux protéines ingérées et retenues chez un bovin en engraissement de référence, chiffres adaptés de Lobley, (2003).

En résumé, le turnover protéique sera défini dans cette thèse comme le taux de renouvellement continu des protéines par la synthèse et la dégradation, qui n'entraîne pas de changement de masse protéique. La synthèse ou dégradation protéiques peuvent être définis par la quantité totale de protéines synthéti-

sées ou dégradées par unité de temps ou comme un taux fractionnel, qui exprime la quantité de protéine synthétisée ou dégradée par quantité de protéine tissulaire (ex. g protéine synthétisée par g de protéine musculaire).

La synthèse protéique totale d'un animal par jour excède la quantité totale de protéines ingérées, ce qui implique une contribution de 60% des protéines/AAs endogènes (corporels) à la synthèse protéique totale chez le bovin en engraissement (Lobley, 1998). Comme défini précédemment, la différence entre la quantité de protéines synthétisées et la quantité de protéines dégradées correspond à la rétention protéique, représenté par le taux d'accrétion protéique (Figure 15). Dans le cas du bovin viande, ce taux d'accrétion protéique est beaucoup plus faible que la quantité de protéines ingérées [6% (Lobley et al., 1980)] en comparaison à autres espèces comme la vache laitière [33% (Lapierre et al., 2002)].

Comme expliqué dans la partie précédente, chaque tissu et chaque cellule a des besoins spécifiques en AAs pour leurs fonctions vitales ou leur croissance et aura donc un turnover protéique différent. Cependant, ils existent deux autres facteurs qui peuvent moduler le turnover protéique des tissus, les nutriments ingérés et la composition corporelle.

Les nutriments ingérés comme facteur de régulation du turnover protéique

Comme décrit dans la dernière partie, la quantité de protéines synthétisées et dégradées excèdent largement la quantité de protéines ingérées. Néanmoins c'est à travers de l'ingestion que les animaux reçoivent des nouveaux apports en nutriments. Comme décrit dans le Tableau 5, l'apport de nutriments impacte significativement le taux du turnover protéique soit directement, soit indirectement via des hormones variant avec l'alimentation comme l'insuline (Reeds et Fuller, 1983).

Tableau 5 : Régulation de la synthèse ou dégradation protéique par l'apport d'énergie ou protéine.

	Synthèse protéique	Dégradation protéique
Energie ingérée	↑↑	↓
Protéine ingérée	↑↑	↑

L'apport d'énergie, et plus particulièrement de nutriments glucogéniques comme le glucose ou le propionate, augmente le taux de synthèse protéique grâce à l'activation de la voie de l'insuline-AKT-Mtor et la synthèse protéique par l'inactivation de l'AMPK (Fujita et al., 2007). L'apport d'énergie inhibe aussi la dégradation protéique car il n'y a pas besoin de dégrader des protéines et cataboliser les AA résultants pour l'obtention d'énergie (Poppi et McLennan, 1995). Dans le cas d'un manque d'énergie ou de bilan énergétique négatif, la synthèse protéique diminue et la dégradation protéique augmente afin de fournir des AA libres qui seront catabolisés pour l'obtention d'énergie (Hawkins, 1991). En outre, l'apport en AAs qui résulte de l'ingestion de protéines alimentaires active aussi la synthèse protéique par la voie Mtor (Smith et al., 2015).

L'augmentation en apports protéiques stimulent la dégradation protéique (avec un apport énergétique qui reste constant), suite à une disponibilité et une concentration des AA élevées pour la synthèse, conduisant à un renouvellement protéique plus rapide (Broderick et al., 1991). La synthèse et la dégradation protéiques sont accrues avec le niveau d'ingestion, mais l'augmentation est proportionnelle-

ment plus importante pour la synthèse que pour la dégradation (Reeds et al., 1981 ; Garlick et al., 1991).

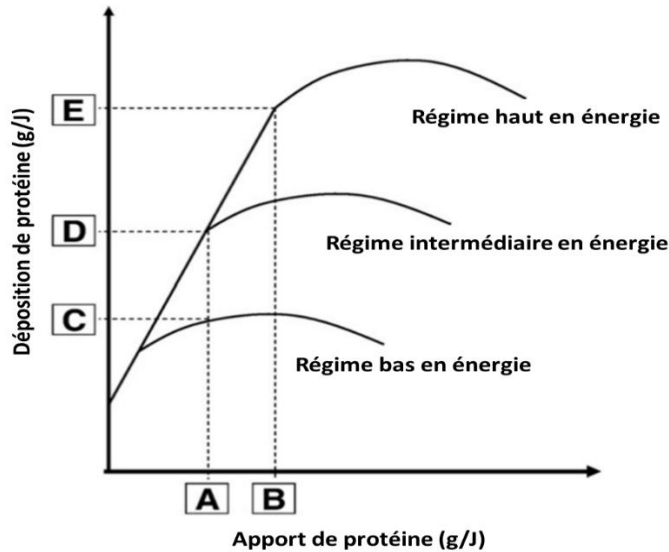


Figure 16 : Dépôt de protéine en fonction de l'apport de protéine journalier accompagné par différents niveaux d'énergie (Schroeder et Titgemeyer, 2008).

Chez les ruminants, le dépôt protéique est dicté par l'équilibre relatif entre les apports énergétiques et protéiques (Figure 16) qui détermine l'efficacité d'utilisation de l'azote (Schroeder et Titgemeyer, 2008). Le régime influence aussi l'efficacité d'utilisation de l'azote, notamment le taux d'ingestion, la teneur en fibres et en composés glucogéniques qui peut limiter la capacité d'ingestion par régulation physique ou à travers des centres cérébraux de l'appétit (Allen, 2004). La quantité et la qualité de fibres alimentaires ont été proposées comme étant les principaux facteurs limitants l'ingestion chez les ruminants, affectant ainsi le taux de passage à travers le tractus digestif et donc la quantité de nutriments absorbés (Allen, 1996). Par ailleurs, la quantité et la qualité de fibres ingérées déterminent les desquamations épithéliales et par conséquent les pertes endogènes en protéines, plus importantes avec quantités de fibres élevées (Ouellet et al., 2002).

Tableau 6 : Régulation hormonale de la synthèse et dégradation protéique

Hormones	Synthèse protéique	Dégradation protéique
Insuline et IGF-1	↑↑	↓
Hormones thyroïdes, T4	↑	↑
Somatotropine, GH	↑	↓
Catécholamines	↓	↑
Corticoïdes	↓↓	↑↑

Les concentrations plasmatiques hormonales peuvent réguler également le turnover protéique (Tableau 6), sachant que ces concentrations varient avec la quantité et le profil de nutriments absorbés. C'est le cas pour l'insuline et l'IGF-1 tandis que la concentration d'autres hormones est plutôt associée au métabolisme de l'animal. Davis et al., (2003), ont observé chez les porcs comme les hormones dont la concentration varie avec le niveau d'ingestion en énergie, régulent la synthèse et la dégradation protéiques de la même manière que l'apport d'énergie lui-même, en activant la voie AKT ou directement mTOR.

Les hormones indépendantes du niveau d'ingestion, régulent le turnover protéique par leur action sur la synthèse ou la dégradation protéiques. L'hormone de la croissance (GH) et les hormones thyroïdiennes augmentent le turnover protéique par des facteurs internes comme la croissance ou l'activité physique de l'animal et des facteurs associés à l'environnement comme les maladies infectieuses (Goldberg, 1969). Au contraire, les hormones de stress comme les catécholamines ou corticoïdes diminuent la synthèse et augmentent la dégradation protéique afin de préparer l'organisme à une possible menace (Rennie, 1985).

La composition corporelle comme facteur de régulation du turnover protéique

Dans cette synthèse bibliographique, la composition corporelle fait référence à la taille des pools tissulaires, et donc, à la taille et la proportion des différents organes et tissus ainsi qu'à la composition chimique de ces pools. Par exemple, dans le cas du muscle squelettique, la composition en termes de muscle, tissus adipeux et cartilages impacterait le turnover protéique lorsque plus de tissu protéique (musculaire) sera normalement associé à un turnover protéique plus importante (Richardson et al., 2001). La taille des différents pools tissulaires impacterait le turnover plus que les différences de synthèse et dégradation protéique entre pools (Lobley, 2003). Lescoat et al. (1997) rapportent dans une synthèse bibliographique chez le ruminant que la synthèse protéique des tissus digestifs est significativement plus importante que la synthèse protéique du muscle, en raison de taux métabolique et d'utilisation (ex : sécrétion des enzymes, pertes protéiques épithéliales) des AAs plus élevés.

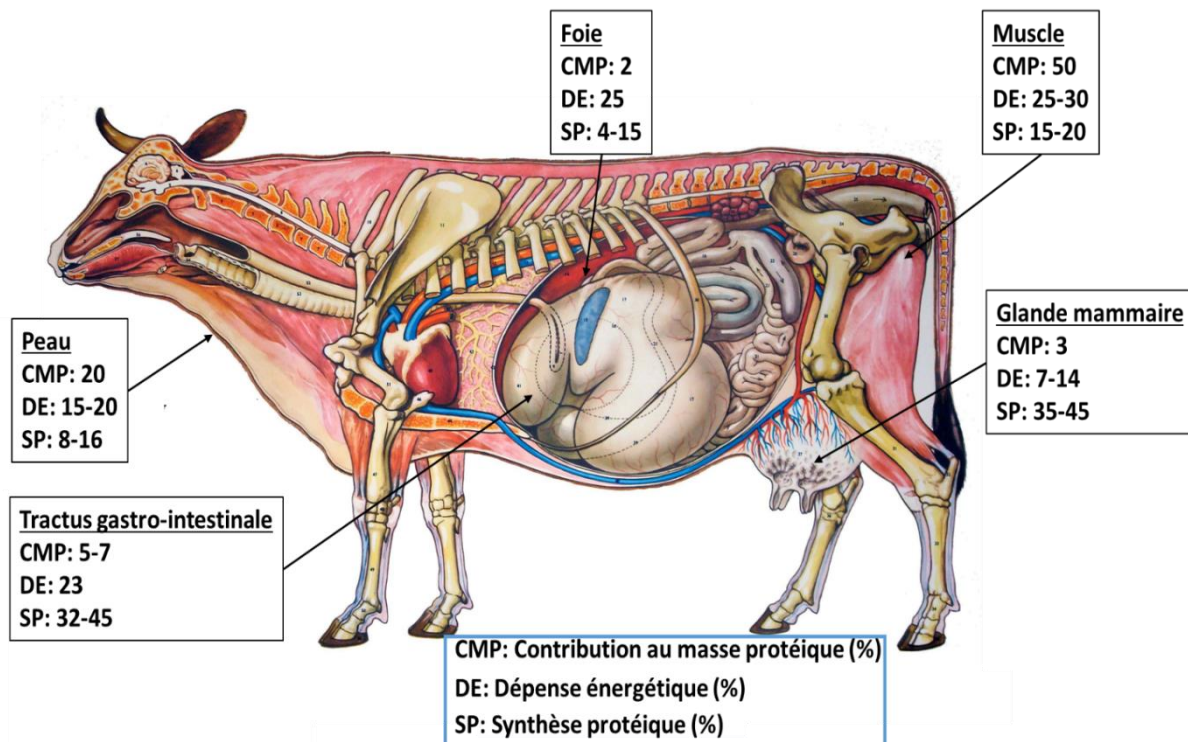


Figure 17 : Représentation de la contribution de la synthèse protéique (SP), masse protéique totale (CMP) et dépense énergétique (DE) des organes et tissus corporelles chez le bovin. Informations adaptées de Lobley (2003) et source de l'image : <https://pin.it/LXjWcJM>.

Toutefois, le renouvellement du tissu digestif liés aux desquamations intestinales représente 35% de toute la synthèse protéique journalière chez les ruminants (Lobley et al., 1994). Comme il peut être observé dans la Figure 17 le muscle n'est pas le site anatomique avec la plus grande quantité de protéines synthétisées par jour bien que sa contribution à la masse protéique totale et aux dépenses énergétiques soient les plus élevées (Harris, 1992). En conséquence, une plus grande proportion de viscères par rapport au muscle squelettique dans un animal avec la même ingestion et le même poids pourrait donner lieu à un turnover protéique (au niveau corps entier) très différent (Basarab et al., 2003 ; Castro Bulle et al., 2007). Pour cette raison la composition corporelle a été largement associée à l'EA de manière génotypique et phénotypique (Renand et Krauss, 2002 ; Taussat et al., 2019).

Des changements de composition corporelle impacteront l'utilisation des AAs et donc, l'efficacité d'utilisation de l'azote. Il a été observé qu'une proportion de carcasse dans le PV plus importante au détriment des organes est associée à un pourcentage d'azote, ingéré et digéré, retenu plus important (Fluharty et al., 1999 ; Galassi et al., 2015). Lorsque les animaux présentent une proportion de muscle (ou de carcasse) plus importante, il sera attendu que la proportion d'AAs utilisés pour maintenir ou accroître ce pool musculaire sera plus importante. Inversement plus les AAs sont utilisés pour maintenir les fonctions vitales non productives des organes, à fort turnover (Lobley et al., 1992), plus la capacité des tissus périphériques à prélever des AAs pour leur croissance sera limitée (Reynolds, 2006 ; Lapierre et al., 2006). La composition corporelle a donc un impact sur l'efficacité d'utilisation de l'azote. Peu de travaux publiés montrent les relations entre la composition corporelle et le métabolisme protéique. Une étude sur porcs suggère une association entre la composition corporelle (rendement de carcasse, pourcentage de lipides dans le muscle) l'efficacité d'utilisation et le turnover protéique au niveau corps entier (Zhang et al., 2015).

Finalement, il est important de noter que les deux facteurs de variation associés au turnover protéique, sont aussi associés entre eux. Il a été largement montré que le niveau d'ingestion des animaux faisait varier la taille des organes digestifs, en particulier avec des régimes riches en fibres (Allen, 1996 ; Basarab et al., 2003 ; Fitzsimons et al., 2014). Ainsi, les animaux à plus haut niveau d'ingestion ont des rendements de carcasses plus faibles (Walsh et al., 2008 ; Campion et al., 2009).

Lien entre le métabolisme protéique et la variabilité individuelle de l'efficacité alimentaire

Chez le bovin viande, l'efficacité avec laquelle les animaux transforment la protéine ingérée en protéine corporelle dépend des phénomènes digestives et métaboliques. Dans ce projet de thèse, je vais me focaliser sur les mécanismes du métabolisme protéique qui influencent l'EA. Dans cette thèse, Je considère l'efficacité d'utilisation de l'azote (EUA) comme une conséquence du métabolisme protéique au niveau de l'animal entier qui en plus, est mathématiquement associé à l'EA ($EUA = \text{azote retenu} / \text{azote ingéré}$, $\text{index de consommation} = \text{gain de poids} / \text{MSI}$).

Plusieurs travaux basés sur des techniques « omiques » ont associé l'EA et aux différentes voies du métabolisme protéique (Duarte et al., 2019; Jorge-Smeding et al., 2019; Novais et al., 2019; Zhang et al., 2019; Banerjee et al., 2020). Des processus du métabolisme protéique associés à l'EA (Herd et al., 2004; Cantalapiedra-Hijar et al., 2018) sont le turnover protéique (Lobley, 2003) et le catabolisme hépatique des AAs (Lapierre et al., 2002). D'autres mécanismes, de type digestif, affectent aussi l'EA, comme l'efficacité de synthèse microbienne des protéines dans le rumen (Tillman et Sidhu, 1969) et la recirculation de l'urée (Silva et al., 2019). Cependant, le taux de recirculation de l'urée est un processus très variable entre animaux, dépendant du niveau et de la nature des protéines alimentaires (Tan et Murphy, 2004) et pas forcément associée aux processus d'efficacité métabolique. Donc, j'ai choisi de l'exclure de cette synthèse bibliographique et de développer les mécanismes digestifs et métaboliques qui influencent l'EA (avec un focus plus important sur le métabolisme protéique).

Utilisation de l'azote au niveau digestif associée aux variations individuelles de l'efficacité alimentaire

Le rumen a été identifié comme un organe clé dans le processus d'efficacité chez le ruminant (Bach et al., 2005). Comme décrit dans la partie sur le devenir des matières azotées dans le rumen, la balance protéique dans le rumen est un signe d'efficacité car elle représente la proportion des MAT ingérées qui sortent du rumen sous forme de protéine (INRA, 2018). Ce processus a été fortement associé à la capacité de synthèse protéique des microorganismes du rumen, qui dépend de la quantité d'énergie disponible dans le rumen (énergie fermentescible) et de l'efficacité de synthèse microbienne quand l'azote n'est pas limitant (Stern et al., 1994). L'efficacité de synthèse protéique microbiennes a été associée à l'IR (Kong et al., 2016; Xie et al., 2019). L'efficacité de synthèse protéique microbienne (ESPM) s'exprime en g protéine microbienne par kg d'énergie fermentescible ou alternativement en g de protéine microbienne par g d'azote disponible dans le rumen, ce dernier correspondant à la quantité de protéine dégradable et l'azote des protéines endogènes de l'épithélium ruminal (Bach et al., 2005). L'efficacité de synthèse microbienne augmente linéairement lorsque la protéine dégradable dans le rumen augmente, au moins en dessous d'une teneur protéique de 14% dans la ration (Hoover et Stokes, 1991). Par conséquent, pour améliorer l'efficacité de la synthèse protéique, il faut équilibrer l'énergie fermentescible et la protéine disponible dans le rumen. Bach et al. (2005) ont utilisé des données *in vitro* pour trouver la meilleure relation entre l'énergie fermentescible et la protéine dégradable dans le rumen et optimiser l'efficacité et concluent avec les valeurs clés de 29 g de protéine microbienne par kg d'énergie fermentescible et de 69 g de protéine microbienne par 100 g d'azote dégra-

dable (Figure 18). Comme vu précédemment le système INRA, (2018) recommande une teneur de 14% de protéines dans a ration pour équilibrer la balance protéique du rumen à zéro.

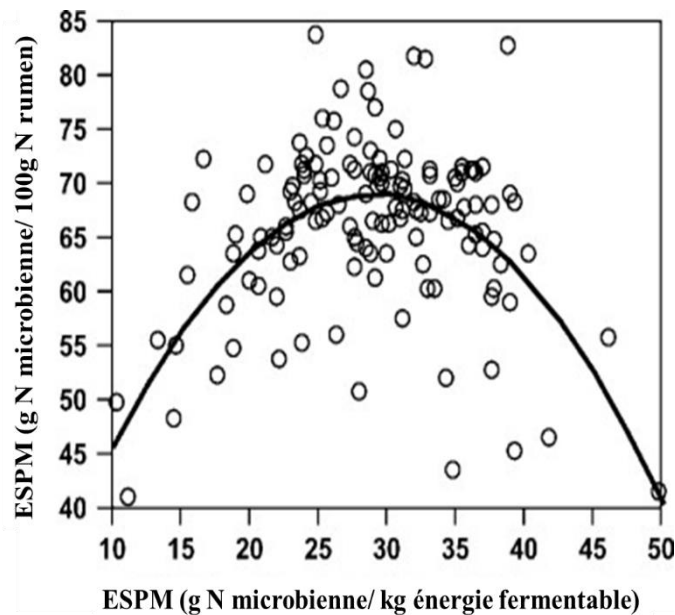


Figure 18 : Relation entre l'efficacité de synthèse protéique par rapport à l'énergie fermentescible et la protéine dégradable du rumen, reproduite de Bach et al., (2005).

Un excès de protéine dégradable provoque une augmentation d'ammoniaque ruminale, conduisant à une balance protéique du rumen positive et une moins bonne efficacité d'utilisation de l'azote au niveau ruminal (Ipharraguerre et Clark, 2005). La synthèse de protéines microbiennes peut donc être modulée en changeant les proportions de protéines dégradables et non dégradables ainsi que l'énergie fermentescible dans le rumen (Cardozo et al., 2004). Il faut aussi tenir en compte la recirculation de l'urée plasmatique vers le rumen, ce qui peut être un avantage dans des régimes à faibles teneurs en protéines (Lapierre et Lobley, 2001). Cependant, un des points clés de l'EA au niveau ruminal et digestif en général est la protéine endogène fortement dépendante de la teneur en fibre de la ration (Ouellet et al., 2002).

Utilisation métabolique de l'azote en lien avec les variations individuelles de l'efficacité alimentaire

Au niveau hépatique, il existe fondamentalement deux processus fortement associés à l'EA : le catabolisme hépatique des AAs et le turnover protéique du corps entier (France et al., 1999). La partition hépatique des AAs vers l'anabolisme ou le catabolisme a été associée à l'efficacité d'utilisation métabolique de l'azote (Herd et Arthur, 2009 ; Cantalapiedra-Hijar et al., 2015). Cette partition d'azote dépend de deux facteurs principaux :

1) Les quantités ingérées sont le déterminant principal du catabolisme des AAs dans le foie ; une augmentation de l'ingéré augmentant le catabolisme (Lobley, 1992 ; Guinard et Rulquin, 1994) en raison d'un excès d'AAs plasmatiques ou d'une absorption plus importante d'ammoniaque (Lobley et al., 1995). La qualité des nutriments ingérés est aussi importante pour l'EA, le ratio énergie-protéine (Vandehaar et al., 1999) ou la présence d'AAs limitants (Kronfeld, 1982). Chez des porcs qui diffèrent par leurs taux d'ingestion, selon l'index IR, des activités enzymatiques de transaminases ont suggéré un catabolisme des AAs plus élevé mais cette hypothèse n'a pas été validée expérimentalement (Le Naou et al., 2012 ; Gilbert et al., 2017).

2) Les besoins ou demandes tissulaires en AAs qui dépendent de la taille et du turnover protéique des différents tissus (Lobley, 2003), de l'activité physique (Eden et al., 2011) et de l'état de l'animal, stress ou maladie (Geay, 1984). En plus, des facteurs environnementaux comme la température influencent le turnover protéique (Richardson et Herd, 2004).

La Figure 19 représente une situation théorique avec deux animaux présentant le même gain protéique journalier (500 g/j), mais des taux de synthèse et de dégradation protéiques différents.

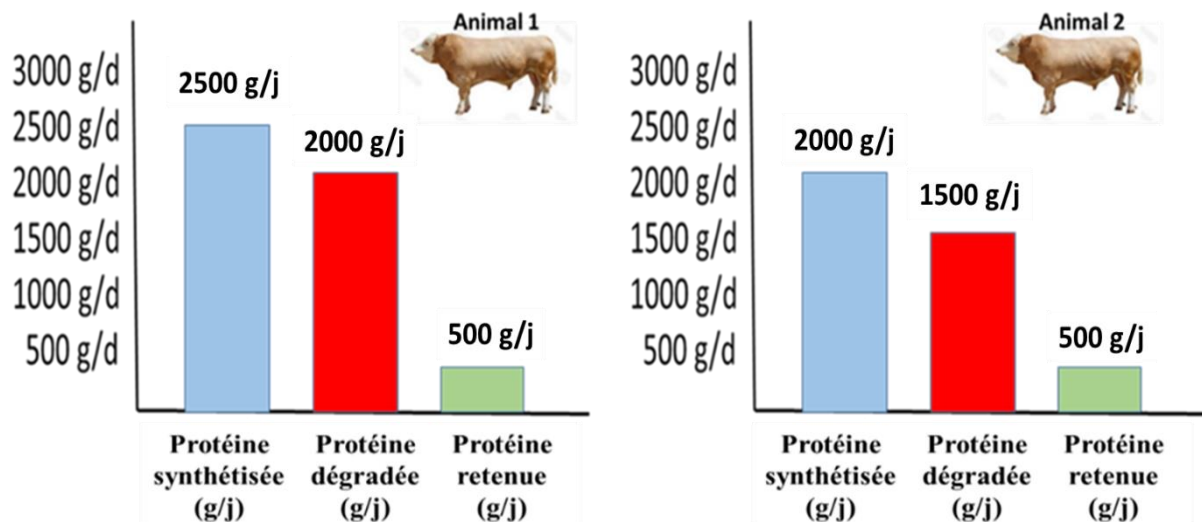


Figure 19 : Comparaison de deux animaux ayant la même quantité de protéine retenue mais avec un taux de renouvellement protéique différent.

On voit d'après cette figure l'importance du ratio entre la synthèse et dégradation protéique (SP/DP) (Lobley, 2003). Dans le cas de l'animal 1, le ratio SP/DP est de 1,25 tandis que pour l'animal 2 il est de 1,33 pour la même quantité du gain. Par conséquent, l'animal 1, qui présente un turnover protéique plus élevé, aura une dépense énergétique journalière plus importante et donc, une EA probablement plus faible.

Lobley (2003) explique que l'efficacité du gain est plus élevée lorsque la dégradation protéique baisse que lorsque la synthèse augmente étant donné le coût énergétique engendré par chacun des processus. De plus, une synthèse et dégradation protéique plus importante, au niveau musculaire, améliore l'efficacité d'utilisation des AA pour le gain et impacte l'efficacité d'utilisation de l'azote (Jones et al., 1990). Plusieurs études (Tableau 7) ont évalué le lien entre l'EA (ingéré résiduel, index de consommation, variables biologiques reliées à l'efficacité telles que potentiel de croissance des animaux) et le métabolisme protéique à l'échelle individuelle par l'étude de la taille du turnover protéique. Lorsque l'EA est mesurée par l'ingéré résiduel, aucune différence de turnover protéique (notamment de dégradation protéique musculaire) n'a été notée entre animaux extrêmes (Castro Bulle et al., 2007 ; Gomes et al., 2012 ; Gomes et al., 2013 ; Lines et al., 2014) sauf dans les études de McDonough et al. (2001) dégradation musculaire plus élevée chez les animaux inefficients selon l'ingéré résiduel) et de Richardson et Herd (2004). Il est important de noter que la plupart des études du turnover protéique (y compris celles du Tableau 7) ont appliquées soit des méthodes de référence (ex : méthode précurseurs) avec un temps de mesure compris entre 4 et 12 heures (Waterlow, 2006a) trop court pour que les animaux soient en conditions physiologiques d'élevage (Cantalapiedra-Hijar et al., 2019), soit des méthodes indirectes telles que l'utilisation de biomarqueurs (ex : N-tau-méthyl-histidine, communément appelé 3-méthyl histidine, 3MH), d'activités enzymatiques (ex : calpaines) ou de méthodes mécaniques (ex : force de cisaillement).

Tableau 7 : Synthèse des travaux de littérature ayant évalué la relation entre le turnover protéique et l'ingéré résiduel chez le bovin viande.

Références	Méthode de mesure	Relation avec le turnover protéique
McDonough et al., 2001	Méthode enzymatique et mécanique	Dégradation musculaire plus élevée chez les animaux inefficients selon l'IR
Richardson et Herd, 2004	Biomarqueur (urée)	Dégradation musculaire plus élevée chez les animaux inefficients selon l'IR
Castro Bulle et al., 2007	Biomarqueur (3MH)	Dégradation musculaire similaire entre animaux extrêmes selon l'IR
Gomes et al., 2012	Biomarqueur (3MH)	Dégradation musculaire similaire entre animaux extrêmes selon l'IR
Da Costa Gomes et al., 2013	Biomarqueur (3MH)	Dégradation musculaire similaire entre animaux extrêmes selon l'IR
Lines et al., 2014	Méthode du précurseur (L-leucine, KIC)	Dégradation musculaire similaire entre animaux extrêmes selon l'IR
Elolimy et al., 2019	Analyse moléculaire par Western blot	Dégradation du tissu digestif plus élevée chez les animaux inefficients selon l'IR (voie de l'ubiquitine et du proto-oncogène)

En comparant des animaux à vitesses de croissances différentes, Castro Bulle et al. (2007) ont montré un taux d'accrétion plus élevé et un taux de dégradation musculaire plus élevé chez les animaux à croissances élevée. Inversement Oddy et al. (1998) montrent que les animaux avec un potentiel de croissance élevé présentent moins de dégradation protéique musculaire, en lien possible avec une dépense énergétique aussi plus faible (Oddy et al., 1998). En cohérence avec les résultats rapportés Tableau 6, une étude récente basée sur des approches moléculaires observe que le tissu épithélial ruminal

des animaux inefficients selon l'IR présentent un taux de dégradation protéique plus élevée que les efficaces (Elolimy et al., 2019).

Comme il a été précédemment décrits, on considère que le flux des AAs et protéines du corps et concrètement du pool plasmatique sont majoritairement régulés par les besoins et demandes des tissus périphériques. En plus, chez le bovin viande, où le muscle représente au moins le 50% de toute la masse protéique (Lobley, 2003), il sera attendu que les besoins et demandes des AAs et protéines soient proportionnellement plus régulés par le tissu musculaire que par les viscères ou des autres tissus périphériques. En accordance, Lescoat et al., (1996) ont analysé les différents flux sanguins et des AAs dans le corps des ruminants et ils ont observé que même si les TDVP ou le foie ont des flux très élevés par rapport à la quantité de tissu, en chiffres absolus (L/j), le muscle (ou la glande mammaire chez la vache laitière) présente le flux sanguin et des AAs plus important du corps.

Stratégie et démarche scientifique de la thèse

Pour répondre à l'objectif de la thèse : *Comprendre la relation à l'échelle individuelle entre l'efficacité alimentaire et le métabolisme protéique chez le bovin viande en analysant la contribution de l'effet régime à cette relation*, la stratégie scientifique s'est déclinée en trois grandes questions.

1) Existe-t-il une relation significative entre l'IR et l'EUA chez le bovin viande ?

Si un lien existe entre le métabolisme protéique et les variations individuelles de l'EA mesurée comme l'IR, je fais l'hypothèse que cela devrait d'abord être apprécié par des changements de l'efficacité d'utilisation de l'azote au niveau corps entier (EUA ; azote retenu/azote ingéré). L'étude bibliographique précédente suggère une relation significative entre ces deux caractères. Ci-après les principaux éléments permettant d'attendre une relation négative entre l'IR et l'EUA. Tout d'abord le calcul mathématique de l'IR et l'EUA partagent certaines similitudes. Dans le cas de l'IR, les animaux efficaces ont une MSI plus faible pour un même gain de poids journalier et PV métabolique (Koch, 1962), ce qui se traduit en termes d'azote par moins d'azote ingéré pour une même quantité d'azote retenu (da Costa Gomes et al., 2013b ; Carmona et al., 2020). Deuxièmement, une quantité ingérée plus élevée favorise l'augmentation du catabolisme des AAs par les tissus splanchniques ainsi que d'avantage des pertes protéiques endogènes (Swanson, 1977 ; Harris et al., 1992). Ainsi, le système INRA (2018) montre à l'échelle inter-régime que l'efficacité d'utilisation de la protéine digestible dans l'intestin (PDI) diminue lorsque les apports en PDI augmentent mais aussi que l'excrétion d'azote fécal endogène augmente lorsque le niveau d'ingestion est plus élevé. Il est attendu que ces relations inter-régimes décrites largement dans la littérature soient similaires à l'échelle animal. Troisièmement, la composition corporelle varie entre les animaux extrêmes selon IR. De ce fait, on peut supposer un plus fort catabolisme des AAs chez des animaux ayant une taille de viscère élevée conduisant à une EUA plus faible, même si cette relation n'a été jamais démontrée entre individus mais seulement entre régimes contrastés (Fluharty et al., 1999). Ces trois points suggèrent une EUA plus élevée chez les individus efficaces selon l'IR comme récemment démontré chez la vache laitière en utilisant l'azote secrété dans le lait à la place de l'azote retenu dans le calcul (Xie et al., 2019 ; Liu et Van de Haar, 2020). Cependant, chez le bovin viande, aucune relation significative n'a été démontrée entre l'IR et l'EUA en utilisant la méthode du bilan d'azote pour le calcul de la rétention d'azote (Da Costa Gomes et al., 2013a ; Lines et al., 2014 ; Carmona et al., 2020).

Approche expérimentale.

Etape 1. Cette première question sera traitée en utilisant un dispositif animal à grande échelle (n = 588) avec des mesures journalières de MSI et des mesures de PV toutes les deux semaines permettant le calcul de l'EA sur toute la durée d'engraissement (environ 6 mois). L'EUA sera évaluée à l'aide des

deux biomarqueurs, l'urée plasmatique (Kohn et al., 2005) et l'abondance naturelle de l'azote 15 mesuré dans le plasma (Cantalapiedra-Hijar et al., 2015), tous les deux analysés en fin du test d'EA. Je fais l'hypothèse que, contrairement aux études précédentes qui ont utilisé un faible nombre d'animaux, un grand dispositif animal à grande échelle permettra de mettre en évidence l'existence d'une relation entre les deux variables d'intérêt, étant l'imprécision associée aux biomarqueurs compensée largement par le nombre d'observations disponibles.

Etape 2. Le lien entre EUA et l'IR sera confirmé ensuite avec un deuxième dispositif plus analytique. Dans ce dispositif j'ai travaillé avec des animaux extrêmes sur leur IR (n = 32 sélectionnés sur 100 animaux phénotypés) et en calculant la rétention protéique, nécessaire au calcul d'EUA, soit avec une méthode de référence (bilan d'azote sur 10 jours) soit à partir des estimations de composition corporelle réalisées au début (jour 0) et fin d'engraissement (jour 196). La mesure de la composition corporelle en début d'engraissement (teneur protéique début) sera réalisée à partir d'une biopsie de tissus adipeux sous-cutané et l'équation de prédiction proposée par Garcia et Agabriel (2008) combinant le PV de l'animal et le diamètre d'adipocytes prélevés. La mesure de la composition corporelle en fin d'engraissement (teneur protéique fin) sera réalisée à partir des mesures de composition tissulaires de la sixième côte et des quantités des tissus adipeux mesurées à l'abattoir et en utilisant les équations de prédiction développées par Robelin et Geay (1975) et Robelin et al. (1975) chez des bovins de race Charolaise.

2) L'effet régime influence-t-il la relation entre l'IR et l'EUA chez le bovin viande ?

Considérant l'importance contextuelle de l'utilisation des régimes riches en fibre (cellulose) chez le ruminant, je me suis intéressé à étudier la relation entre l'EA et l'EUA avec des régimes contrastés (régime d'engraissement classique à base de maïs/soja vs régime riche en fibres et avec une faible teneur d'aliments consommables par l'homme). Il a été largement étudié l'effet moyen du régime alimentaire sur l'EUA et l'EA à travers des variations dans les caractéristiques alimentaires comme le niveau de protéine (Da Silva et al., 2016 ; Kidane et al., 2018), énergie (Garg et al., 2013; Foskolos et Moorby, 2018) ou fibre (Santos et al., 2012). Cependant, peu d'études ont évalué à l'échelle individuelle la relation entre l'EA et l'EUA avec des régimes contrastés. En me basant sur des résultats obtenus lors de comparaisons de régimes et de manière un peu spéculative, je fais l'hypothèse d'une relation entre l'EA et l'EUA plus faible lorsque les animaux sont alimentés avec un régime riche en fibre par rapport à un régime riche en amidon (interaction entre le classement sur l'IR des animaux et le type de régime utilisé). Cette hypothèse est justifiée en raison de pertes fécales en protéines endogènes plus importantes lorsque la teneur en fibre du régime augmente (Swanson, 1977 ; Dijkstra et al., 2013), et d'un catabolisme des AAs plus important lorsque la quantité de nutriments glucogéniques absorbés diminue (Nichols et al., 2019 ; Loncke et al., 2020).

Approche expérimentale.

Pour répondre à cette question j'utiliserai à la fois le dispositif animal à grande échelle (n = 588) et le dispositif analytique (n=100). Dans les deux cas la moitié des animaux de chaque dispositif sera nourris avec un des deux régimes expérimentaux contrastés, l'un riche en fibre et à base de l'ensilage d'herbe, l'autre riche en amidon et à base d'ensilage de maïs. Le choix de ces deux types de régimes a été basé sur deux prémisses. La première est contextuelle et vise à augmenter la part de fourrages et

aliments non-concurrentiels avec l'alimentation humaine dans les rations de ruminants. Ce choix tient aussi en compte les particularités des systèmes allaitants dans lesquels les vaches allaitantes et leurs veaux sont élevés au pâturage et nourris avec l'herbe ou du foin tandis que les taurillons en engraissement sont nourris avec des régimes plus dense en énergie et souvent riche en amidon. La seconde porte sur l'évaluation des caractéristiques du régime pouvant influencer cette association. Les deux régimes choisis ont un niveau protéique (14 % de MAT dans la MS) et un rapport PDI sur UFV (95 g/UFV vs 90g/UFV) similaire mais le type de nutriments absorbés est attendu d'être assez contrasté (glucogéniques vs céto-génique) pouvant déclencher des réponses hormonales et métaboliques légèrement différentes (Nichols et al., 2019).

3) Quels sont les mécanismes biologiques qui pourraient expliquer les différences d'IR entre animaux modulés par l'effet régime ?

Si un lien entre l'EUA et l'IR est confirmé, je fais l'hypothèse que la vitesse à laquelle certains pools protéiques tournent, le turnover protéique, pourrait être à l'origine et expliquer les différences d'IR entre animaux. Dans ce contexte, j'attends que les animaux plus efficaces montrent un turnover protéique et des dépenses énergétiques plus faibles comme suggéré dans des études de synthèse (Lobley, 2003 ; Cantalapiedra-Hijar et al., 2018). En ce qui concerne le régime, je fais l'hypothèse que la nature contrastée de l'énergie entre nos deux régimes expérimentaux pourrait impacter la relation entre l'IR et turnover protéique. Il peut être attendu que les régimes riches en amidon conduiront à une insulino-résistance plus élevée, augmentant la synthèse protéique et réduisant la dégradation protéique (Lobley, 1990, 1998 ; Sève et Ponter, 1997). De plus, je suppose que les régimes plus fibreux conduiront à des desquamations ruminales d'autant plus élevées que la taille des organes est plus importante (Burrin et al., 1990 ; Allen, 1996) ce qui pourrait être associé à des changements de composition corporelle entre extrêmes variables selon les régimes, et en conséquence, à une interaction entre l'effet régime et le classement IR des animaux sur le turnover protéique.

Approche expérimentale.

Étape 1. Le turnover protéique sera étudié uniquement sur le dispositif analytique utilisant des animaux extrêmes (n=32/100), où la moitié sera nourri avec un régime fourrager et l'autre avec un régime dense en énergie (mêmes régimes que pour le grand dispositif animal). Le turnover protéique sera étudié avec deux méthodes. La première, le turnover isotopique, méthode développée par l'équipe pour évaluer le turnover protéique à long terme (Cantalapiedra-Hijar et al., 2019), mesure le taux de déplétion en azote 15 du plasma et des urines suite à une diminution drastique de l'enrichissement de l'azote 15N dans le régime alimentaire. Il s'agit d'un proxy permettant d'évaluer sur une longue période de plusieurs semaines le taux fractionnel de synthèse des protéines plasmatiques (pool plasma) et le taux fractionnel de dégradation protéique du corps entier (pool urine). La deuxième, l'excrétion urinaire de la 3-méthyl histidine, est un biomarqueur validé de la dégradation protéique dans le muscle squelettique (Harris et Milne, 1980) et lorsqu'il est analysé par rapport à la masse musculaire estimée à l'abattoir peut informer sur le taux fractionnel de dégradation protéique du muscle squelettique (Castro Bulle et al., 2007). Les mesures du turnover protéique seront comparées aux performances et à la composition corporelle à l'abattage ainsi qu'à l'insulino-résistance. Les dépenses énergétiques seront évaluées d'après la consommation d'oxygène mesurée par le système Greenfeed® sur une période moyenne de 112 jours.

Etape 2. Enfin, dans la limite du temps disponible pour cette thèse, j'ai tenu à compléter ce travail par une étude du métabolisme protéique à l'échelle moléculaire dans les tissus musculaires et hépatiques. A l'abattoir, des échantillons de muscle et de foie ont été prélevés sur les animaux extrêmes (n = 32). Pour limiter l'effet de quantités ingérées sur la réponse des voies de signalisation de la synthèse de dégradation protéique à l'absorption de nutriments, les animaux extrêmes ont été mis à jeun 12-14h avant l'abattage, et une quantité fixe (2,5 kg) de leur concentré respectif leur a été distribuée 3 heures avant l'abattage et indépendamment de son phénotype IR afin d'obtenir un état postprandial comparable à l'abattage (Jenny et Polan, 1975 ; Evans et al., 1975). Les principales voies de la synthèse protéique (AKT et SK6) et de la dégradation protéique (AMPK, Ubiquitine et autophagie) seront analysées par Western blot ainsi que l'activité enzymatique des principales transaminases hépatiques impliquées dans le catabolisme des AAs. Des échantillons du plasma seront prélevés à l'abattoir pour la mesure des concentrations plasmatiques en urée, glucose, insuline et IGF-1 à mettre en relation avec les voies de signalisation explorées.

Résultats et travaux de la thèse

Premier article de la thèse

*Guarnido-Lopez, P., Ortigues-Marty, I., Taussat, S., Fossaert, C., Renand, G., & Cantalapiedra-Hijar, G. (2021). Plasma proteins $\delta^{15}\text{N}$ vs plasma urea as candidate biomarkers of between-animal variations of feed efficiency in beef cattle: Phenotypic and genetic evaluation. *Animal*, 15(8), 100318. DOI= 10.1016/J.ANIMAL.2021.100318.*

Introduction

Ce premier article traite des deux premières questions scientifiques décrites dans la section ‘Stratégie et démarche scientifique de la thèse’, et porte sur l’évaluation à l’échelle individuelle de la relation entre l’EA et l’EUA, en étudiant l’influence possible de l’effet régime sur cette relation.

Les résultats montrent que l’EA, déterminée d’après le rapport du gain sur l’ingéré (RGI) et l’IR, est associée à l’EUA ; les animaux efficients selon ces deux indices ont significativement une meilleure EUA quel que soit le régime alimentaire. Mais la nature du régime influence cette relation qui varie aussi avec le type d’index d’EA. La pente de la relation entre RGI et l’EUA est plus élevée (+25% ; $P < 0,05$) avec le régime à base d’ensilage de maïs qu’avec le régime à base d’ensilage d’herbe, alors que la pente de la relation entre l’IR et l’EUA n’est que numériquement plus forte avec le régime à base d’ensilage de maïs . Les caractéristiques du régime pouvant expliquer l’interaction entre RGI et le régime sur EUA sont le rapport protéine métabolisable/énergie nette et la balance protéique du rumen.

Plasma $\delta^{15}\text{N}$ vs urea as candidate biomarkers of between-animal variations of feed efficiency in beef cattle fed contrasting diets: phenotypic and genetic evaluation

Guarnido-Lopez P¹, Ortigues-Marty I¹, Taussat S², Fossaert C³, Renand G², Cantalapiedra-Hijar G^{1*}

¹*INRAE, VetAgro Sup, UMR Herbivores, Université Clermont Auvergne, F-63122 Saint-Genès-Champanelle, France;*

²*Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, UMR Génétique Animale et Biologie Intégrative, 78350, Jouy-en-Josas, France*

³*Institut de l'élevage, 75595 Paris, France*

*Corresponding author: Gonzalo Cantalapiedra-Hijar. Email: gonzalo.cantalapiedra@inrae.fr

Abstract

Identifying animals that are superior in terms of feed efficiency may improve the profitability and sustainability of the beef cattle sector. However, measuring feed efficiency is costly and time-consuming. Biomarkers should thus be explored and validated to predict between-animal variation of feed efficiency for both genetic selection and precision feeding. In this work, we aimed to assess and validate two previously identified biomarkers of nitrogen (N) use efficiency in ruminants, plasma urea concentrations and the natural abundance of ^{15}N in plasma proteins ($\delta^{15}\text{N}$), to predict the between-animal variation in feed efficiency when animals were fed two contrasted diets (high-starch vs high-fibre diets). We used an experimental network design with a total of 588 young bulls tested for feed efficiency through two feed efficiency criteria (feed conversion efficiency [FCE] and residual feed intake [RFI]) during at least 6 months in 12 cohorts (farm x period combination). Animals reared in the same cohort, receiving the same diet and housed in the same pen were considered as a contemporary group (CG). To analyse between-animal variations and explore relationships between biomarkers and feed efficiency two statistical approaches, based either on mixed-effect models or regressions from residuals, were conducted to remove the between-CG variability. Between-animal variation of plasma $\delta^{15}\text{N}$ was significantly correlated with feed efficiency measured through the two criteria and regardless of the statistical approach. Conversely, plasma urea was not correlated to FCE and showed only a weak, although significant, correlation with RFI. The response of plasma $\delta^{15}\text{N}$ to FCE variations was higher when animals were fed a high-starch compared to a high-fibre diet. In addition, we identified two dietary factors, the metabolisable protein to net energy ratio and the rumen protein balance, that influenced the relation between $\delta^{15}\text{N}$ and FCE variations. Concerning the genetic evaluation, and despite the moderate heritability of the two biomarkers (0.28), the size of our experimental setup was insufficient to detect significant genetic correlations between feed efficiency and the biomarkers. However, we validated the potential of plasma $\delta^{15}\text{N}$ to phenotypically discriminate two animals reared in identical conditions in terms of feed efficiency as long as they differ by at least 0.049 g/g for FCE and 1.67 kg/d for RFI. Altogether, the study showed phenotypic, but non-genetic, relationships between plasma $\delta^{15}\text{N}$ and feed efficiency, that varied according to the efficiency index and the diet utilised.

Keywords: feed conversion efficiency, biomarkers, individual variability, natural ^{15}N abundance, ruminants

Implications

Beef fattening cattle fed the same diet in the same contemporary group show individual variability in their ability to transform the feed into gain. We validated the potential of a new biomarker, the natural ^{15}N abundance in plasma, to identify most efficient cattle within contemporary groups. The use of such a biomarker may help farmers and producers to make decisions in the context of precision feeding and thus improve the profitability and sustainability of the beef cattle industry.

Introduction

Feed efficiency (**FE**) is defined as the animal ability to transform feed resources into animal products. In a context of increasing demand for protein resources, of necessities for the industry to lower production costs and to improve the sustainability of livestock systems, FE should be improved (Cantalapiedra-Hijar et al. 2018a). Feed efficiency is usually characterised through indices, described as ratios between animal inputs and outputs (feed conversion efficiency [**FCE**]), or as residual regression traits (residual feed intake [**RFI**]) (Berry and Crowley, 2013). In the case of ruminants, especially beef cattle, feed efficiency is low compared to other livestock species (Tolkamp, 2010), but also highly variable between animals raised in the same conditions (17% CV, Arthur et al. 2001). In addition, feed efficiency evaluated by either one of the two indices is moderately heritable (Taussat et al. 2019), which gives rise to the possibility of improving this character by genetic selection (Archer et al. 1999). However, a major limit for the genetic selection remains the phenotypic measurement of feed efficiency itself, which requires at least 70 days of individual DM intake (**DMI**) and BW gain recording and which, as a result, is expensive, laborious and not always feasible on a large number of animals or in extensive conditions. It is thus necessary to find alternative tools that are accurate, phenotypically and genetically related to feed efficiency traits and that can be used to predict feed efficiency in field conditions and to select animals for this trait.

In this regard, biomarkers of between-animal variation of feed efficiency constitute interesting alternative tools. In animals fed the same diet, feed efficiency is by definition mathematically associated to the nitrogen (**N**) use efficiency, which reflects the partition of N intake between N excretion and N accretion. Nitrogen use efficiency depends on both dietary conditions and individual animal protein metabolism (Dijkstra et al. 2013). Therefore, biomarkers of feed efficiency could be searched among proxies related to nitrogen use efficiency (NUE; Cantalapiedra-Hijar et al. 2018b; Jonker et al. 1998).

A classical biomarker of N partitioning and N use efficiency in ruminants is the plasma urea concentration (Kohn et al. 2005b). Although its ability to discriminate dietary treatments in terms of N utilization is unquestionable (McNamara et al. 2003), no conclusive results have been obtained about its potential to reflect between-animal variations in NUE (Hof et al. 1997; Huhtanen et al. 2015). An alternative potential biomarker to predict N use efficiency is the natural abundance of ^{15}N ($\delta^{15}\text{N}$) in animal plasma proteins, which has the potential to reflect both dietary and individual effects of N use efficiency (Cantalapiedra-Hijar et al. 2018b). Nitrogen naturally exists in two stable isotopes, ^{15}N and ^{14}N , and $\delta^{15}\text{N}$ reflects the ratio between the heaviest and the lightest isotope. The $\delta^{15}\text{N}$ in animal proteins results from the $\delta^{15}\text{N}$ in the diet and the N isotopic fractionation occurring between N ingestion and body retention. N isotopic fractionation is defined as the difference between the isotopic signature of the product (animal proteins) and the substrate (feed consumed), which arises from rumen microbial activity and hepatic enzymes involved in urea synthesis (Silfer et al. 1992). Enzymes prefer substrates (ammonia and amino acids) containing the lighter N isotope, which results in a greater excretion of ^{14}N in urine and greater retention of ^{15}N in animal proteins (Macko et al. 1986). It is expected that efficient animals have a lower $\delta^{15}\text{N}$ in plasma proteins as a result of a lower amino acid catabolism (Cantalapiedra-Hijar et al. 2015) and higher ammonia uptake by rumen bacteria (Wattiaux and Reed, 1995). Plasma $\delta^{15}\text{N}$ was shown to be significantly related to FCE (Wheadon et al. 2014; Cantalapiedra-Hijar et al. 2015) but not to RFI (Wheadon et al. 2014; Meale et al. 2017). To be used for genetic selection, genetic correlation between biomarkers and animal traits should also be confirmed. Finally, recent studies suggested that the relationships between feed efficiency and plasma $\delta^{15}\text{N}$ could be diet-

dependent (Cantalapiedra-Hijar et al. 2018b; Nasrollahi et al. 2020). However, these differences in the responses between plasma $\delta^{15}\text{N}$ and feed efficiency have not been evaluated experimentally on a large number of animals. We assumed that the relationships between the candidate plasma biomarkers ($\delta^{15}\text{N}$ and urea concentration) and the two FE indices (FCE, RFI) differ and that each relationship is affected by the diet fed to animals. The objectives of this study were to evaluate i) the phenotypic and genetic relationships between plasma natural ^{15}N abundance or plasma urea concentration and the most common indices of feed efficiency (FCE and RFI), ii) to which extent these relationships are diet-dependent, and iii) the applicability of these candidate biomarkers in field conditions.

Material and methods

Experimental network design

This study was conceived as an experimental network, defined as a set of experiments sharing the same experimental protocol but conducted in a set of different environments (Makowski et al. 2019). The experimental network (Fig. 1) was constituted of 12 cohorts defined by the combination of four experimental farms located at different places in France (F.1, F.2, F.3, F.4) and several experimental periods within each experimental farm (2, 3 or 4 depending on the farm). The study started in 2015 and finished in 2019. Within each cohort, the same two contrasted diets (a grass silage-based diet rich in fibre vs a corn silage-based diet rich in starch) were tested. For each cohort, each animal (on average 55 individuals per cohort) was assigned to one of the two experimental diets (on average 27 animals per diet within a cohort). Within each cohort and diet, animals were grouped in pens (5 to 10 individuals/pen) according to their initial BW. As a result, half of the pens ($n=3-4$) in each cohort was assigned to the grass silage diet while the other half ($n=3-4$) was assigned to the corn silage diet. Only two cohorts out of 12 used only one pen per diet with a greater number of animals per pen. Therefore, each of the 72 individual pens represented a contemporary group (**CG**), defined as those animals that were reared in the same cohort, that had a similar initial body weight, and that were fed the same diet and housed in the same pen (Pereira et al. 2018). The experimental unit is the individual animal because treatments and measurements were applied at the animal level. The environmental factors contributing to the between-CG variability were therefore i) the cohort ($n=12$), ii) the diet within each cohort ($n=2$) and iii) the pen within diet and within cohort ($1 \leq n \leq 4$ depending on the cohort).

Animals and experimental diets

A total of 588 Charolais bulls (303 ± 25 days old and 393 ± 58 kg of BW at the onset of the experiment) were recorded for feed efficiency during a 200 ± 27 day test. The experimental animals were offspring of 70 known sires and were homogeneously distributed across cohorts and diets according to their sire origin. The two experimental diets had a forage to concentrate ratio close to 60:40, were distributed as total-mixed rations (**TMR**) and based on either corn or grass silage. The grass silage was mainly composed from grasses such as English ray grass or dactyl and legumes as violet clover. The concentrate was always composed of wheat grain and soybean meal, and beet pulp was added in the grass silage diet (Table 1). Both diets were iso-CP but differed slightly in their net energy levels (1.50 [grass silage diet] vs 1.63 [corn silage diet] Mcal/kg of DM, which were calculated following the INRA 2018). Diets differed by the nature of the carbohydrate, showing very contrasted NDF (48% vs

34%) and starch concentrations (6% vs 32%), for grass and corn silage diets, respectively, on a DM basis. Because of the different geographical locations and climatic conditions of farms, the chemical composition of silages changed slightly across cohorts. Therefore; in order to keep feed values as similar as possible for each type of diet, the proportions of feed ingredients varied slightly among cohorts (Table 1). Animals were fed *ad libitum* once a day between 0900 and 1030 and had free access to water throughout the experiment.

Measurements for feed efficiency

Animals underwent an adaptation period of 4 weeks before the FE test to allow them to adapt to facilities and diets. Their age during the FE test varied slightly across cohorts, it ranged from 10 (minimum) to 17 (maximum) at the start of the test, but all FE tests always covered the period between 12 and 15 months of age. Animals were weighed on two consecutive days at the beginning and at the end of the test, and every 28 days in between, always at 1400h. Individual DMI was recorded daily with an automatic intake recording system based on mangers placed on weighing cells (Biocontrol, Rakkestad, Norway). Representative samples from each silo were collected between one and three times per cohort.

Chemical analyses of feeds and calculation of feed values

Chemical composition of silages (n=24) was determined by four different laboratories in France (Départementale d'Analyses du Morbihan [www.morbihan.fr/Ida/laboratoire-departemental], CESAR laboratory [<http://www.labo-cesar.com>], Inovalys [www.inovalys.fr] and INRAE Site de Theix [www6.ara.inrae.fr]) using similar laboratory protocols. Dry matter and organic matter (OM) concentration were determined by oven-drying (103°C and 72h) and subsequent incineration in a muffle furnace at 550°C (NF V 18-101), respectively. Crude protein concentration was analysed by the Dumas method (Ebeling, 1968), NDF according to Van Soest et al. (1991) and cellulose according to the Weende method (Nehring, 1966). In vitro OM digestibility was determined according to Aufrère et al. (2007) and starch was analysed by an enzymatic method (ISO 15914:2004). Feed values of silages, as defined by INRA (2018), were calculated from their chemical composition using the Prevalim® software (<https://wwwdev.okteo.fr/>).

The chemical composition and feed values of concentrate ingredients were obtained from tabulated values (INRA, 2018). Thereafter, the feed values of the complete diets, integrating the digestive interactions, were estimated through the Inration V5® software (<https://wwwdev.okteo.fr/>) from the measured (silages) or estimated (concentrates) chemical composition of ingredients, the ingredient composition of diets, and the observed average feeding level (DMI as %BW). Estimated dietary feed values included net energy (Mcal/kg DM), metabolisable protein (g/kg DM), rumen protein balance (g/kg DM), microbial protein synthesis (g/kg DM) and the rumen degradable protein (% CP). Finally, we estimated for each animal the fecal endogenous protein losses (FEPL) from the observed DMI and the non-digestible OM of the diet (INRA, 2018) as follows:

Fecal endogenous protein losses (g/d) = DMI (kg/d) x (0.5 x (5.7+0.074 x non-digestible OM (g/kg DM))

Blood sampling and analyses

Blood samples were obtained from each animal one month before the end of test at an animal age of 477 ± 27 days. Sampling was done before meal distribution between 0800 and 1100 h. Blood was obtained by coccygeal venipuncture and collected into two tubes of 9 ml each (BD vacutainer, Plymouth, UK) containing either lithium heparin or ethylenediaminetetraacetic acid. Tubes were centrifuged at $2\,500 \times g$ during 10 min at room temperature. The tube containing lithium heparin was used for the determination of plasma proteins ^{15}N natural abundance ($\delta^{15}\text{N}$), while the other containing EDTA was used for plasma urea analysis. Plasma was stored at -80°C until laboratory analyses. Urea concentration was analysed in duplicate for each plasma sample (1.5 ml) by spectrophotometry with an automated analyser (Arene 20XT, Thermo Scientific, Vaanta, Finland). The accuracy profile (NF V03-110: 2010) of the method determined for concentrations ranging between 0.05 and 0.90 g/l yielded an average accuracy of 101% and an average CV for replicates of 8%.

The $\delta^{15}\text{N}$ was determined in plasma proteins isolated by precipitation by adding 15 μL of a sulfosalicylic acid solution (1g/ml) into 300 μL of plasma. Supernatant and pellet were separated after 15 min of centrifugation (5 000 g at 4°C) followed by 1 h of storage at 4°C . The pellet was rinsed three times with MilliQ water and freeze-dried. The $\delta^{15}\text{N}$ values were determined using an isotope-ratio mass spectrometer (Isoprime Vision; Elementar France) coupled to an elemental analyser (Vario cube; Elementar France) as described in Cantalapiedra-Hijar et al. (2020a). International standards (glutamic acid) were included in each run every 10 samples to correct for possible time-variations in the analysis. Results were expressed using the delta notation according to the following equation:

$$\delta^{15}\text{N} = [(R_{\text{sample}} / R_{\text{standard}}) - 1] \times 1\,000,$$

where R_{sample} is the N isotope ratio between the heavier isotope and the lighter isotope ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) for the sample being analysed, R_{standard} the N isotope ratio between the heavier isotope and the internationally defined standard (atmospheric N_2 , $R_{\text{standard}} = 0.0036765$), and δ is the delta notation in parts per 1 000 (‰) relative to the standard. Samples were analysed in duplicates and measurements errors for the analysed internal standard were lower than 1.1%CV. Through the manuscript, the $\delta^{15}\text{N}$ of plasma proteins will be referred to as plasma $\delta^{15}\text{N}$.

Feed efficiency calculations

The average daily gain (**ADG**) was calculated for each animal by regressing its BW over the time on test. Mid-test BW was calculated from the intercept and slope of the regression equation and using the mean time between the start and the end of the FE test. Mid-test BW was then expressed as mid-test metabolic BW by raising the former to the power of 0.75 ($\text{BW}^{0.75}$). The individual daily DMI was calculated as the average daily DMI throughout the test period. The FCE was calculated as the ratio between ADG and average DMI.

RFI was determined as the difference between observed DMI and the DMI expected for a given mid-test metabolic BW ($\text{BW}^{0.75}$) and ADG. To adjust RFI for the effect of CG, the RFI model included it as a fixed effect (Arthur et al. 2001) as follows:

$$Y = \beta_0 + \text{CG} + \beta_1 (\text{BW}^{0.75}) + \beta_2 (\text{ADG}) + e \quad (\text{Eq. 1})$$

where Y is the observed individual daily DMI, β_0 is the intercept, CG is the CG effect, β_1 is the regression coefficient for $BW^{0.75}$, β_2 is the regression coefficient for ADG, and e is the residual of the model or RFI.

Statistical analyses

Statistical analyses were performed in R (RStudio Core Team, version 1.1.463, 2018). All variables were tested for normality with the Lillie test and homoscedasticity within each environmental factor included in the CG effect (cohort, diet and pen) with the Levene test (Nortest package in R). Differences between treatments (diets) were tested through parametric (variables with normal distribution) or non-parametric (variables with non-normal distribution; Kruskal-Wallis test) analysis and declared significant when $P \leq 0.05$.

Analysis of sources of variation

First, the between-animal variability expressed as CV (%) was calculated dividing the SD observed within-CG (SDr) by the average values of recorded traits (Bender et al. 1989). In the case of RFI, with an average value equal to 0, we divided SDr by the average value of DMI.

We also determined the influence of each environmental factor (cohort, diet nested within cohort, and pen nested within diet and cohort) on animal performances and candidate plasma biomarkers values. For this, variance-estimates component analyses were conducted with mixed-effect models to obtain the contribution of each random environmental factor:

$$Y = \beta_1 + E_c + E_d + E_p + \varepsilon \quad (\text{Eq.2})$$

β_1 is the mean value of the parameters in the population of individuals. The deviations from the mean values are represented by the random effects of the cohort (E_c), the diet within cohort (E_d) and the pen within diet within cohort (E_p). Finally, ε represents the residual error of the model, which includes the between-animal variation and the experimental error (Fisher et al. 2017).

The Intra-class correlation coefficient (**ICC**), which represents the percentage of variance explained by each random environmental factor, was calculated as follows:

$$\text{ICC} = \sigma_i^2 / (\sigma_c^2 + \sigma_d^2 + \sigma_p^2 + \sigma_r^2) \quad (\text{Eq.3})$$

where, σ_i^2 refers to the between-class variability (i.e. variance ascribed to each random experimental factor) and $\sigma_c^2 + \sigma_d^2 + \sigma_p^2 + \sigma_r^2$ represents the total variance including the within-CG variability (σ_r^2).

Relationships between feed efficiency indices and candidate plasma biomarkers

To evaluate the relationships between FE indices and candidate plasma biomarkers at individual level, it was necessary to remove all environmental factors contributing to the observed variability across-CG and only keep the observed variability within each CG group (i.e between-animal variability). For this, two different statistical approaches were applied.

i) Removing the between-contemporary group variability before linear regression analysis. The random effect of the CG was removed from raw values of each variable (Phuong et al. 2013; Cantalapiedra-Hijar et al. 2018b) by running the same model as shown in Eq. 2 and storing the obtained residuals (ε). Eq. 3 was applied to both candidate biomarkers and FCE. However, because RFI was already adjusted for the CG effect, this initial step was not applied to this index. Residuals of FE indices (FCE or RFI) were then linearly regressed (as dependent Y variable) against the residuals of the candidate plasma biomarkers (X) with the `lm` function in the R software.

In addition, we evaluated whether combining both candidate plasma biomarkers (plasma $\delta^{15}\text{N}$ and urea concentrations) improved the explanation of the FE variance. For this, we first checked absence of multicollinearity through a variance inflation factor (**VIF**) test by the Car package, where values below 5 were indicative of non-correlated variables (Vatcheva et al. 2016). Then, we tested the multivariable linear model as follows:

$$Y = (\beta_1 \times X) + (\beta_2 \times Z) + \varepsilon \text{ (Eq. 4)}$$

where Y, X, Z are FE values (one equation for each index), plasma $\delta^{15}\text{N}$ values and plasma urea values respectively, with β_1 and β_2 being the slopes of plasma $\delta^{15}\text{N}$ and plasma urea, respectively. Comparisons between models were conducted through Anova analysis.

ii) Accounting for the between-contemporary group variability through mixed effect models. The mixed-effect model analysis aimed to determine if biomarkers were significantly correlated to FE indices at individual level (within-CG) and to evaluate to what extent the two contrasted dietary conditions influenced this relationship. For this, we first attempted to consider the diet as a fixed effect. However, given the complex nested structure of our experimental network (Fig. 1), where the pen is nested within the diet, we decided to separate the database into two sub-databases, one for each diet (n=294 for each one). This allowed the effect of pen to be considered as a random effect nested to the cohort. The $\delta^{15}\text{N}$ individual values were zero-centered to avoid the expected correlation between intercept and slope occurring when values from the independent variable are far from zero (Pinheiro and Bates, 2002).

Different structures of random effect, from simple (with only the cohort effect) to nested (including the pen effect within the cohort) were tested on both intercept and slope as here detailed:

$$Y = (\beta_0 + B_0) + (\beta_1 + B_1) \times X + \varepsilon \text{ (Eq.5)}$$

where Y and X are FCE and $\delta^{15}\text{N}$ values, respectively, β_0 and β_1 are the fixed coefficients for the intercept and the slope respectively; B_0 and B_1 are the random coefficients of environmental factors (cohort and pen within cohort) and ε are the distributed within-groups errors, assumed to be independent of random effects. The best random structure was identified from AIC and BIC criteria and using the restricted maximum likelihood method in the nlme package.

To evaluate the diet effect on the potential of the candidate biomarker to reflect FE variations we compared the slope (β_1) of both models through a t-test. For this, we took into account the coefficient of slopes and their associated errors as well as the degrees of freedom of both sub-databases (Andrade and Estévez-Pérez, 2014). We also extracted the proportion of model's variance explained by random and fixed effect through the package r.squaredGLMM in the library MuMin.

Animal performances of individuals presenting extreme high-vs-low $\delta^{15}\text{N}$ values

We ranked animals within-CG according to their $\delta^{15}\text{N}$ values and then selected those above the 90th percentile (High $\delta^{15}\text{N}$ values) and those below the 10th percentile (Low $\delta^{15}\text{N}$ values). Differences in animal performances and plasma biomarkers between these two groups (High vs Low) were conducted by Anova by including the effect of diet, group and its interaction.

Influence of dietary characteristics on the relationships at cohort level

We aimed to evaluate whether some characteristics of the experimental diets could influence the ability of candidate plasma biomarkers to reflect the between-animal variation in FE. Therefore, we first

obtained the 24 individual slopes (responses) from the FE index - biomarker relationships determined for each combination of diet and cohort (i.e. 24 unique conditions sharing exactly the same diet x cohort). Half of these individual slopes (12) were obtained with grass-diets and the other half with corn-diets. The 24 slopes coefficients were regressed against their 24 corresponding feed values and diet chemical composition. The model utilized to evaluate these regressions were an ANCOVA analysis, where the FE-biomarker slopes represented the dependent variable (Y), the type of diet (n=2) was the categorical variable (X_1) and feed values or chemical composition were the numeric variable (X_2). Thus, we evaluated P value of both dependent variables and their interaction. When significant relationships were obtained, the relevant diet characteristic was considered as having an impact on the response of the candidate plasma biomarker to FE variations.

Model's evaluation and cross-validation

We first compared the quality of the different FE index - biomarker relationships. The simple linear models based on residuals were compared based on their P value, R^2 , AIC and root mean squared error (**RMSE**) to SD ratio (**RSR**), which allows comparing residual variables as RFI with mean intercept values equals to 0. The mixed effects models were compared based on their RSR and CV, calculated as the RMSE divided by the average of the variable Y. Fit was considered good when $R^2 > 0.50$ and $RSR < 0.70$ as recommended by Moriasi et al. (2007). Finally, normality of residuals was tested with the Shapiro Wilk's test (function `shapiro.test` in R) for every model.

We then evaluated the conditions of use of the $\delta^{15}\text{N}$ biomarker relative to each FE index using a Kfold cross-validation (James et al. 2013) performed from simple linear models based on residuals. The database was randomly split in 10 sub-database (package `Caret`) and each individual sub-database was treated as a validation set. The performance of the FE index- $\delta^{15}\text{N}$ relationships obtained from the whole database was defined as the average performance of the FE index- $\delta^{15}\text{N}$ relationships derived after the 10 random iterations from each sub-database for each diet, as in Benaouda et al. (2019). Parameters used to evaluate the FE index - biomarker relationships were the **RMSE** of predicted vs observed values, the correlation between observed and predicted values, the concordance correlation coefficient (**CCC**), as a parameter indicating precision and accuracy of obtained models (Tedeschi, 2006) and the percentage of error in central tendency (**ECT**), or mean bias as the average tendency to under or overestimate the predicted values according to the observed values (Gupta et al. 1999). Finally, we calculated the interval of model's prediction (**IP**) at 95% confidence, which reflects the prediction uncertainty around a single value, as $\pm 1.96 \times \text{RMSE}$ of the model (Bruce and Bruce, 2017).

Genetic parameters estimations

Heritability coefficients, environmental and genetic correlations were estimated for FE indices and candidate plasma biomarkers using the restricted estimation of maximum likelihood method of the Wombat software (Meyer, 2007). In addition to the random additive genetic effect, the model included the contemporary group (72 CG) as fixed effect, age at the start of the test as covariate and a farm origins x year random effect. The relationship matrix among the additive genetic effects included up to the 5th generation from bulls included in the study.

Results

All variables followed a non-normal distribution, except DMI and RFI ($P > 0.05$). Also, these two variables together with plasma urea concentrations did not fulfill homoscedasticity within CG ($P < 0.05$) (Supplementary Table S1).

Animal performances, candidate biomarkers and their sources of variations

The between-animal variability of DMI, ADG, FCE and RFI, expressed as CV, was always below 12% (Table 2). The between-animal variability of the candidate biomarkers however contrasted, 5.33% for plasma $\delta^{15}\text{N}$ and 20.3% for plasma urea concentrations. Concerning the effect of diets (Table 2), animals fed the corn-based diets had higher ADG (+16%; $P < 0.05$), DMI (+4%; $P < 0.05$), FCE (+6%; $P < 0.05$) and plasma urea concentrations (+35%, $P < 0.05$) than animals fed the grass-based diets. On the other hand, animals fed corn-based diets had lower (-13%, $P < 0.05$) plasma $\delta^{15}\text{N}$ values than animals fed grass-based diets.

The cohort factor explained 29%, 19%, 13% and 7% of the total variance of FCE, plasma urea, ADG and DMI, respectively, but had only a minor contribution to the variability of plasma $\delta^{15}\text{N}$ (Table 2). The diet effect (within cohort) strongly contributed to the variability of all variables explaining 70%, 46%, 45%, 33% and 21% of the total variance observed in plasma $\delta^{15}\text{N}$, plasma urea, ADG, FCE and DMI, respectively. Finally, the pen effect (within diet and within cohort) only explained less than 10% of the total variance of the variables except for DMI (16%). The residual part of the variance, i.e. the between-animal variation, represented a large and significant part of the total variance of DMI (55%), ADG (40%), FCE (33%), plasma $\delta^{15}\text{N}$ (25%) and plasma urea (29%).

Relationships between candidate plasma biomarkers and feed efficiency indices at the individual level

All the simple linear models on residuals ($P > 0.58$) and the mixed effect models ($P > 0.37$) showed normal residuals. Models obtained for FCE were consistent, whatever the statistical methodology considered [removal (Table 3 and Fig. 2) or inclusion (Table 4 and Fig. 3) of the factors that significantly contributed to the GC in the model]. Plasma $\delta^{15}\text{N}$ was negatively correlated to the between-animal variability of FCE with both approaches ($P < 0.001$; Table 3 [Eq. 1] and Table 4 [Eq. 10 and 11]). The negative slope of the FCE-plasma $\delta^{15}\text{N}$ relationship was however greater (+35%, $P < 0.05$) with the corn than with the grass based diets in the mixed effects models analysis. Concerning plasma urea concentrations, they were non-significantly related to FCE whatever the approach (Table 3 [Eq. 2]; Supplementary Figure S1). In the case of RFI, the simple linear regression showed significant positive correlations with both plasma $\delta^{15}\text{N}$ ($P < 0.001$; Table 3) and plasma urea concentrations ($P = 0.04$), despite the poor fitting ($R^2 = 0.00$) obtained with the latter biomarker.

When the variability due to contemporary group was removed before linear regression, the best models (based on R^2 , AIC and RSR) were obtained for plasma $\delta^{15}\text{N}$ whatever the FE index. Combining both candidate biomarkers in the same model (Eq. 3 and 6 in Table 3) did not further improve the fit ($P > 0.20$). It had first been verified that plasma $\delta^{15}\text{N}$ and urea presented no-multicollinearity (VIF=1.02).

The FCE- $\delta^{15}\text{N}$ mixed-effect model (Table 4) was better in terms of RSR and error (CV) when animals were fed the corn as compared to the grass-based diets. In addition, the biomarker explained a higher percentage (17% vs 12%) of model's variance with the corn vs grass-based diets.

Performances and candidate plasma biomarkers of extreme animals

Animals identified as having the 10% highest and lowest plasma $\delta^{15}\text{N}$ values were selected as extreme individuals (Table 5), and showed differences in $\delta^{15}\text{N}$ averaging 1.02‰ (18%CV). Compared to animals with the highest plasma $\delta^{15}\text{N}$ values, those showing lowest values had lower DMI, fecal endogenous protein losses (FEPL) and plasma urea concentrations ($P < 0.001$), but greater feed efficiency ($P < 0.001$). No interactions were observed between extreme $\delta^{15}\text{N}$ groups (highest vs lowest) and diet ($P > 0.05$) on these analyzed parameters.

Influence of diet characteristics on the relationship between plasma $\delta^{15}\text{N}$ and feed efficiency

For this analysis, we removed two grass-based diets out of the 12 from our database because of 1) they were considered as outliers in most of the relationships (> 2.5 SD) and 2) biologically, the net energy concentrations of silages were low resulting in a lower average net energy intake (-10%) per average $\text{BW}^{0.75}$. Therefore, the number of observations used in this analysis was 22 rather than 24. In addition, because in the plasma urea-FCE relationship the diet effect was not significant ($P > 0.05$), the influence of diet characteristics was only analysed for the plasma $\delta^{15}\text{N}$ -FE index relationships. Graphs showing relationships at cohort level between plasma $\delta^{15}\text{N}$ and FE indices are shown in Supplementary Figure S2 (FCE in panel A and RFI in panel B).

We found that the higher the metabolisable protein to net energy ratio of the diet the greater the slope of the plasma $\delta^{15}\text{N}$ - FCE relationship ($P = 0.002$; Fig. 4, panel 1) and a similar trend for the rumen protein balance ($P = 0.10$; Fig. 4, panel 2). Concerning RFI, the higher the rumen N degradability of diets the greater the slope of the plasma $\delta^{15}\text{N}$ -RFI relationship ($P = 0.004$; Supplementary table S2). Details of the influence of the other dietary characteristics on the slope of plasma $\delta^{15}\text{N}$ -FCE and RFI relationships are presented in Supplementary Table S2.

Plasma $\delta^{15}\text{N}$ biomarker ability to discriminate between-animal variation of feed efficiency

The cross-validation was only carried out for the best-fitted plasma $\delta^{15}\text{N}$ models (Eq: 1 and 4 from table 3). The plasma $\delta^{15}\text{N}$ was found to capture the difference in FE between two individuals sharing the same diet as long as the difference in FE is higher than 0.049 g/g for FCE and 1.67 kg/d for RFI (interval of prediction in Table 6). However, the CCC of both models was low, accounting 0.33 and 0.16 for FCE and RFI, respectively. In addition the two FE index- $\delta^{15}\text{N}$ models presented a slightly under (4%) and overestimation (-3%), for FCE and RFI respectively, and the accuracy (r and CCC) to predict FCE was better than to predict RFI from $\delta^{15}\text{N}$.

Genetic and environmental correlations

We determined if phenotypic relationships between FE indices and candidate biomarkers involved genetic or environmental factors (Table 7). First, the heritability values were moderate for FE indices ($h^2 = 0.18$ for FCE and $h^2 = 0.22$ for RFI) and plasma biomarkers ($h^2 = 0.27$ for plasma urea and 0.28 for $\delta^{15}\text{N}$).

Concerning genetic correlations, RFI showed no-correlation with FCE ($r_g < 0.05$). Both candidate plasma biomarkers showed no genetic correlations with FCE ($r_g < 0.20$) and moderate genetic correlation with RFI ($r_g = 0.38$ and 0.27 for plasma $\delta^{15}\text{N}$ and urea concentration, respectively), however the associated errors were large to consider significant these relationships. Concerning the environmental correlations, they were high between FCE and RFI ($r_e = -0.61$) and between plasma $\delta^{15}\text{N}$ and FCE ($r_e = -0.55$), but moderate between $\delta^{15}\text{N}$ and RFI ($r_e = 0.26$), and low between plasma urea concentrations and both FE indices ($r_e < 0.15$). Also, moderate genetic correlations ($r_g = 0.28$) and low environmental correlations ($r_e = 0.14$) were found between both biomarkers.

Discussion

Moderate between-animal variability exists for FE (Berry and Crowley, 2012). Genetic selection programs may exploit this moderate between-animal variability by selecting the FE superior animals for breeding, and biomarker-assisted genetic selection may contribute to accelerate the genetic progress through rapid identification of superior animals. Today, however, no validated biomarker, genetically linked to FE, has been proposed for beef cattle. Part of the difficulty to identify biomarkers of the between-animal variability of FE is due to a methodological limitation. Indeed, a non-negligible proportion of the measured between-animal variation, within a pen, is not ascribed to the true between-animal variability but to the experimental error, which can be as high as 50% (Fischer et al. 2017).

In this study, we tested two biomarkers of the N use efficiency in ruminants (i.e plasma urea concentration [Kohn et al. 2005] and plasma $\delta^{15}\text{N}$ [Cantalapiedra-Hijar et al. 2018b]) and their ability to reflect FCE and RFI, using a large experimental setup of young bulls ($n = 588$) raised under similar conditions. As further discussed in the following sections our results highlight that plasma $\delta^{15}\text{N}$ is significantly and phenotypically correlated to the between-animal variations of FE, regardless of the FE index used, but with diet-dependent responses. Also these significant phenotypic correlations might be mostly due to non-identified environmental factors rather than to genetic ones. In contrast, plasma urea concentrations were only weakly, though significantly, correlated with RFI and not significantly with FCE.

Plasma $\delta^{15}\text{N}$ vs urea as candidate biomarkers

Both the plasma $\delta^{15}\text{N}$ and urea are recognised biomarkers of the N use efficiency. They are both strongly impacted by the balance between ammonia release from dietary CP degradation and ammonia uptake by rumen bacteria (i.e. rumen protein balance) and the hepatic amino acid catabolism (Wattiaux and Reed, 1995; Cantalapiedra-Hijar et al. 2015; INRA, 2018). These two mechanisms determine most of the variations in NUE in ruminants (INRA, 2018) and explain the relationship between both candidate biomarkers and NUE in ruminants (Huhtanen et al. 2015; Cantalapiedra-Hijar et al. 2018b). Also given the biological link that exists between N use efficiency and FE (Nasrollahi et al. 2020; Liu and VandeHaar, 2020), we anticipated significant relationships between both candidate biomarkers and FE.

Our results confirm that both biomarkers are significantly related to between-animal variations in FE, but not to the same extent. Plasma $\delta^{15}\text{N}$ is a better biomarker than plasma urea. If the potential of blood or milk urea concentration to predict the mean N use efficiency is well established for groups of ruminants (Kohn et al. 2005), reports highlighted its inability to phenotypically (Hof et al. 1997; Dechow et al. 2017; Huhtanen et al. 2015) or genetically (Sebek et al. 2007; Vallimont et al. 2011; Beatson et al. 2019) reflect the between-animal variation in N use efficiency. In the present study, both

biomarkers were significantly and positively correlated, but only weakly ($r = 0.21$; $P < 0.001$). Therefore, the potential of plasmatic $\delta^{15}\text{N}$ and urea concentration may depend on the specific pathways originating these biomarkers but not shared in common between them, which may be related or not to N metabolism. We argue that the different ability of plasma $\delta^{15}\text{N}$ and urea to reflect between-animal variations in FE is probably due to mechanisms such as post-absorptive kinetics, urea recycling and endogenous N as discussed below.

First, the most likely and prominent factor that explains the within-CG variability of plasma urea, is related to its postprandial variation. A considerable diurnal variation in plasma urea concentration has been widely reported in the literature associated to the daily pattern and frequency of feed intake (Gustafsson and Palmquist, 1993; Hwang et al. 2001). Because blood sampling lasted 3-4h per cohort, and because strictly speaking animals were not completely fasted (leftovers remained in the automatic feeder before sampling), we could argue that blood urea was not determined exactly at the same postprandial moment for all animals. In contrast, isotopic signatures remain much more stable in plasma proteins because the short-term fluctuations of plasma $\delta^{15}\text{N}$ values depend on the slow ^{15}N turnover of this protein pool (4.3%/d; Cantalapiedra-Hijar et al. 2019). This may explain why the within-CG variation was much higher for plasma urea vs $\delta^{15}\text{N}$ in our study (20% vs 5% of CV) and elsewhere (25-29% CV for urea [Jonker et al. 1998; Krogh et al. 2019] vs 13% CV for $\delta^{15}\text{N}$ [Cantalapiedra-Hijar et al. 2018b]).

Second, we considered whether renal urea reabsorption and clearance rate, hydration status and animal BW (reviewed by Spek et al. 2013) could explain why the between-animal variation are greater for plasma urea concentration than for N use efficiency or $\delta^{15}\text{N}$ values, but we had no data to support it. Instead and although somehow speculative and counter-intuitive, we hypothesise that urea-N recycling and endogenous urinary N excretion (INRA, 2018) might have a greater impact on plasma $\delta^{15}\text{N}$ than on urea concentration, and thus may further explain the better ability of the $\delta^{15}\text{N}$ to catch the between-animal variability of FE. Urea recycling in beef cattle can be high and may contribute to increase the digestible N inflow from 43% to 85% (Lapierre and Lobley, 2001). But plasma urea is depleted in ^{15}N relative to the diet (Sutoh et al. 1993), and thus, this extra N entering the rumen could, once degraded into ammonia and assimilated, decrease the naturally enriched rumen bacteria (Cantalapiedra-Hijar et al. 2016). This N conservation mechanism in ruminants would further deplete animal proteins in ^{15}N and thus strengthen the negative relationship between N use efficiency and plasma $\delta^{15}\text{N}$ usually found in ruminants (Cantalapiedra-Hijar et al. 2018b). Conversely, plasma urea concentration is only weakly correlated to urea transfer into the rumen through the epithelium (i.e. portal drained viscera net flux) according to the review by Lapierre and Lobley (2001), which may partly explain the weak relationship between plasma urea and N use efficiency.

Finally we speculate that animal variation in endogenous urinary N losses, which represent on average 20-30% of total urinary N excretion (INRA, 2018) and an estimated 13% of the total N intake in our database (INRA, 2018; data not shown), would only affect plasma $\delta^{15}\text{N}$. While the urinary urea excretion is highly related to the hepatic urea synthesis and plasma urea concentration (Kohn et al. 2005), other urinary N compounds (e.g. creatine, creatinine, endogenous purine derivatives, methylhistidine and other free amino acids) are related to the endogenous protein renewal (Da Silva Braga et al. 2012). Because, animal protein mobilization highly affect both NUE and $\delta^{15}\text{N}$ values of animal proteins in ruminants (Chen et al. 2020), it can be hypothesized that NUE changes associated to endogenous protein metabolism might affect, and only $\delta^{15}\text{N}$ of plasma proteins without necessarily impacting the plasma urea concentration.

Taken together we consider that animal factors affecting N use efficiency and thus FE variation are better signed by plasma $\delta^{15}\text{N}$ than by urea because the former is more stable in time and likely reflects

some specific metabolic pathways related to N partitioning. Therefore, the following sections will only discuss the limits and potential of plasma $\delta^{15}\text{N}$ to reflect the between-animal variation of FE.

The potential of plasma $\delta^{15}\text{N}$ depends on the feed efficiency criteria

This is the first study showing by regression a significant relationship between plasma $\delta^{15}\text{N}$ and RFI (Previous non-significant results; Wheadon et al. 2014; Meale et al. 2017). This relationship was however much weaker than that obtained between plasma $\delta^{15}\text{N}$ and FCE. Although FCE and RFI were statistically related in this work ($r = -0.29$; $P < 0.001$) and share common biological processes related to FE, their biological determinants are not exactly the same (Taussat et al. 2020). While FCE favors the selection of growth traits with inconsistent intake responses (Arthur and Herd, 2012), selection based on RFI will downward feed intake without any impact on animal performances (Arthur et al. 2004). This would have implications in the way the energy and protein are allocated with both criteria (Rauw, 2012), and may explain why plasma $\delta^{15}\text{N}$ correlated better with FCE than with RFI. Here, we discuss some statistical and biological reasons that may explain why the correlation between plasma $\delta^{15}\text{N}$ and RFI found in the present study or previously reported is weak or null (Wheadon et al. 2014; Meale et al. 2017).

First, from a statistical point of view, it can be expected that biomarkers correlate better with phenotypes presenting higher variability. In the present study, the within-CG variance was twofold higher for FCE (9.37% CV) than for RFI (4.54% CV) in agreement with previous studies (Wheadon et al. 2014; Meale et al. 2017). Thus, the difficulty of plasma $\delta^{15}\text{N}$ to detect RFI variations could stem in part from the lower between-animal variability observed with RFI compared to FCE. Moreover, RFI being a residual it includes measurement errors (Fischer et al. 2017), which likely hampers the ability of plasma $\delta^{15}\text{N}$ to detect the true between-animal variability in FE when measured as RFI.

Second, while from a biological point of view plasma $\delta^{15}\text{N}$ is primarily a biomarker of N use efficiency (Cantalapiedra-Hijar et al. 2018b), it can be simply argued that FCE and RFI just differ in the way they are related to N use efficiency. FCE and N use efficiency share a similar calculation principle based on the ratio between performances and intake, and thus correlations between both of them is mathematically expected and have been experimentally proven (Cantalapiedra-Hijar et al. 2015; Nasrollahi et al. 2020). Conversely, the relationship between N use efficiency and RFI has not been experimentally observed (Lines et al. 2014; Carmona et al. 2020; Da Silva et al. 2020) despite the fact that efficient RFI animals are supposed to eat less CP while retaining an equal (or a greater) amount of body protein. More work is warranted to confirm that efficient RFI cattle upregulate N conservation mechanisms (Cantalapiedra-Hijar et al. 2020b) to the same extent as efficient FCE animals do (Arndt et al. 2015).

Third, because RFI is highly and consistently related to feed intake (Taussat et al. 2019), efficient RFI animals usually present higher rumen retention time and DM digestibility than inefficient RFI animals (Fitzsimons et al. 2014; Bonilha et al. 2017). This would lead to a proportionally greater availability of substrates for rumen bacteria in efficient RFI animals, with the consequently greater N isotope fractionation occurring in the rumen (Wattiaux and Reeds, 1995) by unit intake. This can counterbalance the expected positive relationship between FE and plasma $\delta^{15}\text{N}$. We termed this phenomenon a “rumen interference” in the ability of plasma $\delta^{15}\text{N}$ to detect FE variations. In this regard, a high contribution of the rumen efficiency to the overall FE was suggested as the reason for the weak relationship observed between milk $\delta^{15}\text{N}$ and N use efficiency in dairy cows (Cabrita et al. 2014). Likewise, Nasrollahi et al. (2020) identified in some conditions a yet unknown rumen effect lowering the ability of isotopic N discrimination to reflect between-animal variation in FE. Consequently, we supposed that the ‘rumen

interference' effect would mostly perturb the relationship between plasma $\delta^{15}\text{N}$ and RFI but not that between plasma $\delta^{15}\text{N}$ and FCE. Finally, FEPL could also contribute to the low correlation of plasma $\delta^{15}\text{N}$ with RFI. Because the higher the DMI the greater the FEPL (INRA, 2018), the positive correlation between RFI and DMI found in our study ($r = 0.57$; $P < 0.001$) may suggest differences in FEPL between animals RFI efficient and non-efficient. Although FEPL represent a net N loss from the animal, and so may impact FE, these losses does not involve enzymatic reactions (i.e. desquamated epithelium and intestinal secretions) nor isotopic fractionation. Therefore, the estimated FEPL were positively correlated to RFI ($r = 0.28$; $P < 0.001$), which could have lowered FE of high RFI phenotypes without increasing plasma $\delta^{15}\text{N}$ values. Because FCE, in contrast to RFI, presented no correlations with DMI in our study ($r = -0.06$; $P > 0.05$) no changes at the rumen level were expected across the FCE extreme cattle.

The potential of plasma $\delta^{15}\text{N}$ to capture variations in feed conversion efficiency also depends on the type of diet

The present study confirmed preliminary results obtained from a sub-set of animals of the present experimental setup (Nasrollahi et al. 2020), where the slope of the FCE-plasma $\delta^{15}\text{N}$ relationship was significantly higher with diets high in starch vs high in fibre (Eq. 10 vs 11 in Table 4). It also supported our previous meta-analysis, which suggested that the relationship between the isotopic N discrimination and N use efficiency could be diet-dependent (Cantalapiedra-Hijar et al. 2018b). More specifically, the slope of the FCE-plasma $\delta^{15}\text{N}$ relationship was affected by the farm-to-farm and year-to-year variations in feed composition (Supplementary Figure S2). To precisely assess which variables could explain the diet-to-diet variability, we characterised the experimental diets according to INRA (2018) (Supplementary Table S2).

The rumen protein balance, representing the difference between the protein intake and the protein flowing at duodenum (INRA, 2018), was an important dietary factor that explained the influence of dietary conditions on the ability of plasma $\delta^{15}\text{N}$ to reflect FCE variations (Fig. 4B). The higher the rumen protein balance (i.e. higher rumen ammonia absorption compared to urea recycle into the rumen), the smaller the slope of the FCE-plasma $\delta^{15}\text{N}$ relationship. In other words, when rumen protein balance was above requirements (between 0 and -12 for 300 - 600 kg BW; INRA, 2018), the ability of plasma $\delta^{15}\text{N}$ to reflect FCE variations decreased. This analysis reinforces our hypothesis about a "rumen interference" in the relationship between $\delta^{15}\text{N}$ and FE variation. In this sense, diets with high rumen degradable N concentration and leading to high rumen protein balance showed low or no correlations between $\delta^{15}\text{N}$ and FE or NUE in several previous studies in ruminants (Cheng et al. 2013; Cabrita et al. 2014; Nasrollahi et al. 2020). Furthermore, in the present study, high-fibre diets presented a higher proportion of metabolisable protein coming from microbial vs dietary origin (+7%; $P = 0.02$), which may increase the N isotopic fractionation at rumen level (Wattiaux and Reed, 1995) and consequently interfering in a greater extent on the expected relationship between plasma $\delta^{15}\text{N}$ and FE.

The metabolisable protein to net energy ratio, which represents the amount of metabolisable protein for a given net energy level, was also identified as a dietary factor explaining differences in the slope of the plasma $\delta^{15}\text{N}$ - FCE relationship (Fig. 4A). Indeed, when this ratio was above requirements (between 48 and 53, irrespective of the diet for 300 - 600 kg BW; INRA, 2018) the slope approached zero and reflected the inability of plasma $\delta^{15}\text{N}$ to catch FCE variations at high metabolisable protein to net energy levels. It is known that amino acid catabolism increases when the metabolisable protein to net energy ratio increases (Hanigan et al. 1998), and thus our results may suggest that between-animal variability would be lower when diets promoted greater amino acid catabolism.

Potential and limits of plasma $\delta^{15}\text{N}$ to predict feed efficiency

Unfortunately, the size of our experimental setup although important ($n = 588$) was too restricted to detect any significant genetic correlations between plasma $\delta^{15}\text{N}$ and FE (FCE and RFI). This implies that the significant phenotypic relationships found between the plasma $\delta^{15}\text{N}$ and FE were mostly due to non-identified environmental factors. Because diet conditions were controlled in our study, we speculate that other environmental factors could be involved such as the previous background of animals (pre-weaning and cow-calf period), feeding behaviour (ingredient's selection, dominance or meal duration) and mild subacute diseases during fattening (lameness, rumen acidosis, liver abscess). We are aware that the size of our experimental setup may be a limitation for concluding about genetic correlation. In this regard, Lozano-Jaramillo et al. (2020) established that a population of 2 000 individuals minimum per environment was necessary to minimize the SE of genetic correlations and obtain robust genetic correlations. To the best of our knowledge, studies reporting genetic correlations between biomarkers and FE in beef cattle are very scarce in the literature and none has demonstrated a significant correlation. Nkrumah et al. (2007) reported a genetic correlation of -0.44 and -0.24 between serum leptin concentration and feed conversion ratio (the inverse of FCE) and RFI, respectively, from 813 steers. However, the large SE associated with their estimations (± 0.24 and ± 0.38 for feed conversion ratio and RFI, respectively) made it difficult to conclude to a true genetic association. Similarly, IGF-1 was shown to be genetically correlated to RFI but also with a large associated error (Johnston et al. 2002; Moore et al. 2003). Thus, more studies are warranted to establish genetic relations between FE and plasma $\delta^{15}\text{N}$ with a greater population size.

Concerning the potential of this biomarker for phenotyping animals, our cross-validation model confirmed that plasma $\delta^{15}\text{N}$ could be used as a biomarker to discriminate the FE of two animals from the same CG providing they differ by at least 0.049 g/g in FCE and 1.67 kg/d in RFI (IP in Table 6). The number of animals within the same CG showing at least that difference was calculated to be 30% (198 out of 588) and 6% (35 out of 588) for FCE and RFI, respectively, highlighting once more the better ability of plasma $\delta^{15}\text{N}$ to stablish between-animal difference in FCE than in RFI. These are the percentages of animals that can be discriminated in terms of FE when comparisons are done from two animals randomly selected from the same CG. Logically, when comparisons are done from a group of animals rather than from two randomly selected individuals the statistical power increases. Indeed, animals with the 10% lowest plasma $\delta^{15}\text{N}$ values within-CG had on average significantly higher feed efficiency (+0.021 FCE and -0.47 RFI) than their counterparts having 10% highest plasma $\delta^{15}\text{N}$ values (Table 5). Because of the size of our experimental setup, the biomarker may still significantly discriminate feed efficiency when all experimental animals ($n = 588$) were assigned to either low or high plasma $\delta^{15}\text{N}$ group ($P < 0.001$; data not shown).

Overall, we showed that plasma $\delta^{15}\text{N}$ is capable of capture the between-animal variations of FE in animals fed two contrasting diets. Nevertheless, better results may be expected when using FCE than RFI, and when animals are fed with high-starch vs high-fibre diets.

Conclusion

We demonstrated through an experimental network design and two different statistical approaches, significant phenotypic correlations between plasma $\delta^{15}\text{N}$ and the between-animal variation of FE (FCE and RFI) in fattening cattle. In our conditions, we validated the capability of the isotopic biomarker to

discriminate animals in terms of FE when they differed by at least 0.049 g/g in FCE or 1.67 kg/d in RFI. However, the size of our experimental setup ($n = 588$) was insufficient to show significant genetic correlations between $\delta^{15}\text{N}$ and FE. In addition, because $\delta^{15}\text{N}$ is a well established biomarker of N use efficiency in ruminants, we suggest that efficient FCE and RFI animals may present better N utilization than their less efficient counterparts. Finally, relationships between FE and biomarkers of N use efficiency may depend on the diet and the feed efficiency criteria since better statistical correlations were obtained with high-energy diets and when using FCE over RFI.

Ethics approval

This study was carried out in compliance with the French legislation on animal care. All procedures were approved by the regional ethics committee (Auvergne-Rhône-Alpes, France) and subsequently validated by the French Ministry of Agriculture under the authorization number APAFIS#2930-2015111814299194v3.

Data and model availability statement

The data was not deposited in an official repository. Data are confidential but available to reviewers upon request.

Author ORCIDs

Pablo Guarnido: 0000-0002-5013-0888, Isabelle Ortigues-Marty: 0000-0002-0399-013X, Sebastien Taussat: 0000-0002-3101-9471, Gilles Renand: 0000-0002-0649-7957, Gonzalo Cantalapiedra-Hijar: 0000-0001-9486-8238

Author contributions

Gonzalo Cantalapiedra-Hijar, conceptualization, methodology, formal analysis, investigation, validation, supervision, project administration, funding acquisition; G. illes Renand, Sébastien Taussat and Clément Fossaert: conceptualisation, data curation, formal analysis; Isabelle Ortigues-Marty: conceptualisation, supervision. Pablo Guarnido-Lopez: data curation, formal analysis, writing-original draft. All authors were involved in writing, reviewing & editing the final manuscript.

Declaration of interest

None

Acknowledgements

Authors wish to thank APIS-GENE for their financial support of this project, which forms part of the larger national program BEEFALIM 2020. We also thank Marine Gauthier and Céline Chantelauze (INRAE-UMRH) for their help with the laboratory analyses and the “Chambres d’Agriculture” from Pays de Loire, Bretagne and Saône-et-Loire (France) and the “Herbipôle” staff from INRAE experimental facilities at Theix for their great support in conducting the feed efficiency tests, blood samplings and measurements. In addition, we thank Mohammed Benaouda for its contribution and support in the statistical analysis.

Financial support statement

The project was financially supported by APIS-GENE. The first author received a PhD scholarship from APIS-GENE and INRAE-Phase.

References

- Archer J.A. Richardson E.C. Herd R.M. Arthur P.F. 1999. Potential for selection to improve efficiency of feed use in beef cattle: A review. *Australian Journal of Agricultural Research* 50, 147–161.
- Arndt C. Powell J.M. Aguerre M.J. Crump P.M. Wattiaux M.A. 2015. Feed conversion efficiency in dairy cows: Repeatability, variation in digestion and metabolism of energy and nitrogen, and ruminal methanogens. *Journal of Dairy Science* 98, 3938–3950.
- Arthur P.F. Archer J.A. Herd R.M. 2004. Feed intake and efficiency in beef cattle: Overview of recent Australian research and challenges for the future. In *Australian Journal of Experimental Agriculture*, pp. 361–369. CSIRO.
- Arthur P.F. Archer J.A. Johnston D.J. Herd R.M. Richardson E.C. Parnell P.F. 2001. Genetic and phenotypic variance and covariance components for feed intake, feed efficiency, and other postweaning traits in Angus cattle. *Journal of Animal Science* 79, 2805–2811.
- Arthur P.F. Herd R.M. 2012. Genetic Improvement of Feed Efficiency. In *Feed Efficiency in the Beef Industry*, pp. 93–103. Wiley-Blackwell.
- Aufrère J. Baumont R. Delaby L. Peccatte J.R. Andrieu J. Andrieu J.P. Dulphy J.P. 2007. Prédiction de la digestibilité des fourrages par la méthode pepsine-cellulase. Le point sur les équations proposées. *Productions Animales* 20, 129–136.
- Beatson P.R. Meier S. Cullen N.G. Eding H. 2019. Genetic variation in milk urea nitrogen concentration of dairy cattle and its implications for reducing urinary nitrogen excretion. *Animal* 13, 2164–2171.
- Benaouda M. Martin C. Li X. Kebreab E. Hristov A.N. Yu Z. Yáñez-Ruiz D.R. Reynolds C.K. Crompton L.A. Dijkstra J. Bannink A. Schwarm A. Kreuzer M. McGee M. Lund P. Hellwing A.L.F. Weisbjerg M.R. Moate P.J. Bayat A.R. Shingfield K.J. Peiren N. Eugène M. 2019. Evaluation of the

- performance of existing mathematical models predicting enteric methane emissions from ruminants: Animal categories and dietary mitigation strategies. *Animal Feed Science and Technology* 255, 114207.
- Bender F.E. Douglass L.W. Kramer A. 1989. *Statistical Methods for Food and Agriculture*. CRC Press.
- Berry D.P. Crowley J.J. 2012. Residual intake and body weight gain: A new measure of efficiency in growing cattle. *Journal of Animal Science* 90, 109–115.
- Berry D.P. Crowley J.J. 2013. CELL BIOLOGY SYMPOSIUM: Genetics of feed efficiency in dairy and beef cattle 1. *Journal of Animal Science* 91, 1594–1613.
- Bonilha S.F.M. Branco R.H. Mercadante M.E.Z. Dos Santos Gonçalves Cyrillo J.N. Monteiro F.M. Ribeiro E.G. 2017. Digestion and metabolism of low and high residual feed intake Nellore bulls. *Tropical Animal Health and Production* 49, 529–535.
- Bruce P. Bruce A. O'Reilly Media, 2017. *Practical Statistics for Data Scientists*, 1^o Edition, Gravenstein Highway North, Sebastopol, CA 95472.
- Cabrita A.R.J. Fonseca A.J.M. Dewhurst R.J. 2014. Short communication: Relationship between the efficiency of utilization of feed nitrogen and 15N enrichment in casein from lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 97, 7225–7229.
- Cantalapiedra-Hijar G. Abo-Ismaïl M. Carstens G.E. Guan L.L. Hegarty R. Kenny D.A. Mcgee M. Plastow G. Relling A. Ortigues-Marty I. 2018a. Review: Biological determinants of between-animal variation in feed efficiency of growing beef cattle. *Animal* 12, S321–S335.
- Cantalapiedra-Hijar G. Dewhurst R.J. Cheng L. Cabrita A.R.J. Fonseca A.J.M. Nozière P. Makowski D. Fouillet H. Ortigues-Marty I. 2018b. Nitrogen isotopic fractionation as a biomarker for nitrogen use efficiency in ruminants: A meta-analysis. *Animal* 12, 1827–1837.
- Cantalapiedra-Hijar G. Fouillet H. Chantelauze C. Khodorova N. Bahloul L. Ortigues-Marty I. 2020a. The isotopic nitrogen turnover rate as a proxy to evaluate in the long-term the protein turnover in growing ruminants. *Journal of Agricultural Science* 157, 701–710.
- Cantalapiedra-Hijar G. Fouillet H. Huneau J.F. Fanchone A. Doreau M. Nozière P. Ortigues-Marty I. 2016. Relationship between efficiency of nitrogen utilization and isotopic nitrogen fractionation in dairy cows: contribution of digestion v. metabolism? *Animal* 10, 221–229.
- Cantalapiedra-Hijar G. Guarnido P. Schiphorst A.M. Robins R.J. Renand G. Ortigues-Marty I. 2020b. Natural 15N abundance in specific amino acids indicates associations between transamination rates and residual feed intake in beef cattle. *Journal of Animal Science* 98, 1–7.
- Cantalapiedra-Hijar G. Ortigues-Marty I. Sepchat B. Agabriel J. Huneau J.F, Fouillet H. 2015. Diet–animal fractionation of nitrogen stable isotopes reflects the efficiency of nitrogen assimilation in ruminants. *British Journal of Nutrition* 113, 1158–1169.
- Carmona P. Costa D.F.A. Silva L.F.P. 2020. Feed efficiency and nitrogen use rankings of *Bos indicus* steers differ on low and high protein diets. *Animal Feed Science and Technology* 263, 114493.
- Chen Y.T. McNamara J.P. Ma G.L. Harrison J.H. Block E. 2020. Milk 13C and 15N discriminations as biomarkers of feed efficiency and energy status in early lactation cows. *Animal Feed Science and Technology* 269, 114638.

- Cheng L. Sheahan A.J. Gibbs S.J. Rius A.G. Kay J.K. Meier S. Edwards G.R. Dewhurst R.J. Roche J.R. 2013. Technical note: Nitrogen isotopic fractionation can be used to predict nitrogen-use efficiency in dairy cows fed temperate pasture. *Journal of Animal Science* 91, 5785–5788.
- Dechow C.D. Baumrucker C.R. Bruckmaier R.M. Blum J.W. 2017. Blood plasma traits associated with genetic merit for feed utilization in Holstein cows. *Journal of Dairy Science* 100, 8232–8238.
- Dijkstra J. Oenema O. van Groenigen J.W. Spek J.W. van Vuuren A.M. Bannink A. 2013. Diet effects on urine composition of cattle and N₂O emissions. *Animal : an international journal of animal bioscience* 7 Suppl 2, 292–302.
- Ebeling M.E. 1968. The Dumas Method for Nitrogen in Feeds. *Journal of AOAC INTERNATIONAL* 51, 766–770.
- Fischer A. Friggens N.C. Berry D.P. Faverdin P. 2017. Isolating the cow-specific part of residual energy intake in lactating dairy cows using random regressions. *Animal* 12, 1396–1404.
- Fitzsimons C. Kenny D.A. Mcgee M. 2014. Visceral organ weights, digestion and carcass characteristics of beef bulls differing in residual feed intake offered a high concentrate diet. *Animal* 8, 949–959.
- Golmohammadi G. Prasher S. Madani A. Rudra R. 2014. Evaluating Three Hydrological Distributed Watershed Models: MIKE-SHE, APEX, SWAT. *Hydrology* 1, 20–39.
- Gupta H.V. Sorooshian S. Yapo P.O. 1999. Status of Automatic Calibration for Hydrologic Models: Comparison with Multilevel Expert Calibration. *Journal of Hydrologic Engineering* 4, 135–143.
- Gustafsson A.H. Palmquist D.L. 1993. Diurnal Variation of Rumen Ammonia, Serum Urea, and Milk Urea in Dairy Cows at High and Low Yields. *Journal of Dairy Science* 76, 475–484.
- Hanigan M.D. Cant J.P. Weakley D.C. Beckett J.L. 1998. An Evaluation of Postabsorptive Protein and Amino Acid Metabolism in the Lactating Dairy Cow. *Journal of Dairy Science* 81, 3385–3401.
- Hof G. Vervoorn M.D. Lenaers P.J. Tamminga S. 1997. Milk Urea Nitrogen as a Tool to Monitor the Protein Nutrition of Dairy Cows. *Journal of Dairy Science* 80, 3333–3340.
- Huhtanen P. Cabezas-Garcia E.H. Krizsan S.J. Shingfield K.J. 2015. Evaluation of between-cow variation in milk urea and rumen ammonia nitrogen concentrations and the association with nitrogen utilization and diet digestibility in lactating cows. *Journal of Dairy Science* 98, 3182–3196.
- Hwang S.Y. Lee M.J. Peh H.C. 2001. Diurnal Variations in Milk and Blood Urea Nitrogen and Whole Blood Ammonia Nitrogen in Dairy Cows. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 14, 1683–1689.
- INRA 2018. INRA feeding system for ruminants. Wageningen Academic Publishers.
- James G, Witten D, Hastie T and Tibshirani R 2013. *An Introduction to Statistical Learning*.
- Jensen J.H. 2017. Which method is more accurate? or Errors have error bars. *PeerJ*, 1-3.
- Johnston D. Herd R. Kadel M.J. Graser H. Arthur P. Archer J. 2002. Evidence of IGF-I as a genetic predictor of feed efficiency traits in beef cattle. In 7th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production. Montpellier, France.
- Jonker J.S. Kohn R.A. Erdman R.A. 1998. Using Milk Urea Nitrogen to Predict Nitrogen Excretion and Utilization Efficiency in Lactating Dairy Cows. *Journal of Dairy Science* 81, 2681–2692.

- Kohn R.A. Dinneen M.M. Russek-Cohen E. 2005. Using blood urea nitrogen to predict nitrogen excretion and efficiency of nitrogen utilization in cattle, sheep, goats, horses, pigs, and rats. *Journal of Animal Science* 83, 879–889.
- Krogh M.A. Hostens M. Salavati M. Grelet C. Sorensen M.T. Wathes D.C. Ferris C.P. Marchitelli C. Signorelli F. Napolitano F. Becker F. Larsen T. Matthews E. Carter F. Vanlierde A. Opsomer G. Gengler N. Dehareng F. Crowe M.A. Ingvarsten K.L. Foldager L. 2019. Between- And within-herd variation in blood and milk biomarkers in Holstein cows in early lactation. *Animal* 14, 1067–1075.
- Lapierre H. Lobley G.E. 2001. Nitrogen Recycling in the Ruminant: A Review. *Journal of Dairy Science* 84, E223–E236.
- Lines D.S. Pitchford W.S. Bottema C.D.K. Herd R.M. Oddy V.H. 2014. Selection for residual feed intake affects appetite and body composition rather than energetic efficiency. *Animal Production Science* 58, 175–184.
- Liu E. VandeHaar M.J. 2020. Relationship of residual feed intake and protein efficiency in lactating cows fed high- or low-protein diets. *Journal of Dairy Science* 103, 3177–3190.
- Lozano-Jaramillo M. Komen H. Wientjes Y.C.J. Mulder H.A. Bastiaansen J.W.M. 2020. Optimizing design to estimate genetic correlations between environments with common environmental effects. *Journal of animal science* 98, 2, skaa034.
- Macdonald K.A. Pryce J.E. Spelman R.J. Davis S.R. Wales W.J. Waghorn G.C. Williams Y.J. Marett L.C. Hayes B.J. 2014. Holstein-Friesian calves selected for divergence in residual feed intake during growth exhibited significant but reduced residual feed intake divergence in their first lactation. *Journal of Dairy Science* 97, 1427–1435.
- Makowski D. Piraux F. Brun F. 2019. *From Experimental Network to Meta-analysis*. Springer Netherlands.
- McNamara S. Murphy J.J. Rath M. O'Mara F.P. 2003. Effects of different transition diets on energy balance, blood metabolites and reproductive performance in dairy cows. *Livestock Production Science* 84, 195–206.
- Meale S.J. Morgavi D.P. Cassar-Malek I. Andueza D. Ortigues-Marty I. Robins R.J. Schiphorst A.M. Laverroux S. Graulet B. Boudra H. Cantalapiedra-Hijar G. 2017. Exploration of Biological Markers of Feed Efficiency in Young Bulls. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 65, 9817–9827.
- Meyer K. 2007. WOMBAT: a tool for mixed model analyses in quantitative genetics by restricted maximum likelihood (REML). *Journal of Zhejiang University. Science. B.* 8, 815–821.
- Moore K.L. Johnston D. Herd R. Graser H-U. 2003. Genetic and non-genetic effects on plasma insulin-like growth factor-1 (IGF-I) concentration and production traits in angus cattle. *Livestock library*, 15.
- Moriassi D.N. JArnold J.C. Van Liew M.W. Bingner R.L. Harmel R.D. Veith T.L. 2007. Model Evaluation Guidelines for Systematic Quantification of Accuracy in Watershed Simulations. *Transactions of the ASABE* 50, 885–900.
- Nasrollahi S.M. Meale S.J. Morgavi D.P. Schiphorst A.M. Robins R.J. Ortigues-Marty I. Cantalapiedra-Hijar G. 2020. The origin of N isotopic discrimination and its relationship with feed efficiency in fattening yearling bulls is diet-dependent. *PLOS ONE* 15, e0234344.

- Nehring K. 1966. Crude fibre or crude cellulose. The development of Weende analysis of feedingstuffs. *Archiv für Tierernährung* 16, 77–102.
- Nkrumah J.D. Keisler D.H. Crews D.H. Basarab J.A. Wang Z. Li C. Price M.A. Okine E.K. Moore S.S. 2007. Genetic and phenotypic relationships of serum leptin concentration with performance, efficiency of gain, and carcass merit of feedlot cattle¹. *Journal of Animal Science* 85, 2147–2155.
- Pereira R.J. Schenkel F.S. Ventura R.V. Ayres D.R. El Faro L. Machado C.H.C. Albuquerque L.G. 2018. Contemporary group alternatives for genetic evaluation of milk yield in small populations of dairy cattle. *Animal Production Science* 59, 1022–1030.
- Phuong H. Friggens N. de Boer I. Schmidely P. 2013. Factors affecting energy and nitrogen efficiency of dairy cows: A meta-analysis. *Journal of Dairy Science* 96, 7245–7259.
- Pinheiro J.C. Bates D.M. 2002. *Mixed-Effect Models in S and S-plus*.
- Rauw W.M. 2012. Feed efficiency and animal robustness. In *Feed Efficiency in the Beef Industry* (ed. Rodney A. Hill, DOI:[10.13140/RG.2.1.1436.1688](https://doi.org/10.13140/RG.2.1.1436.1688)), Chapter: Feed efficiency and animal robustness; pp. 105–122.
- Sebek L. L, van Riel J and de Jong G 2007. The breeding value for milk urea as predictor for the efficiency of protein utilization in dairy cows. Report 81 from Animal Sciences Group of Wageningen University, Wageningen, The Netherlands.
- Silfer J.A. Engel M.H. Macko S.A. 1992. Kinetic fractionation of stable carbon and nitrogen isotopes during peptide bond hydrolysis: Experimental evidence and geochemical implications. *Chemical Geology* 101, 211–221.
- Da Silva Braga M.J. Ferreira Diniz Valadares R. Gusmão Pellizzoni S. de Campos Valadares Filho S. Louzada Prates L. Fernando Costa Silva L. 2012. Estimation of endogenous contribution and urinary excretion of purine derivatives from the total digestible nutrient intake in Nellore heifers. *Revista Brasileira de Zootecnia* 41, 1899–1906.
- Da Silva D.C. Ribeiro Pereira L.G. Mello Lima J.A. Machado F.S. Ferreira A.L. Tomich T.R. Coelho S.G. Maurício R.M. Campos M.M. 2020. Grouping crossbred Holstein x Gyr heifers according to different feed efficiency indexes and its effects on energy and nitrogen partitioning, blood metabolic variables and gas exchanges. *PLOS ONE* 15, e0238419.
- Van Soest P.J. Robertson J.B. Lewis B.A. 1991. Methods for Dietary Fiber, Neutral Detergent Fiber, and Nonstarch Polysaccharides in Relation to Animal Nutrition. *Journal of Dairy Science* 74, 3583–3597.
- Spek J.W. Dijkstra J. Van Duinkerken G. Bannink A. 2013. A review of factors influencing milk urea concentration and its relationship with urinary urea excretion in lactating dairy cattle. *Journal of Agricultural Science* 151, 407–423.
- Sutoh M. Obara Y. Yoneyama T. 1993. The effects of feeding regimen and dietary sucrose supplementation on natural abundance of ¹⁵N in some components of ruminal fluid and plasma of sheep¹. *Journal of Animal Science* 71, 226–231.
- Taussat S. Boussaha M. Ramayo-Caldas Y. Martin P. Venot E. Cantalapiedra-Hijar G. Hozé C. Fritz S. Renand G. 2020. Gene networks for three feed efficiency criteria reveal shared and specific biological processes. *Genetics Selection Evolution* 52, 1–14.

- Taussat S. Saintilan R. Krauss D. Maupetit D. Fouilloux M.N. Renand G. 2019. Relationship between feed efficiency and slaughter traits of french charolais bulls. *Journal of Animal Science* 97, 2308–2319.
- Tedeschi L.O. 2006. Assessment of the adequacy of mathematical models. *Agricultural systems* 89, 225-247.
- Tolkamp B.J. 2010. Efficiency of energy utilisation and voluntary feed intake in ruminants. *Animal* 4, 1084–1092.
- Vallimont J.E. Dechow C.D. Daubert J.M. Dekleva M.W. Blum J.W. Barlieb C.M. Liu W. Varga G.A. Heinrichs A.J. Baumrucker C.R. 2011. Short communication: Heritability of gross feed efficiency and associations with yield, intake, residual intake, body weight, and body condition score in 11 commercial Pennsylvania tie stalls. *Journal of Dairy Science* 94, 2108–2113.
- Vatcheva K.P. MinJae L. McCormick J.B. Rahbar M.H. 2016. Multicollinearity in Regression Analyses Conducted in Epidemiologic Studies. *Epidemiology: Open Access* 06 (2), 227.
- Wattiaux M.A. Reed J.D. 1995. Fractionation of nitrogen isotopes by mixed ruminal bacteria. *Journal of Animal Science* 73, 257-266.
- Wheadon N.M. Mcgee M. Edwards G.R. Dewhurst R.J. 2014. Plasma nitrogen isotopic fractionation and feed efficiency in growing beef heifers. *British Journal of Nutrition* 111, 1705–1711.

Tables

Table 1. Ingredients, chemical composition and feed values¹ of the corn and grass based diets fed to Charolais bulls (average values \pm SD of the 12 experimental cohorts)

	Diet	
	Corn	Grass
Ingredients ¹ (% DM)		
Forages		
Corn silage	61.4 \pm 2.2	-
Grass silage	-	60.2 \pm 6.0
Wheat straw	5.8 \pm 1.6	5.5 \pm 1.2
Concentrate		
Wheat grain	20.4 \pm 5.5	8.05 \pm 1.2
Beet pulp	-	20.9 \pm 2.4
Soybean meal	12.4 \pm 2.0	5.25 \pm 1.4
Chemical composition (g/kg DM)		
OM	958 \pm 3.88	909 \pm 13.4
Crude protein	144 \pm 9.69	142 \pm 6.25
NDF	338 \pm 25.3	479 \pm 21.7
Starch	319 \pm 36.2	56.4 \pm 31.0
Starch/NDF (g/g)	0.95 \pm 0.18	0.11 \pm 0.07
Feed Values ²		
Net Energy (Mcal/kg DM)	1.63 \pm 0.04	1.50 \pm 0.06
MP (g/kg DM)	85.6 \pm 2.53	81.4 \pm 3.72
MP/Net energy (g/Mcal)	52.5 \pm 1.12	53.4 \pm 1.88
RPB (g/kg DM)	7.75 \pm 7.22	6.51 \pm 6.81

Abbreviations: OM, organic matter; MP, metabolisable protein; RPB, rumen protein balance calculated as CP intake minus non-ammonia N at the duodenum (INRA, 2018).

¹ The whole ration was complemented (approximately 1% of total DM) with a vitamin-mineral supplement, non-reflected in the table

² Feed values of diets calculated from the measured chemical composition of diets and taking into account digestive interactions (INRA, 2018)

Table 2. Animal performances and candidate plasma biomarkers for Charolais bulls fed a corn or a grass-based diet, their variance-component analysis and CV

Variables	Diet		Variance-component analysis								
	Corn	Grass	Cohort ¹		Diet within cohort		Pen within diet and within cohort		Residual ²		CV (%)
			SDc	ICC (%)	SDd	ICC (%)	SDp	ICC (%)	SDr	ICC (%)	
Animal performances											
DMI (kg/d)	9.82 ± 1.02 ^a	9.44 ± 1.19 ^b	0.30	7.19	0.52	21.6	0.45	16.2	0.83	55.1	8.64
ADG (kg/d)	1.62 ± 0.21 ^a	1.39 ± 0.30 ^b	0.10	12.5	0.19	45.1	0.04	2.00	0.18	40.4	11.8
FCE (g/g)	0.166 ± 0.02 ^a	0.147 ± 0.02 ^b	0.01	28.7	0.02	33.0	0.01	5.28	15.0	33	9.37
RFI (kg/d)	0.00 ± 0.44	0.00 ± 0.47	-	-	-	-	-	-	0.45	100	4.54
Plasma biomarkers											
δ ¹⁵ N (‰)	5.13 ± 0.40 ^b	5.82 ± 0.52 ^a	0.01	0.03	0.49	70.4	0.13	4.95	0.29	24.6	5.33
Urea (g/l)	0.195 ± 0.06 ^a	0.145 ± 0.05 ^b	0.03	18.7	0.04	46.1	0.016	6.09	0.04	29.2	20.3

Abbreviations: CI, confidence interval; FCE, feed conversion efficiency; ICC, intra-class correlation coefficient (calculated as the percentage of total variance explained by each environmental factor); RFI, residual feed intake; SDc, SDd, SDp and SDr, square root values of the cohort, diet, pen and residual variances respectively

Statistics: ^{a,b} Averages with different letters within the same row are significantly different ($P < 0.05$)

¹ Cohort refers to the farm x period combination

² Coefficient of variation calculated as within-contemporary group SD divided by the average value of each variable (except for RFI where the DM intake was used as its average)

Table 3: Linear regression models between feed efficiency indices and candidate plasma biomarkers for Charolais bulls fed two diets, when variability across contemporary groups was previously removed.

FE indices (Y)	N° Eq	Plasma biomarker (X)	Slope $\delta^{15}\text{N}$	Slope Urea	P Value	R ²	AIC	RSR ¹
FCE	1	$\delta^{15}\text{N}^{\text{a}}$	$-0.021 \pm 0.001^{***}$	-	<0.001	0.20	-3280	0.47
FCE	2	Urea ^b	-	$-0.037 \pm 0.018^*$	0.053	0.00	-3044	0.55
FCE	3	$\delta^{15}\text{N}$ & Urea ^a	$-0.023 \pm 0.002^{***}$	$0.006 \pm 0.017^{\text{ns}}$	<0.001	0.20	-3031	0.47
RFI	4	$\delta^{15}\text{N}^{\text{a}}$	$0.468 \pm 0.064^{***}$	-	<0.001	0.10	501	0.95
RFI	5	Urea ^b	-	$1.330 \pm 0.588^*$	0.04	0.00	669	1.00
RFI	6	$\delta^{15}\text{N}$ & Urea ^a	$0.489 \pm 0.069^{***}$	$0.419 \pm 0.577^{\text{ns}}$	<0.001	0.09	584	0.94

Abbreviations: AIC, akaike information criterion; Eq, N° of equation; RSR RMSE-observations standard deviation ratio, calculated as the ratio of the RMSE and the SD of the efficiency index.

Statistics: *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$, ns = non-significant ($P > 0.05$).

^{ab} For a given feed efficiency index, models with different letters are significantly different ($P < 0.05$).

Table 4: Mixed effect regression models between FCE (Y) and plasma proteins $\delta^{15}\text{N}$ for Charolais bulls by diet when the random variability across contemporary groups was accounted

Diet	N° EQ	Intercept $\delta^{15}\text{N}$	Slope $\delta^{15}\text{N}$ (X)	P Value	CV%	RSR	Explained variance ¹ (%)		
							Ran	Biom	Res
Corn based diets	10	0.159*** ± 0.008	-0.024*** $\pm 0.002^a$	<0.001	7.95	0.66	0.55	0.17	0.28
Grass based diets	11	0.153*** ± 0.009	-0.018*** $\pm 0.002^b$	<0.001	15.2	0.77	0.63	0.12	0.25

Abbreviations: CV %; Coefficient of variation calculated as the ratio between RMSE and the average value of FCE by diet, Eq, N° of equation, RSR; RMSE-observations standard deviation ratio, calculated as the ratio of the RMSE and the SD of FCE by diet.

Statistics: *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$; ^{ab} Slopes with different letters are significantly different ($P < 0.05$)

¹ Total variance (across-CG variability) was partitioned into random (Ran), biomarker (Biom) and residual (Res).

Table 5: Animal performances, candidate plasma biomarkers and FEPL from high and low extreme $\delta^{15}\text{N}$ Charolais bulls (90th and 10th percentile) by diet

Diet	Grass-based diets		Corn-based diets		SEM	P Value		
	High $\delta^{15}\text{N}$	Low $\delta^{15}\text{N}$	High $\delta^{15}\text{N}$	Low $\delta^{15}\text{N}$		Diet	$\delta^{15}\text{N}$	INT
Extreme animals by $\delta^{15}\text{N}$								
Observed animal performances								
DMI (kg/d)	9.90	9.13	10.3	9.31	0.105	0.14	<0.001	0.55
ADG (kg/d)	1.38	1.45	1.63	1.68	0.022	<0.001	0.22	0.83
FCE (g/g)	0.139	0.160	0.159	0.181	0.0020	<0.001	<0.001	0.80
RFI (kg/d)	0.26	-0.19	0.27	-0.21	0.040	0.97	<0.001	0.87
Candidate plasma biomarkers								
Urea (g/L)	0.140	0.121	0.217	0.158	0.0058	<0.001	0.001	0.12
$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	6.38	5.40	5.65	4.60	0.042	<0.001	<0.001	0.71
FEPL (g/d)	171	162	182	165	1.6	0.03	<0.001	0.26

Abbreviations; FEPL; Fecal endogenous protein losses, INT; effect of the interaction (Diet x $\delta^{15}\text{N}$)

Table 6: Statistical parameters resulting of the K-fold cross validation with the best-fitted FCE and RFI model evaluated in the Table 3.

Model ¹	N° Eq	RMSE	r	CCC	ECT	IP
FCE ~ $\delta^{15}\text{N}$	1	0.012	0.44	0.33	4%	0.049 g/g
RFI ~ $\delta^{15}\text{N}$	4	0.422	0.29	0.16	-3%	1.67 kg/d

Abbreviations: CCC; concordance correlation coefficient, ECT; percentage of error in central tendency, IP; interval of model's prediction at 95%, r; correlation coefficient between observed and predicted values, RMSE; root mean squared error of predicted vs observed values (expressed in g/g for FCE and kg/d for RFI).

¹All statistical parameters presented are the average results of the 10 random iterations between observed and predicted values.

Table 7: Heritability (Diagonal, \pm SE), genetic (Above diagonal \pm SE), and environmental (Below diagonal \pm SE) correlations between animal performance traits and candidate plasma biomarkers.

Traits	FCE (g/g)	RFI (kg/d)	Plasma $\delta^{15}\text{N}$ (‰)	Plasma Urea (g/L)
FCE (g/g)	0.18 ± 0.10	-0.05 ± 0.36	0.00 ± 0.39	0.19 ± 0.37
RFI (kg/d)	-0.61 ± 0.09	0.22 ± 0.10	0.38 ± 0.32	0.27 ± 0.33
Plasma $\delta^{15}\text{N}$ (‰)	-0.55 ± 0.11	0.26 ± 0.12	0.28 ± 0.14	0.28 ± 0.33
Plasma Urea (g/L)	-0.13 ± 0.11	0.07 ± 0.11	0.14 ± 0.13	0.27 ± 0.12

Abbreviations: FCE; Feed conversion efficiency, RFI; residual feed intake.

Figures

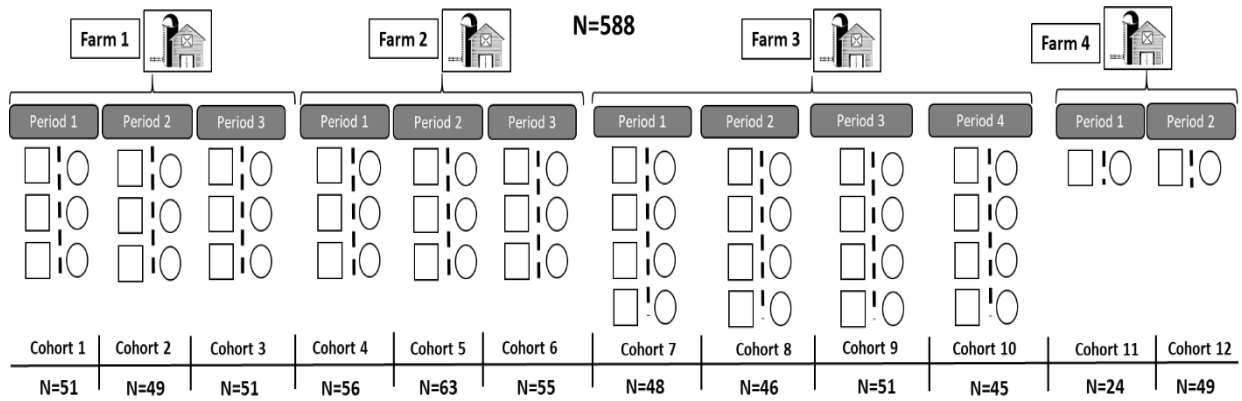


Figure 1. Experimental network design. Squares and circles below periods represent the experimental pens; half assigned to a corn-based diet (□) and half to a grass-based diet (○). Animals within each pen were considered the contemporary group (CG) unit. The number of cohorts (farm × period combination) and animals within cohort are shown at the bottom.

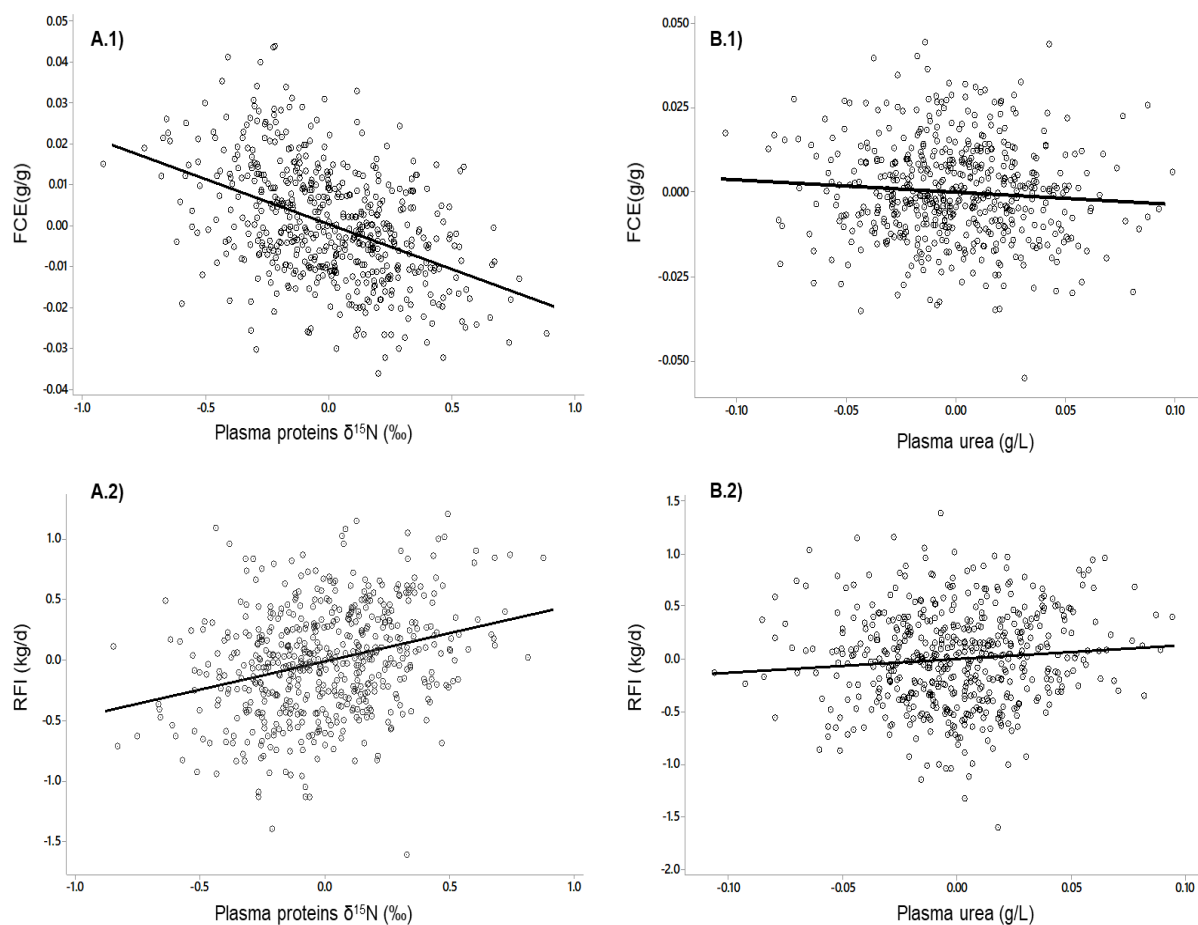


Figure 2: Relationships between the within-contemporary group (CG) variability of feed efficiency indices (FCE [Panels 1], RFI [Panels 2]) and plasma proteins ¹⁵N natural abundance (δ¹⁵N) (Panels A) or plasma urea concentration (Panels B) for Charolais bulls fed two diets. Symbols represent individual values adjusted for the CG effect while lines represent the linear regression from models shown in Table 3.

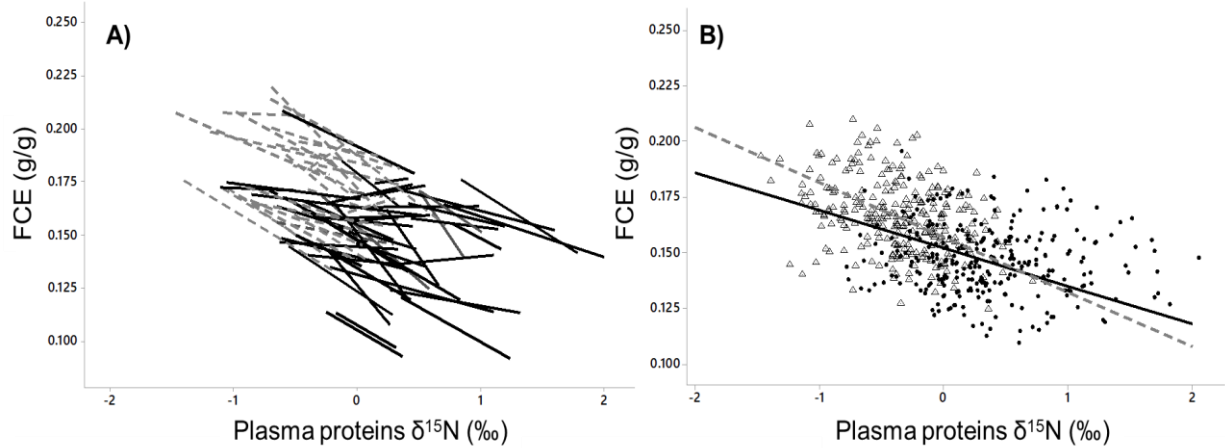


Figure 3: Relationships between FCE and plasma proteins $\delta^{15}\text{N}$. Values of $\delta^{15}\text{N}$ represent relative $\delta^{15}\text{N}$ zero-centered values centered to the mean. Panel A) Within-contemporary group regressions ($n = 78$) of FCE against plasma proteins $\delta^{15}\text{N}$ obtained by simple linear model. Dotted grey lines represent corn-based diets and thick black line grass-based diets. Panel B) Overall within-diet regressions ($n = 2$) of FCE against plasma $\delta^{15}\text{N}$ obtained through mixed-effect model. Symbols are individual raw values, where dotted grey line and triangles represented animals fed corn-based diets whereas the thick continuous line and black points represent animals fed grass-based diets.

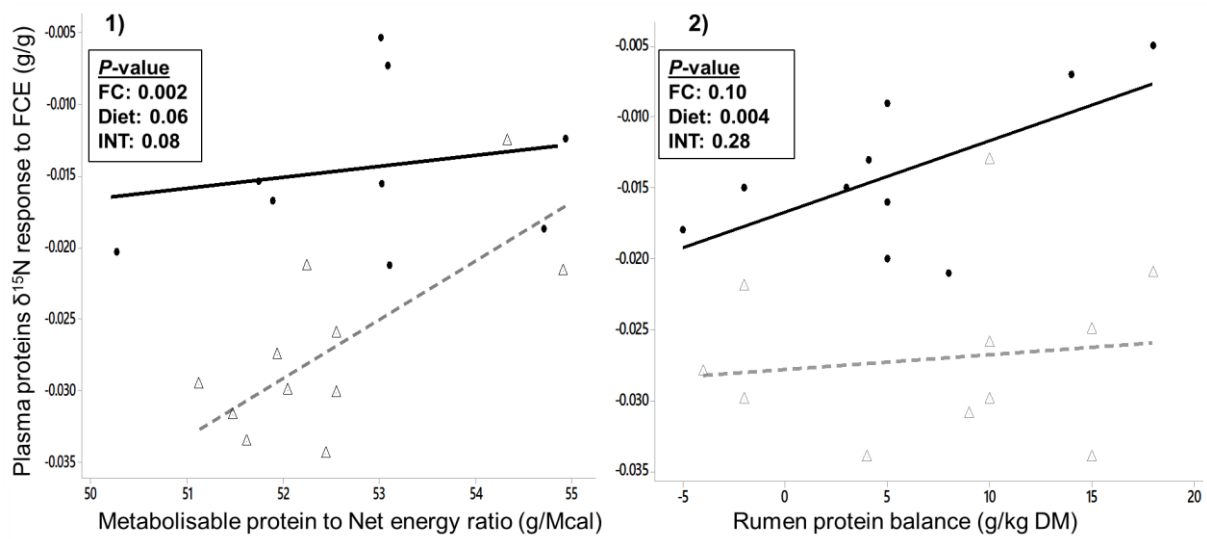


Figure 4: Relationships between within cohort slopes of plasma proteins $\delta^{15}\text{N}$ vs. FCE and significant feed characteristics. Panel 1; Metabolisable protein to Net energy ratio, Panel 2; Rumen protein balance. Abbreviations: FC; feed characteristic, INT; interaction. (Δ) Represents corn-based diets, while (\bullet) represents grass-based diets. Dotted grey lines and continuous black lines represent for corn and grass-based diets, respectively, the regression between $\delta^{15}\text{N}$ response to FCE (slope) and the dietary characteristics. Each observation within diet correspond to one of the 12 cohorts.

Supplementary materials

Plasma $\delta^{15}\text{N}$ vs urea as candidate biomarkers of between-animal variations of feed efficiency in beef cattle fed contrasting diets: phenotypic and genetic evaluation

Guarnido-Lopez. P¹, Ortigues-Marty. I¹, Taussat. S², C. Fossaert³, Renand. G², Cantalapiedra-Hijar. G^{1*}

Journal:

Animal; the International Journal of Animal Biosciences

Table S1 : Normality and heteroscedasticity of experimental variables

Variable	P-value for normality	P-value for heteroscedasticity
DMI (kg/d)	0.06	0.01
ADG (kg/d)	<0.001	0.81
FCE (g/g)	0.01	0.16
RFI (g/d)	0.97	0.009
Plasma $\delta^{15}\text{N}$ (‰)	0.005	0.22
Plasma urea (g/L)	0.005	<0.001

Abbreviations: DMI; dry matter intake, ADG; average daily gain, FCE; feed conversion efficiency, RFI; residual feed intake.

P values <0.05 indicate variables not following a normal distribution and heteroscedastic variables tested by contemporary group

Normality has been tested within each contemporary group.

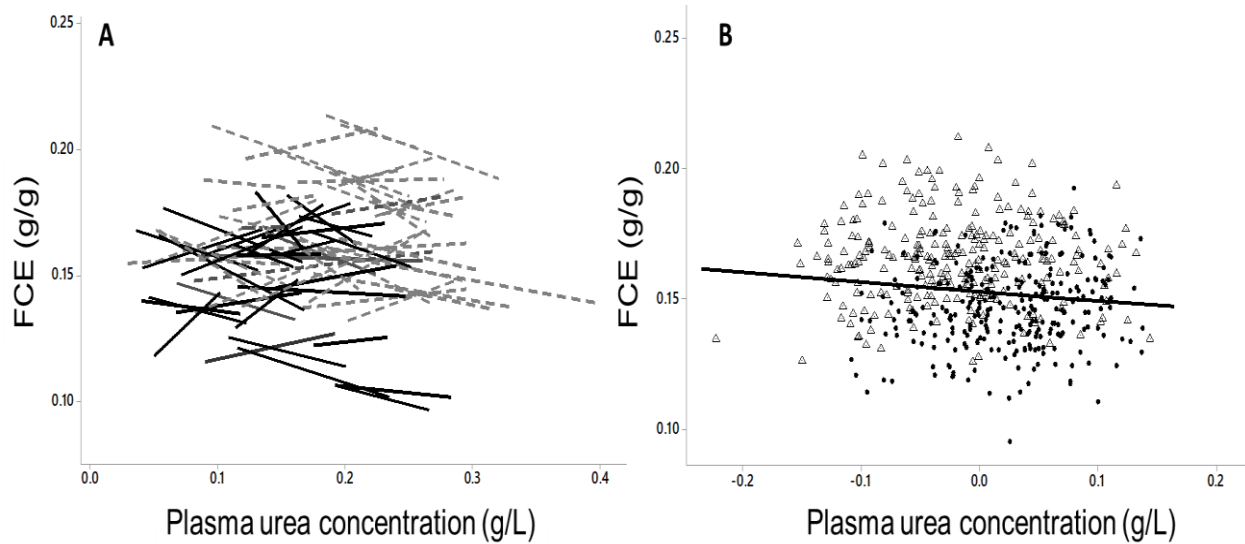


Figure S1: Relationships between FCE and plasma urea concentration, with centered data for the biomarker to avoid intercept and slope correlation.

Panel A) Within-contemporary group regressions ($n = 78$) of FCE against plasma urea concentration obtained by simple linear model. Dotted grey lines represent corn-based diets and continuous black line grass-based diets.

Panel B) Individual raw values of FCE with the general regression line from the mixed effects models, because of non-significant differences were found between both diets ($T \text{ test} > 0.05$). Symbols are individual raw values where triangles represented animals fed corn-based diets and black points represent animals fed grass-based diets.

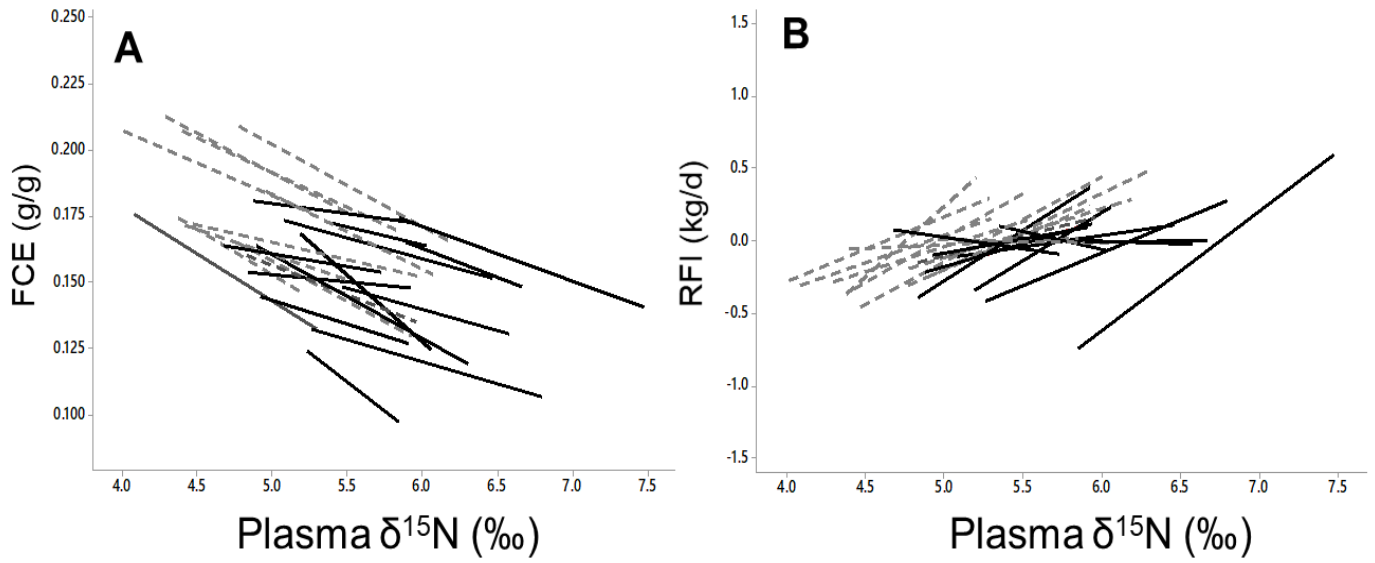


Figure S2: Relationships between feed efficiency indices (A; FCE and B; RFI) and plasma $\delta^{15}\text{N}$ within each cohort (n=24), where dotted grey lines represent corn based diets and continuous black line grass based diets.

Table S2: Ancova analysis between the responses of plasma $\delta^{15}\text{N}$ to feed efficiency indices with the estimated diet characteristics

Responses	Crude Protein (g/kg)	RPB (g/kg)	Starch (g/kg)	NDF (g/kg)	EE (g/kg)	Net energy (Mcal/kg)	MP (g/kg)	ADF (g/kg)	RDP (%)	MPS (g/kg)	MP/ Net Energy (g/Mcal)	Starch/ NDF (g/kg)
Response of plasma $\delta^{15}\text{N}$ to FCE												
P value feed characteristic	0.30	0.10	0.53	0.51	0.57	0.21	0.68	0.91	0.66	0.40	0.002	0.61
P value diet	0.11	0.004	0.99	0.61	0.36	0.18	0.94	0.22	0.78	0.33	0.06	0.36
P value INT ¹	0.06	0.28	0.94	0.49	0.30	0.15	0.90	0.32	0.74	0.29	0.08	0.74
Response of plasma $\delta^{15}\text{N}$ to RFI												
P value feed characteristic	0.45	0.13	0.55	0.23	0.54	0.35	0.26	0.41	0.006	0.56	0.35	0.81
P value diet	0.79	0.19	0.56	0.01	0.22	0.69	0.60	0.12	0.77	0.57	0.05	0.66
P value INT ¹	0.85	0.51	0.89	0.01	0.22	0.75	0.54	0.15	0.73	0.55	0.04	0.92

-Abbreviations from feed values; RPB: Rumen protein balance, EE: Ether extract (fat content), MP: Metabolisable protein, RDP: nitrogen degradability in the rumen, MPS: Microbial protein synthesis, as the Ratio between Microbial protein yield and rumen degradable protein.

Deuxième article de la thèse

Guarnido-Lopez, P, I. Ortigues-Marty, L. Salis, C. Chantelauze, A. Bes, P. Nozière, G. Cantalapiedra-Hijar. Protein metabolism, body composition and oxygen consumption in extreme residual feed intake young bulls fed two contrasted diets (soumis au journal Animal le 7/12/2021, en revision modérée).

Introduction

Ce deuxième article porte sur la vérification de la première question scientifique et de l'évaluation et approfondissement des questions n° 2 et 3 décrites dans la section 'Stratégie et démarche scientifique de la thèse', et sur l'évaluation de l'EUA et du métabolisme protéique sur des animaux extrêmes selon l'IR et alimentés avec les mêmes régimes contrastés que ceux utilisés dans le premier travail.

Après avoir vérifié dans le dispositif précédent que les animaux efficaces selon l'IR ont bien une EUA supérieure, je montre que les animaux efficaces ayant un ingéré plus faible ont un rendement de carcasse plus élevé que les inefficients, en lien avec des dépenses énergétiques plus faibles. Par rapport au métabolisme protéique, les animaux efficaces sur l'IR présentent un turnover protéique, déterminé d'après le taux fractionnel de dégradation protéique du muscle squelettique et le taux fractionnel de synthèse des protéines du plasma, moins élevé que les inefficients, mais que ces différences du turnover ne sont significatives qu'avec le régime ensilage de maïs. Je suppose que certaines caractéristiques du régime peuvent avoir contribué à expliquer l'interaction observée par rapport au turnover protéique, comme la différence de densité énergétique ou des substrats glucogéniques absorbés. Ces différences pourraient expliquer une insulïnémie, et donc, un turnover protéique proportionnellement plus élevée chez les animaux inefficients maïs, mais pas forcément chez les animaux inefficients herbe, dont le régime n'est pas riche dans ces composants glucogéniques et n'entraîne pas une réponse insulínique aussi importante.

Protein metabolism, body composition and oxygen consumption in extreme residual feed intake young bulls fed two contrasted diets

Pablo Guarnido-Lopez¹, Isabelle Ortigues-Marty¹, Lorène Salis¹, Céline Chantelauze^{1,2}, Agathe Bes¹, Pierre Nozière¹, Gonzalo Cantalapiedra-Hijar^{1*}

¹*INRAE, VetAgro Sup, UMR Herbivores, Université Clermont Auvergne, F-63122 Saint-Genès-Champanelle, France*

²*Université Clermont Auvergne, INRAE, UNH, Plateforme d'Exploration du Métabolisme, MetaboHUB, Clermont, F-63000 Clermont-Ferrand, France*

*Corresponding author: Gonzalo Cantalapiedra-Hijar. Email: gonzalo.cantalapiedra@inrae.fr

Abstract

Protein metabolism and body composition have been identified as major determinants of residual feed intake (**RFI**) in fattening beef cattle when fed energy-dense diets rich in starch. This study aimed to evaluate if these 2 identified RFI determinants in beef cattle are the same across 2 contrasted diets. Following a first 84-d feed efficiency test conducted with 100 young Charolais bulls fed either a high-starch corn-based diet ($n = 50$) or a high-fiber grass-based diet ($n = 50$) the 16 most extreme RFI animals (8 efficient vs 8 inefficient) were selected by diet. The 32 selected animals were subsequently evaluated for their i) N use efficiency (**NUE**; N retention/N intake) calculated either from a 10d-nitrogen balance trial or alternatively from estimations based on body composition changes occurring during 196 days, ii) carcass and whole-body protein turnover rates analyzed through the 3 methyl-histidine urinary excretion and the N isotopic turnover rates of urines and plasma during 112d, respectively, and iii) body composition measured at the slaughterhouse. Oxygen consumption was measured during a second RFI test for the 100 animals by 2 GreenFeed systems. Efficient RFI animals tended ($P = 0.08$) to improve their NUE irrespective of the diet when N retention was estimated for 196 days. The urinary urea-N to total N ratio was lower ($P = 0.03$) in efficient RFI cattle irrespective of the diet, also indicating an improvement in NUE in efficient RFI cattle. In contrast, NUE calculated during the 10d-N balance showed no differences ($P = 0.65$) across RFI groups suggesting that this method may not be suitable to capture small NUE differences. In addition, efficient RFI individuals presented higher dressing percentage and muscle deposition in the carcass ($P=0.003$) but lighter rumen ($P=0.001$), and a trend for lower oxygen consumption ($P=0.08$) than inefficient RFI animals irrespective of the diet. Lower protein degradation rates of skeletal muscle and lower protein synthesis rates of hepatic plasma proteins were found in efficient RFI cattle but only with the corn-based diet (RFI x Diet; $P = 0.02$). The higher insulin concentrations associated with the corn-based diet ($P = 0.001$) seemed to be a key metabolic feature explaining why protein turnover rate was positively associated with RFI only in this diet. This study highlights some common mechanisms associated with RFI regardless of the diet but also a diet-dependent association between RFI and protein turnover rate.

Key words: Beef cattle, residual feed intake, protein turnover, energy expenditure, nitrogen use efficiency

Implications

Understanding the biological mechanisms explaining why two animals fed the same diet differ in their ability to convert the feed into animal products is of utmost importance to assist breeding programs and precision feeding. Although several common mechanisms here explored in beef cattle were associated with residual feed intake irrespective of the nature of the diets (high starch vs high-fiber), some key metabolic mechanisms were associated in a diet-dependent manner. If further confirmed, this may imply that metabolic pathways underlying feed efficiency in beef cattle are not exactly the same across different diets.

Introduction

Because of the increasing world demand for meat products, and the current economic and environmental context, there is a need to improve feed efficiency in livestock farming systems (Makkar and Beaver, 2012). This is particularly true for beef cattle which have a conversion rate of feeds into animal products that is considerably lower than that of other species (Mottet et al., 2017). Residual feed intake (**RFI**) is one of the preferred feed efficiency criteria for genetic selection because of its moderate heritability and uncorrelated response with animal body weight and gain (Berry and Crowley, 2012). However, two main problems should be solved before implementing genetic programs based on RFI: the co-selection for undesirable animal traits and potential genetic by environment interactions. Because RFI is a complex multi-trait character resulting from the interplay of different energy-consuming mechanisms, some trade-offs could be expected with other non-productive but energy consuming animal functions (Cantalapiedra-Hijar et al., 2018). Indeed, efficient RFI animals have been shown to present a lower immunity both in normal conditions or against inoculated pathogens (Mpetile, 2014 ; Zerjal et al., 2021) and lower reproductive performances (Basarab et al., 2011 ; Wang et al., 2012) than their inefficient counter-parts. Concerning the potential genetic by environment interactions, some previous works highlighted that animals may change their RFI ranking across different diets (Durunna et al., 2011) especially when shifting from fattening energy-dense diets to diets rich in forages (Coyle et al., 2016; Asher et al., 2018; Lahart et al., 2020). This may entail important issues considering the huge variability of diets used in beef cattle production systems. The study of biological determinants underlying RFI variations is thus of utmost importance to identify potential trade-offs between biological functions and to better interpret the potential interactions between RFI and the type of diet fed to animals. Among the biological determinants of RFI, protein turnover has been proposed as a major one because of its associated energy expenditure (Richardson et al., 2004; Cantalapiedra-Hijar et al., 2018). Protein turnover refers to the continual synthesis and degradation of body proteins not leading to changes in protein mass but associated only with protein renewal and may impact the N use efficiency (**NUE**; Eenaeme et al., 1998) given its association with endogenous N losses in urines (Moughan and Fuller, 2003) and feces (Inkster et al., 1989). However, and despite the role of protein turnover in animal energy expenditure and N losses, only few works have directly studied the relationship between RFI and protein turnover in growing or fattening cattle (Castro Bulle et al., 2007; Lines et al., 2014). This is probably due to the complex and expensive techniques needed to study protein turnover by gold standard methods, especially in big-size animals as beef cattle. Furthermore, several other drawbacks are associated with current gold-standard methods for the determination of protein synthesis and degradation rates in farm animals, such as measuring protein turnover within an extremely short-time frame and under non-physiological conditions (Cantalapiedra-Hijar et al., 2019).

Previous studies suggested an improved NUE in efficient RFI animals (Cantalapiedra-Hijar et al., 2020; Guarnido-Lopez et al., 2021), which could be partially explained by their lower protein turnover rates (McDonaugh et al., 2001; Cruzen et al., 2013; Cantalapiedra-Hijar et al., 2018). In addition, previous results from our team suggest that protein turnover could be related to RFI in a diet-dependent manner (Jorge-Smeding et al., 2022). We hypothesized that more efficient RFI animals will present lower protein turnover rates than inefficient ones specially with high-starch energy-dense diets. Therefore, the aim of this study was to evaluate the relationship between protein turnover and feed efficiency using a combination of gold-standard methods and new proxies in extreme RFI young bulls fed two contrasting diets (corn-vs grass- based diets). In addition, and because of their relationships with protein turnover and feed efficiency, we also evaluated body composition, NUE and energy expenditure in these extreme RFI animals.

Material and methods

Animals, housing and experimental design

A total of 100 weaned 9-month-old purebred Charolais bulls were used in two consecutive years (n=50 in year 2019 and n=50 in year 2020). Bulls belong to a Charolais genetic program and their parents were known. At their arrival at INRAE the 100 animals (382 ± 41 kg BW and 259 ± 42 days old) were housed in an open shed with 2 pens and free stalls on a semi-mulched area composed of wood shavings. Pens were equipped with electronic feed gates and individual automatic feeders (Biocontrol, Rakkestad, Norway) allowing the identification of each animal and the recording of individual feed intake. A total of 18 electronic feeders (9 by each pen) were disposed following recommendations of Biocontrol (3 animals per feeder) and giving all animals free access to all electronic feeders. Each pen (n=2) was assigned to one of the two experimental diets, and animals were homogeneously allotted to dietary treatments (with 25 animals per pen) ensuring a similar average and standard deviation in body weight and age within diet. Diets were also balanced for the known genetic origin of bulls in such a way that bulls from the same sire were evenly distributed across the 2 dietary treatment. During the experiment which lasted 196 days, feed efficiency, nitrogen balance, protein metabolism and body composition were measured in different measurement periods either on all animals or on sub-groups.

After 4 weeks of adaptation to the facilities and their experimental diet, all animals were evaluated for feed efficiency during 84 days (day 0 to day 84); they averaged 414 ± 54 kg BW and 290 ± 42 days old at the beginning of the test. Results of the first feed efficiency test were used to rank and classify the animals as low RFI (efficient) and high RFI (inefficient); the 32 most RFI extreme animals were identified and selected (8 efficient and 8 inefficient for each diet per year). After the first feed efficiency test, the extreme animals were measured for N balance (in two sub-groups per year, 8 animals per sub-group, the first sub-group between days 99 and 114, the second sub-group between days 114 and 129), protein metabolism (also evaluated in two subgroups, the beginning of the protein metabolism measurements coincided with the beginning of the nitrogen balance and the end coincided with the slaughter) and body composition at slaughter (day 196). Extreme RFI bulls were slaughtered on average after the same fattening duration (196 days), they averaged 698 ± 63 kg BW and 485 ± 42 day old.

A second feed efficiency test was conducted on all animals (n=100) starting right after the first one and ending at slaughter (day 84 to day 196) for a total duration of 112 days. During this second efficiency test, measurements of O₂ consumption and CO₂ emissions were done on all animals through two coupled GreenFeed systems (GreenFeed® system, C-Lock Inc., Rapid City, SD, USA), one in each pen, easily accessible for all animals in the pen.

Experimental diets

Experimental diets were based on either corn silage or grass silage and formulated with a forage to concentrate ratio close to 60:40 (Table 1). The grass silage was composed of permanent mountain grassland of Auvergne region in France. Composition of concentrates differed between diets, with wheat grains and soybean meal in the corn silage diet and the same ingredients plus beet pulp in the grass silage diet. Diets were distributed as total-mixed rations (TMR), and animals were fed individually and *ad libitum*. Both diets were iso-MP (≈ 83 g MP/ kg DM), but differed in their net energy concentrations (1.51 [grass silage diet] vs 1.66 [corn silage diet] Mcal/kg DM), calculated according to INRA (2018). The grass silage diet was rich in NDF (45% vs 33%, DM basis for grass and corn silage diets, respectively) while the corn silage diet was rich in starch (5% vs 33%, DM basis, same respective order).

Measurements and sampling

Body weight and intake

Animals were weighed on an electronic scale at 14h00 (always in a non-fasting state) on two consecutive days at the beginning and at the end of each feed efficiency test, and by simple weighing every two weeks from the arrival of the animals in the experimental facilities until slaughter. Individual DM intake was calculated as the fresh matter intake measured by automatic feeders multiplied by the DM content of the TMR analyzed five times (Monday to Friday) per week. The DM of ingredients, silages and whole TMR was analyzed at the fattening facilities every day by dehydrating samples at 103°C during 24h.

Estimation of body composition during the first feed efficiency test

Body composition during the first feed efficiency test was estimated at the beginning (day 0) and at the end of the test (day 84) using two different methods. Subcutaneous fat was sampled by biopsy in the middle of a triangle formed by the last lumbar vertebrae, tail base and ischial tuberosity after local anesthesia (Cantalapiedra-Hijar et al., 2020a) and adipocyte diameter was measured with a binocular loupe (Nikon SMZ 2T) to estimate whole-body lipid content according to Garcia and Agabriel (2008). Real-time ultrasound echography (Aloka Prosound 2 with a linear probe UST5820-5) was performed at the beginning (day 0) and end (day 84) of the first feed efficiency test to measure fat thickness and evaluate the gain composition during the first feed efficiency test period. Each time and on each animal, ultrasound measurements were conducted at four different anatomical sites (*latissimus dorsi* muscle between the 12th and 13th ribs, *gluteus superficialis* muscle between the *Tuber coxae* and *Tuber ischiadicum*, *gluteus medius* muscle at the 4th lumbar vertebrae level between the transverse process and in the 8th rib traversing the elbow) after trimming the hair coat with a handheld electric clipper.

Nitrogen balance and associated urinary and plasma metabolites

Nitrogen balance and associated urinary and plasma metabolites were measured on the thirty-two RFI extreme animals. Eight metabolism stalls developed at INRAE and manufactured by Chambron Gautier® (ZA Champ Lamet, Pont-du-Château, France) were used which explains why each year the 16 extreme RFI animals were measured in two subgroups (8 animals per subgroup). The stalls were designed to allow audio and visual contact between the bulls, and minimize the effect of social isolation on performance and behavior. Each animal remained 15 days in the metabolism stall, 5 days of adaptation and 10 days of intake measurement and fecal and urine collection. Body weight was individually recorded in two consecutive days at the beginning and at the end of the nitrogen balance.

For each animal, DM intake was determined as the difference between amounts of DM matter offered and refused. Daily representative fresh samples (200 g of each ingredient and of the whole TMR) and individual refusals (10% of total per day) were collected and stored at -20°C before N analysis. Total 24h-fecal excretion of each animal was collected at 8h00, and representative fresh samples of feces were taken daily (10% of total per day). At the end of each collection period, all daily fecal samples were pooled by animal and stored at -20°C before chemical analyses (DM, N). Total 24h-urine was non-invasively collected using a harness attached to animals and connected to an electric vacuum pump that suctioned the urine into a 20-L flask acidified (pH<3) with 500-750 ml of 30% (v/v) H₂SO₄ to prevent N volatilization and microbial growth. Urine samples were collected daily at 8h00 and at the end of the collection period samples were homogeneously pooled per animal (1% of the total daily excretion) and stored at -20°C before chemical and metabolites analyses (N, urea, creatinine and 3-methyl-histidine).

Before meal distribution, blood was sampled from each animal on the last day of its nitrogen balance period by coccygeal venipuncture into a 9 ml EDTA tube (BD vacutainer, Plymouth, UK) and centrifuged (2500 x g during 10 min at 4°C). Plasma was stored at -20°C before urea and insulin determinations.

N isotopic turnover rates

We evaluated the protein turnover rates of the 32 extreme RFI animals through the N isotopic turnover method, which is based on the rate at which animal's proteins change their isotopic signatures after a small dietary isotopic switch (Cantalapiedra-Hijar et al., 2019). The determination of the N isotopic turnover consisted of measuring after a dietary N isotopic switch the N isotopic turnover rate in the plasma as a proxy of the fractional synthesis rate of hepatic export proteins and in the urine as a proxy of whole-body protein degradation rates (Cantalapiedra-Hijar et al., 2019). Animal proteins were enriched through oral administration of 60 mg/d/animal of ¹⁵N-labelled urea (98% Atom percentage excess, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) before meal distribution and during 14 days. The artificial ¹⁵N enrichment was stopped (i.e. diet isotopic switch) and blood and urine samples were obtained in kinetics from d15 onwards. Timing to start the dietary N isotopic switch and thus the first blood and urine samplings was aligned with the start of the nitrogen balance (d0 of the N isotopic turnover rate evaluation).

Plasma and urine samples were obtained over time to analyze the depletion of ¹⁵N values measured as $\delta^{15}\text{N}$ (‰). Blood was sampled by coccygeal venipuncture in each extreme animal on 10 time points (d0, d3, d7, d11, d15 while animals were in the digestibility stalls and d21, d35, d49, d78 while they were in their respective pen). A last sampling was performed at the slaughterhouse (day 196). Blood was systematically sampled in the morning between 0800 and 1000, collected into a 9 ml heparin tube (BD vacutainer, Plymouth, UK), centrifuged (2500 g x 10 min) before plasma separation and storage at -20°C. Urine samples were obtained from each extreme animal on 13 time points. During the nitrogen balance period, urine samples (20 mL) were taken early in the morning on d0, d1, d2, d3, d4, d7, d9, d11 and d14. When animals were back in their pen, urine was collected manually after individual head blocking during 1 hour in the morning on d17, d35, d70 and d142. A 20 mL sample was then transferred into a tube containing 1 mL of 30% (v/v) H₂SO₄ and filtered through a 30 µm standard filter paper to remove fine particles. The filtrate was stored at -20°C before analysis of ¹⁵N enrichment.

Oxygen consumption and carbon dioxide emission

Oxygen consumption and carbon dioxide emission were measured using the GreenFeed system, which makes spot-measurements of gases inhaled and exhaled by individual animals, identified by a radio frequency ear-tag, during visits to the system. One GreenFeed was used per experimental diet/pen; it was fitted with a hopper continuously filled with the respective concentrate. GreenFeed systems were calibrated so that each animal received five drops of 40 g of pelleted concentrate per visit for a maximum of three visits per day spaced eight hours apart (i.e. 600 g [as fed basis] maximum of concentrate per animal and per day). The GreenFeed calibration was performed automatically daily for each gas (between 3:30 and 4:30), by injecting a gas mixture at certified concentrations of CO₂ (4909 and 5050 Mol-ppm) and O₂ (20.87 and 21.03 Mol-ppm) for the GreenFeed systems associated with the corn-based diet and with the grass-based diet, respectively. The CO₂ recovery rates of the GreenFeed systems were performed monthly and filters were changed weekly, or as soon as the air flow fell below 27 L/s. Recorded signals were transferred blindly to the C-Lock server, and converted by C-Lock before a return of data (time, duration, gas flow at each visit, air flow, etc.). If some data were incomplete (too short visits, poor head position, for example), they did not appear in the data transmitted by C-Lock.

Measurements of body composition at slaughter

Once all measurements were completed, extreme animals were slaughtered (from d196 onwards) at the INRAE experimental slaughterhouse of UE1414 Herbipôle Unit at a rate of four animals per week (one efficient and one inefficient per diet) as soon as the first animals reached approximately 720 kg of BW (corresponding to a target market carcass weight of about 420 kg). Slaughter spread over 1 month (n=4 animals per week on June 2019 and June 2020) in order to keep the same average experimental duration between the two years. Each week, all four animals were slaughtered on the same day (approximately 1 per hour) and the order of sacrifice according to the different treatments (diet and RFI class) was changed in order to balance these effects on all post-mortem measurements.

Every animal was stunned with a captive bolt in the front and beheaded on the floor. Carcasses were graded for conformation and fat score according to the EU classification on a fifteen-point scale, chilled and stored at 4°C until 24 h post-mortem. Hot carcass, internal fat (i.e. heart, mesenteric, pelvic and kidney fat), external body parts (skin, anterior and posterior feet and the head) and empty internal organs (tongue, testicles, lungs, liver, heart, kidneys, rumen, abomasum, omasum, intestines, bladder and blood) were individually weighted within 1h after slaughter. Digestive contents from rumen, reticulum, abomasum et intestine were also collected and separately weighed by animal. Twenty-four hours after slaughter the 6th rib was separated through perpendicular section of the vertebral axis in the middle of the 6th intercostal space in order to determine the rib composition in muscle, fat and bone. The dissection consisted in a manual separation of these components through a knife and their weighing on a scale.

*Laboratory analyses**Feed, experimental diet characteristics and N balance*

All feed samples from the whole fattening period and each N balance trial (2 per year) were analyzed for DM, organic matter (OM), N, NDF, ADF and starch. Dry matter and OM concentrations were determined by oven-drying (60°C and 72h) and subsequent incineration in a muffle furnace at 550°C (NF V 18-101), respectively. Nitrogen concentrations were analyzed by the Dumas method (Ebeling, 1968) in an elemental analyzer (Rapid N cube, Elementar Analysensysteme GmbH). Solid samples, once dried, were introduced (200 mg) in capsules and liquid samples (urines) were introduced by pipetting 250 µl in each capsule filled with cellulose. Crude protein was considered to be N x 6.25. The enzymatic CP degradability of concentrated feeds was determined after 1h of *in vitro* protease hydrolysis according to Aufrère and Cartailier (1988), whereas the enzymatic OM digestibility of all feed ingredients were determined as described by Aufrère (1982). Neutral detergent fiber (**NDF**) and acid detergent fiber (**ADF**) were analyzed according to Van Soest et al., (1991) with the use of α -amylase to remove starch. Starch was analyzed on concentrated feed samples by spectrophotometry through an enzymatic assay (Faisant et al., 1995).

Feed values of individual ingredients were calculated according to INRA (2018) using the Prevalim® module of the Inration V5® software. Nutritive values of experimental diets were estimated using the Inration V5® software (<https://app.inration-ruminal.fr/>) from the ingredient and chemical compositions of diets, and the digestive interactions which depend on the feeding level (DMI in % of BW), the concentrate dietary proportion and the estimated rumen protein balance (INRA, 2018).

Plasma and urine metabolites

Plasma $\delta^{15}\text{N}$ was analyzed from bulk plasma samples. Ten μL of liquid plasma was pipetted in a tin capsule and left to dehydrate at room temperature during 24h. In previous experiments from our team, $\delta^{15}\text{N}$ analyses were conducted in plasma proteins (isolated by precipitation with sulfosalicylic acid solution; 15 μL into 300 μL of sample; 1 g/ml). Given that more than 98% of total N in plasma is protein we decided to conduct the analysis directly on bulk plasma rather than in plasma proteins. Plasma samples from 4 animals were compared with both methods (bulk plasma vs plasma proteins) and similar results on both absolute $\delta^{15}\text{N}$ values and kinetics coefficients were obtained. The urinary $\delta^{15}\text{N}$ was analyzed from the acidified urinary spot samples after being dehydrated in the same way as plasma samples. Dehydrated bulk plasma and liquid urinary samples were analyzed for $\delta^{15}\text{N}$ by using an isotope-ratio mass spectrometer (Isoprime, VG Instruments, Manchester, UK) coupled to an elemental analyzer (EA Vario Micro Cube, Elementar, Germany) as described in Cantalapiedra-Hijar et al. (2020). International standards (glutamic acid) were included in each run every 10 samples to correct for possible time- variations in the analysis. Results were expressed using the delta notation according to the following equation:

$$\delta^{15}\text{N} = [(R_{\text{sample}} / R_{\text{standard}}) - 1] \times 1000,$$

where R_{sample} and R_{standard} are the N isotope ratio between the heavier and the lighter isotopes ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) for the sample being analyzed and the internationally defined standard (atmospheric N_2 , $R_{\text{standard}} = 0.0036765$), respectively, and δ is the delta notation in parts per 1000 (‰) relative to the standard.

Urea concentrations were determined by two different methods, whether on plasma or urine samples. For plasma urea, analyses were conducted in duplicate through a colorimetric assay conducted in an automated analyzer (Arene 20XT, Thermo Scientific, Vaanta, Finland). The accuracy profile (NF V03-110: 2010) for concentrations ranging between 0.05 and 0.90 g/L yielded an average accuracy of 101% and a coefficient of variation for replicates averaging 8%. For urinary urea, analyses were conducted using an enzymatic commercial kit (ABX Pentra; REF: A11A01641) on an automotive chemical benchtop analyzer (ABX Pentra 400, Horiba Medical, Montpellier, France). Plasma insulin concentration was analyzed by spectrophotometry using a microplate reader (Infinite® 200PRO NanoQuant, Tecan, Grödig, Austria) and an enzyme immunoassay kit (Merckodia Insulin Elisa, Merckodia AB, Uppsala, Sweden).

The urinary concentration of creatinine and 3-methyl-histidine were analyzed by Bevital laboratory (Bergen, Norway, <http://www.bevital.no/>) through a gas chromatography combined with tandem mass spectrometry as described by Midttun et al. (2013).

Calculations

Feed efficiency

Residual feed intake was calculated using individual average DM intake (**DMI**), average daily gain (**ADG**) and mid metabolic body weight (**midBW**^{0.75}) for the first 84d-feed efficiency test. The ADG of each animal was calculated by regressing its BW over the time on test. Mid-test BW was predicted from the BW over time regression equations, and expressed at the power of 0.75. Feed conversion efficiency (**FCE**) was calculated as the individual ADG of animals divided by their correspondent DMI. The RFI model considered the effect of the year (2019-2020) and of the diet within the year, which is confounded with the pen. We tested if body composition measurements (fat thickness in each anatomical location or fat gain calculated through d84-d0) explained DMI variations in the RFI model. No effects of body composition resulted significant ($P \geq 0.45$) and were not included in the final RFI

model. RFI was calculated as the difference between observed DMI and the DMI expected for a given midBW^{0.75} and ADG adjusted by the diet (pen) effect (D_e) as follows:

$$Y = \beta_0 + D_e + \beta_1 (\text{MMBW}) + \beta_2 (\text{ADG}) + e \text{ (Eq. 1)}$$

Where, Y is the observed individual DMI, β_0 is the intercept, D_e is the diet (pen) effect, β_1 is the regression coefficient for MMBW, β_2 is the regression coefficient for ADG, and e is the residual of the model or RFI. Each year, animals were ranked within each diet according to their RFI, the four highest (high RFI, non-efficient) and lowest (low RFI, efficient) ones for each experimental diet were selected, resulting in a total of 32 extreme bulls (n=8 efficient corn; n=8 efficient grass; n=8 inefficient grass; n=8 inefficient corn).

Nitrogen use efficiency

Nitrogen use efficiency was calculated using N retention either calculated from the N balance measurements (10 d), or from estimates of body protein gains over the whole experimental period (196 d).

Using data obtained during the N balance period and averaged over the 10 days period, N fluxes and partitioning were calculated as follows:

Nitrogen intake (g/d): (DM offered [g/d] x N concentration in the diet [g N / g DM]) – (DM refused [g/d] x N concentration in the refusals [g N / g DM])

Excreted N (g/d): (Urine excretion [g/d] x N concentrations in urine [g N / g urine]) + (fecal excretion [g/d] x N concentrations in feces [g N / g DM])

Retained N (g/d): N intake (g/d) – Excreted N (g/d)

NUE (g/g): Retained N (g/d) / N intake (g/d)

Using body composition data, NUE was calculated from the following intermediary steps:

Muscle mass gain = see below the body composition calculations and estimations

Retained N (g/d) = muscle mass gain (g) x 0.18 (Castro-Bulle et al., 2007) / Number of days between the beginning of the first feed efficiency test until the slaughter (196d on average)

N intake (g/d) = average DMI (g/d) of the whole period x average N concentration (g N / g DM) in the TMR.

Then, NUE was calculated as for the nitrogen balance period.

Protein metabolism

Post-diet switch $\delta^{15}\text{N}$ kinetics measured in plasma and urine were analyzed by mono- and bi exponential models, respectively, as explained in Cantalapiedra-Hijar et al. (2019):

Mono-exponential model: $\delta^{15}\text{N}(t) = \delta^{15}\text{N}_\infty + (\delta^{15}\text{N}_0 - \delta^{15}\text{N}_\infty) \times \exp^{-k \times t}$

Bi-exponential model: $\delta^{15}\text{N}(t) = \delta^{15}\text{N}_\infty + (\delta^{15}\text{N}_0 - \delta^{15}\text{N}_\infty) \times [p \times \exp^{-k_1 \times t} + (1-p) \times \exp^{-k_2 \times t}]$

where t (d) is the time since the ¹⁵N diet-switch, $\delta^{15}\text{N}(t)$ (‰) is the pool $\delta^{15}\text{N}$ value at time t, $\delta^{15}\text{N}_0$ (‰) is the pool initial $\delta^{15}\text{N}$ value, and $\delta^{15}\text{N}_\infty$ (‰) is the asymptotic value of the pool after the animal has reached isotopic equilibrium with its basal diet (without ¹⁵N-urea administration). In the mono-exponential model k (%/d) is the fractional N isotopic turnover rate of the pool which has been proposed as a proxy of the fractional protein synthesis rate (**FSR**) of hepatic plasma proteins (Cantalapie-

dra-Hijar et al., 2019). In the bi-exponential model, k_1 and k_2 (%/d) refers to the fractional N isotopic turnover rates of a fast and a slow turnover pool, the latter proposed as a proxy of the whole-body protein turnover rate (Cantalapiedra-Hijar et al., 20198). The coefficients of p and $(1-p)$ refers to the modeled contribution of the fast and slow turnover pools to the whole N isotopic turnover rate.

Concerning urinary N metabolites analyzed during the nitrogen balance, we calculated the urea clearance rate as the urinary urea nitrogen excreted daily (g/d) divided by the blood urea concentration (g/L). Clearance rate was expressed as function of BW (Kohn et al., 2005b).

In addition, urinary 3-methyl-histidine excretion measured during the nitrogen balance, was used as a proxy of the fractional degradation rate (**FDR**) of skeletal-muscle protein (Harris and Milne, 1981) as per the equation published by Castro-Bulle et al. (2007):

$$\text{FDR (\%/d)} = ([3\text{-methyl-histidine}]_{\text{urine}}, \mu\text{mol/L} \times \text{urine volume, L/d}) \times (3\text{-methyl-histidine_muscle, } \mu\text{mol})^{-1},$$

where $[3\text{-methyl-histidine}]_{\text{urine}}$ represents the concentration of 3-methyl-histidine in the urine and 3-methyl-histidine_muscle is the total quantity of 3-methyl-histidine in the muscle, estimated from the skeletal-muscle protein mass and assuming 3.51 μmol of 3-methyl-histidine /g of muscle protein (Nishizawa et al., 1979)]. Skeletal-muscle protein mass was estimated from the protein retained in the carcass measured at the slaughterhouse (See below the body composition calculations).

Oxygen consumption and carbon dioxide emission

Oxygen consumption and carbon dioxide emissions, measured in g/d by the Greenfeed, were converted into L/d (Kleiber, 1961) in standard conditions of temperature and pressure using the molar mass of gases (32 and 44 g/mole, respectively) and 1 mole gas=22,4 L. Gas exchanges were averaged over the whole measuring period (112 d) and expressed per kg BW by dividing the average quantity of gases by the average BW of the whole measurement period.

Body composition

Carcass and whole-body tissue compositions were calculated from slaughter data. Carcass tissue composition (ie. muscle, fat and skeleton) was calculated from the measured composition of the 6th rib and the prediction equations published by Robelin and Geay (1975):

$$\text{Muscle in the carcass (kg)} = 0.65 \text{ (constant term)} + 1.35 \text{ (coefficient for Charolais breed)} + (0.7989 \times \text{kg of carcass}) + (-60.27 \times \text{kg of fat in the 6}^{\text{th}} \text{ rib}) + (8.77 \times \text{kg of muscle in the 6}^{\text{th}} \text{ rib}) - (-0.73 \times \text{kg of internal fat measured at the slaughter})$$

where, internal fat measured at slaughter represents the sum of mesenteric, peritoneal, perirenal and pericardial fat.

$$\text{Fat in the carcass (kg)} = -4.41 \text{ (constant term)} - 0.62 \text{ (coefficient for Charolais breed)} + (0.1249 \times \text{kg of carcass}) + (51.65 \times \text{kg of fat in the 6}^{\text{th}} \text{ rib}) - (6.97 \times \text{kg of muscle in the 6}^{\text{th}} \text{ rib}) + (0.88 \times \text{kg of internal fat measured at the slaughter})$$

$$\text{Skeleton in the carcass (kg)} = 12.43 \text{ (constant term)} - 1.03 \text{ (coefficient for Charolais breed)} + (0.0989 \times \text{kg of cold carcass})$$

Chemical composition of the whole body at slaughter was estimated from the carcass composition calculated as above and the prediction equations published by Robelin et al. (1978):

$$\text{Empty BW (kg)} = \text{BW at the slaughter (kg)} - \text{all digestive contents (kg)}$$

$$\text{Body lipids (kg)} = 1.1346 \times (\text{kg of carcass fat} + \text{kg of internal carcass fat})^{0.992}$$

$$\text{Body muscle (kg)} = 0.1259 \times \text{kg of defatted mass}$$

$$\text{With defatted mass} = (\text{Empty BW} - \text{total body lipids})^{1.096}$$

$$\text{Body water (kg)} = 0.8477 \times (\text{kg of empty BW} - \text{kg of body lipids})^{0.974}$$

$$\text{Body mineral (kg)} = \text{kg of empty BW} - (\text{kg of body lipids} + \text{kg of body muscle} + \text{kg of body water})$$

Finally, we estimated the whole-body protein and fat gains during the whole-period (from d0 to 196) by difference between the final body composition estimated at slaughter and the initial body composition, estimated from the initial BW and the adipocyte size determined at the beginning of the experiment (mm) as reported by Garcia and Agabriel (2008).

$$\text{Empty BW (kg)} = \text{Exp}[-0.757 + 1.099 \times \text{Ln}(\text{kg of BW at the beginning of the feed efficiency test})]$$

$$\text{Fat mass (kg)} = [\text{Empty BW} \times (6.6991 \times \text{Exp}(0.0065 \times \text{Adipocytes size } (\mu\text{m}))) / 100]$$

$$\text{Lipids (kg)} = 1.1346 \times \text{Fat mass (kg)}^{0.992}$$

$$\text{Protein (kg)} = 0.1259 \times (\text{Empty BW} - \text{Lipids})^{1.096}$$

Statistical analysis

All statistical analyses were performed in the R software (RStudio Core Team, version 1.1.463, 2018), except for the N isotopic kinetics in plasma and urine, which were performed with XStat software (version 2020.3.1).

Treatment comparisons

To test the effects of the diet (corn- vs grass-based diets), the RFI group (low- vs high-RFI) and their interaction on all measured *in vivo* and *post-mortem* variables, a general linear model was run that included the year, the effect of diet, the RFI group, and their interactions as fixed effects (Year, Diet, RFI, Year x Diet, Year x RFI and Diet x RFI);

$$Y = \mu + a_i + D_i + E_i + a_i \times D_i + a_i \times E_i + D_i \times E_i$$

where Y is the dependent variable, μ is the overall mean; a_i is the effect of the year (2019-2020), D_i is the categorical effect of the type of diet used, E_i is the categorical effect of RFI as efficient or non-efficient, $a_i \times D_i$ is the interaction between the effect of the year and the diet, $a_i \times E_i$ is the interaction between the effect of the year and the RFI group and $D_i \times E_i$ is the interaction between the diet and the RFI effect. The triple interaction was also tested but as it was non-significant in all variables, we did not include it in the final model. Finally, and just in the case of slaughterhouse measurements and estimations we added the slaughter date as a fixed effect nested to the year (2 years, 4 different slaughter dates within each year) in order to account for differences in BW across time.

Mean values are reported as least square means with pooled SEM values. Some interaction terms were significant, but to simplify the presentation of results in tables, only the diet, RFI effects and their interaction (Diet x RFI) are shown. When the Diet x RFI interaction was significant, the means for the different RFI groups were compared using Tukey's significant difference multiple comparison. Effects were declared significant when $P \leq 0.05$, and a trend was considered when $0.05 < P < 0.10$.

Relationships between variables

Repeatability between RFI values determined for the first (0-84 d) and the second (84-196 d) feed efficiency tests was determined through Pearson's correlation (function COR in R). We also attempted to identify the most relevant variables in this study among animal performances (ie. FCE, RFI, ADG, DMI, NUE), protein metabolism (ie. urinary urea N to total urinary N ratio, plasma proteins FSR, whole-body FDR, skeletal-muscle FDR), oxygen consumption and some slaughterhouse measurements and estimations by diet. Once identified, we conducted within-diet a correlation matrix (Pearson's correlation) to evaluate the relationships between these key variables (function COR in R).

Results

First of all, we want to point out that even if dietary formulation was the same in the two experimental years (2019 and 2020), differences in diet quality, especially in silages, slightly differed. The quality of silages was better in 2020 than in year 2019. As a result the year effect affected ($P < 0.05$) animal performances (DMI, ADG, FCE and adipocytes size), N balance (N intake, and fecal, urinary, excreted and retained N, and NUE), urinary N metabolites (creatinine and 3-methyl-histidine concentration), the fractional depletion rate of the slow N turnover pool, the O₂ consumption and CO₂ emission, measurements at slaughter and derived estimations (weight before bleeding and empty BW, organ size, muscle and fat proportion in the 6th rib and carcass chemical composition calculations). The year effect and its respective interactions with diet, RFI or the slaughter date (only for body composition) were thus considered in all statistical analyses but they are not shown in tables in order to simplify results. None of the interactions between year \times diet, year \times RFI and year \times diet \times RFI were significant whatever the variable considered ($P > 0.05$).

In vivo animal performances of extreme RFI young bulls

As expected for extreme animals selected by RFI, in vivo animal performances (Table 2) showed that RFI efficient (low RFI) bulls had on average a lower DMI (-8.7%, $P = 0.004$) and a higher FCE (+8.49%, $P = 0.04$) than non-efficient ones (high RFI) but a similar ADG. Concerning body composition, extreme RFI animals showed no differences ($P \geq 0.26$) in adipocyte size and ultrasound fat depth, neither at the beginning nor at the end of the first FE test, although RFI efficient animals irrespectively of the diet tended ($P = 0.09$) to have a lower gain in fat thickness than non-efficient ones (-21%). Regarding the diet effect, animals fed the corn-based diet presented higher ($P = 0.001$) DMI (+10.9%), ADG (+28.5%), FCE (+20.4%) and consequently higher final body weight (+6.1%; $P = 0.07$), fat thickness (+25%; $P = 0.04$) and adipocyte gain (+42%; $P = 0.09$) than animals fed the grass-based diet, regardless of the RFI group. Likewise, when the same analysis was conducted with all animals ($n = 100$; Supplementary Table S1), results showed that those fed the corn-based diet presented higher ($P < 0.001$) final body weight, DMI, ADG, FCE, adipocytes size and gain and ultrasound fat depth and gain than animals fed the grass-based diet.

Repeatability of animal performance traits during the first and the second feed efficiency test were calculated (Supplementary Table S2). DMI and RFI proved to be moderately to highly repeatable between the two RFI tests both in the whole population and in the 32 extreme individuals ($r > 0.79$ and $r > 0.51$, respectively, when analyzing together both diets), confirming the consistency of RFI ranking during the whole measurement period. In the extreme RFI animals fed the corn-based diet, however,

repeatability of RFI was numerically higher than in grass-fed animals ($r=0.68$ vs $r=0.50$, respectively). Finally, ADG and FCE, two highly correlated traits ($r=0.88$; $P<0.001$), showed low or non-significant repeatability values both in the whole population and in extreme RFI animals.

The animal's adaptation to the metabolism stall was evaluated in two ways. First by the repeatability of animal performances between the first feed efficiency test and the N balance that just followed (Supplementary Table S3). The DMI of the first feed efficiency test showed a high correlation ($r=0.77$; $P=0.001$) with DMI of the N balance trial but non-significant correlations were found with ADG or FCE. Second, by comparing the results of the N balance and the animal performances measured during the N balance trial while in the metabolism stall. Significant ($P\leq 0.004$) high to moderate correlations were obtained between DMI and N intake ($r=0.91$), between ADG and N retention ($r=0.49$) and between FCE and NUE ($r=0.59$).

Nitrogen partitioning, and plasma and urinary metabolites analyzed in extreme RFI young bulls during the nitrogen balance trial

Nitrogen partitioning measured during the 10-d N balance trial is presented Table 3. Because of a numerical difference in body weight (+26 kg) at the beginning of the nitrogen balance trial between efficient and non-efficient individuals fed the grass-diet, we reported results by unit of body weight. Efficient (low RFI) animals presented lower (-10%; $P\leq 0.006$) N intake, fecal N and apparently digested N flows than non-efficient (high RFI) animals irrespective of the diet. Conversely, differences in urinary and excreted N between RFI groups differed according to the type of diet (Diet \times RFI; $P\leq 0.06$), the differences being higher in corn-vs-grass fed animals (12% vs 5% CV). The NUE was not significantly different between RFI groups ($P=0.65$), although efficient (low RFI) animals fed the corn-diet showed a numerical improvement in NUE (+0.024g/g) compared to non-efficient ones. In addition, when N partitioning was expressed in relation to N intake or to digested N, there were no significant differences between extreme RFI individuals. Nevertheless, efficient animals fed the corn-based diet had a numerically (Diet \times RFI; $P=0.55$) lower ratio of digested to urine N (-0.03 g/g) and consequently, a numerically higher ratio of digested to retained N (+0.029 g/g). Concerning the diet effect, animals fed the corn-based diet presented higher (+8 to 18%; $P\leq 0.03$) N intake, digested, in urines, excreted, retained and digested (N feces / N intake) than animals fed grass-based diets.

Concerning urinary and plasma metabolites analyzed during the N balance trial (Table 4), efficient RFI animals had greater ($P \leq 0.03$) urinary creatinine concentration and urea N to total N ratio in urines than inefficient RFI animals, regardless of the diet (Diet \times RFI interaction; $P \geq 0.14$). Conversely, efficient RFI animals had lower ($P = 0.04$) urinary urea excretion compared to inefficient RFI animals, with a trend for a greater RFI effect in animals fed the corn-based diet (Diet \times RFI interaction; $P = 0.06$). Similarly, efficient RFI animals fed the corn-diet tended to have lower insulin values than inefficient ones (Diet \times RFI interaction; $P = 0.08$). No effects of RFI group was observed ($P > 0.05$) for plasma or urinary urea concentration, creatinine urinary excretion, urinary 3-methyl-histidine concentration and excretion, urinary N concentration or urinary clearance rate. In relation to the diet effect, animals fed the corn-based diet presented higher ($P\leq 0.01$) plasma urea concentration (+23.4%), higher insulin (+58%), and higher urinary creatinine concentration (+43.5%), 3-methyl-histidine concentration and excretion per day (+44% and +15%, respectively), urinary N concentration (+42%), ureic N over total urinary N (+20%) and higher 3-methyl-histidine to creatinine ratio (+16%) compared to animals fed the grass-based diet.

Protein metabolism and GreenFeed® measurements

Protein metabolism parameters evaluated through two different methods are shown in Table 5. Overall, none of the analyzed parameters was affected by the RFI group when considering both diets ($P > 0.05$). However, in the corn- but not in the grass-based diet (Diet \times RFI; $P \leq 0.04$) efficient RFI animals showed both lower plasma fractional ^{15}N depletion rate and lower skeletal-muscle fractional degradation rate (-10.2% to -14.7%) compared to their inefficient counterparts. A trend for lower final ^{15}N enrichment of plasma (i.e. natural ^{15}N abundance in plasma) in efficient vs inefficient RFI animals was equally observed in the corn- but not in the grass-based diet (Diet \times RFI; $P = 0.08$). In addition, and despite non-significant differences in the urinary fractional ^{15}N depletion rate of the slow N turnover pool across RFI extremes ($P > 0.05$), efficient animals showed numerically lower whole-body protein FDR (-12.1%) than non-efficient RFI individuals only when fed the corn-diet (Diet \times RFI; $P = 0.38$).

Regarding the diet effect, animals fed the corn-based diet presented a higher ($P \leq 0.03$) initial and final plasma ^{15}N enrichment (+15% and +14.3%, respectively), fractional ^{15}N depletion rate in plasma (+10.5%), urinary fractional ^{15}N depletion rate in the slow N turnover pool (+21%) and lower initial urinary ^{15}N enrichment in the slow N turnover pool (+16.6%). In addition, the estimated skeletal-muscle FDR was higher (+6.7%) in RFI inefficient animals fed the corn-based diet only. Concerning the Greenfeed® gases measurements (Table 6), efficient animals tended ($P \leq 0.08$) to consume less O_2 and produce less CO_2 , per kg body weight (-5%). In addition, animals fed the corn-based diet presented a slightly higher CO_2 to O_2 ratio (+2.2%; $P = 0.01$) compared to those fed the grass diet.

Body composition determined at slaughter

Post-mortem performances, and composition of the empty BW and the 6th rib are shown in Table 7. Because the average fattening duration was similar across RFI groups, no significant differences ($P > 0.14$) were observed across RFI groups or diets in the body weight before bleeding, empty BW, nor in conformation score. However, the carcass weight and dressing percentage were higher (+5% and +3.2%, respectively; $P \leq 0.03$) in efficient vs non-efficient individuals regardless the diet. Only in the corn-based diet, a lower carcass fat score (-12.8%, Diet \times RFI; $P = 0.05$) was noted for efficient RFI cattle. The weight of digestive contents was no different between extreme RFI individuals or between diets ($P > 0.54$).

Organs and body parts were reported per unit of empty BW in order to mitigate the difference in the body weight at slaughter among animals. As for the external body parts, efficient animals showed a lower proportion of head (-4.4%; $P = 0.02$) than non-efficient ones regardless of the diet, with similar proportions of feet ($P = 0.86$) and skin ($P = 0.21$). As for the internal organs, efficient animals tended to have a lower proportion of total internal organs than non-efficient (-3.5%; $P = 0.09$), presenting a smaller rumen-reticulum (-8.4%; $P = 0.001$) regardless of the diet but no further significant differences for the other internal organs ($P > 0.05$). Total internal and subcutaneous fat were not significantly different ($P \geq 0.12$) between extreme RFI animals, but they tended (Diet \times RFI interaction, $P \geq 0.07$), to be lower (-15% and -33%, respectively) in efficient vs non-efficient animals fed the corn-based diet. Regarding the diet effect, animals fed the grass-based diet had lower trimmed carcass fat (-25%; $P = 0.03$) but larger ($P < 0.05$) organs (+7% of head, +10% of feet, +12.5% of testicles, +6.7% of liver, +6.2% of heart, +7.3% of kidneys and +10.1% of whole-digestive tract) than animals fed the corn-based diet.

Concerning the composition of the 6th rib, efficient RFI animals presented a higher proportion of muscle (+3.2%; $P = 0.02$) and a lower proportion of bones (-9.7%; $P = 0.02$) with a trend for a higher muscle

to fat ratio (+24%) with the corn-based diet only (Diet x RFI; $P = 0.08$). According to the diet, animals fed the grass-based diet presented a lower proportion of muscle (-3.6%; $P=0.01$) and higher proportion of bones (+13.6%; $P=0.001$) in the 6th rib than animals fed the corn-based diet.

Body and carcass composition calculated from the 6th rib composition (Table 8) showed that efficient animals had a higher ($P\leq 0.05$) quantity (+5.6%) and proportion (+1.9%) of muscle in the carcass with no differences in fat or skeleton amounts or proportions ($P\geq 0.12$). In addition, the calculated chemical composition of the whole-body of efficient RFI animals showed a trend ($P=0.08$) for higher amounts of protein, water and mineral than inefficient individuals. However, the proportions of protein, fat, water, mineral or energy in the whole-body were not significantly different ($P\geq 0.24$) between extreme RFI animals. Concerning the diet effect, animals fed the corn-based diet presented higher quantity and proportion of muscle, water and mineral in the whole-body (+8%; $P<0.08$) and a trend for a higher fat proportion in the carcass than animals fed the grass-based diet.

Finally, extreme RFI animals did not present any differences either in the empty BW or in protein and fat gains ($P\geq 0.26$) over the whole duration of the trial. However, efficient RFI animals showed lower N intake (-6.0%; $P=0.01$) and a trend ($P=0.08$) for higher NUE (+10.6%) than non-efficient animals regardless of the diet. In addition, animals fed the corn-based diet showed higher ($P<0.07$) empty BW, protein and fat gains (+10%, +9.5% and +16.4%, respectively) and higher ($P<0.05$) intake and retained N (+5% and +10%, respectively) than animals fed the grass-based diet.

Relationships between animal performance, body composition, protein metabolism and energy expenditure in extreme RFI young bulls

We evaluated the interrelations between feed efficiency and protein metabolism. First, we analyzed linear relationships within diet between DMI observed during the first feed efficiency test and body composition measured at the slaughter. Intake was negatively related to carcass yield, and to the muscle to fat ratio observed in the 6th rib dissection and positively to reticulum-rumen size (Supplementary Figure S1). Nevertheless, this relationship was only significant in animals fed the corn-based diet (Diet x RFI interaction; $P<0.09$), showing that both carcass yield and muscle to fat ratio decrease when intake increases. In contrast, the reticulum-rumen size increases with intake, the more so in animals fed the corn vs the grass-based diet (Diet x RFI interaction; $P=0.10$).

Results from the other correlations are shown in Supplementary Tables S4 for the grass-based diet and S5 for the corn-based diet. For both diets, we observed negative correlations between FCE and RFI (Average r between diets= -0.42), the dressing percentage and oxygen consumption (Average r between diets= 0.43), DMI and NUE (Average r between diets= -0.53), as well as the dressing percentage and RFI (Average r between diets= 0.55). Also, we found positive correlations between DMI and ADG (Average r between diets= 0.65), between the dressing percentage and the carcass muscle proportion (Average r between diets= 0.58), and between the ADG and the oxygen consumption (Average r between diets= 0.53) with both diets. With the corn-based diet only, DMI was positively correlated to the urea N/ total N ratio ($r=0.80$; $P<0.001$), plasma proteins fractional synthesis rate ($r=0.72$; $P<0.001$) and skeletal-muscle fractional degradation rate ($r=0.71$; $P<0.001$), and negatively related to the dressing percentage ($r=-0.57$; $P<0.001$) and to the carcass muscle proportion ($r=-0.73$; $P<0.001$). Also, the urea N/total N ratio was negatively related to NUE ($r=-0.60$; $P=0.05$). Finally, the skeletal-muscle protein FDR were positively related to the urea N to total N ratio ($r=0.69$; $P<0.001$), the fractional protein synthesis rate of liver plasma proteins ($r=0.47$; $P=0.05$), and negatively related to NUE

($r = -0.40$; $P = 0.09$), the dressing percentage ($r = -0.55$; $P = 0.05$) and the carcass muscle proportion ($r = -0.56$; $P < 0.05$), only when animals were fed the corn-based diet.

Discussion

Understanding the biological determinants underlying RFI remains crucial to assist genetic selection programs and precision feeding. Our results highlight that some mechanisms associated with RFI in fattening bulls were common to both diets, such as the NUE improvement, higher dressing percentage or lower oxygen consumption in efficient vs non-efficient RFI animals. However, a diet-dependent association between RFI and protein turnover rates has been also noted and support the concept of some diet-specific metabolic pathways underlying RFI differences (Jorge-Smeding et al., 2022).

N use efficiency is improved in efficient RFI animals, irrespective of the diet

From a mathematical point of view, efficient RFI animals should present higher NUE (i.e. greater N retention per unit of N intake) than non-efficient animals because of their lower N intake but similar body gain (Carmona et al., 2020) and protein retention (Castro-Bulle et al., 2007). From a biological point of view, higher NUE is also expected in RFI efficient vs non-efficient animals because the lower feeding level of efficient RFI animals should lead to lower fecal endogenous protein losses (INRA, 2018) and lower hepatic amino acid catabolism (Lobley et al., 1992), both entailing N efficiency processes (Calsamiglia et al., 2010).

The combination of different results from the present work suggests that efficient RFI cattle had a better NUE compared to inefficient ones irrespectively of the diet although statistically significant was not reached for all relevant variables because of methodological limits associated to some of them. When N retention was estimated for the whole fattening period (d0-d196) from slaughter data, efficient RFI cattle tended to have an improved NUE over inefficient ones for both diets. The lower urea-N to total N ratio in urine observed in efficient vs inefficient RFI cattle also supports a greater NUE in efficient RFI cattle. In the present study, the lower urinary urea-N/total N ratio was mainly driven by a lower urinary urea excretion because no changes were observed across RFI groups for the urinary excretion of non-ureic N compounds (Data not shown). Non-ureic N excretion in urines should be regarded as virtually independent of N intake and therefore as an obligatory N loss (Pfeffer et al., 2016) resulting from rumen fermentations (most of the urinary purine derivatives have a microbial origin; Bristow et al., 1992) or endogenous metabolism (mostly creatine, creatinine but also endogenous purine derivatives; Dijkstra et al., 2013). A greater ratio of urea-N to total urinary N in cattle is indicative of a greater partition of the N intake towards urines because of either a higher hepatic AA catabolism (Spek et al., 2013) or a higher rumen ammonia absorption (Huntington and Archibeque, 1999) or both. A better partition of N intake towards gain at the expense of urine was also measured in efficient RFI bulls by Guarnido-Lopez et al., (2021) using a different approach, the natural ^{15}N abundance as a NUE biomarker, and a larger experimental setup ($n = 600$, including the present bulls).

By contrast NUE calculated from the N balance measurements did not support a greater NUE in efficient RFI animals despite a measurement period longer than the minimum recommended duration (10 d vs 7 d; Firkins and Reynolds, 2005) and a moderate to high repeatability ($r = 0.77$) of intake between the first RFI test (0-84d) and N balance trial (99-114d). We assume that the N balance method may not capture NUE differences between extreme RFI individuals in beef cattle. Indeed, experimental errors associated to the determination of N retention in growing animals are high because of both N volatile

losses and the accumulation of measuring errors (Martin, 1966) compared to the determination of milk N, which relies on a daily measure of milk yield and a direct accurate laboratory method (Hristov et al., 2019). The N balance method has been largely used to compare N partitioning among dietary treatments (Rumsey et al., 1999; Benchaar et al., 2013) but might not be suitable to detect small NUE differences across individuals fed the same diet. An a posteriori power analysis from our own data revealed that 89 animals per group would be needed for detecting a significant difference in NUE equal to or higher than 10% (i.e. the observed size effect). Similarly several studies conducted in growing beef cattle (Lines et al., 2014; Cabral da Silva et al., 2020; Carmona et al., 2020) or in pigs (Labussière et al., 2015) failed to demonstrate differences in NUE across extreme RFI individuals when using the N balance method. In contrast, an improved N balance and a greater NUE were measured in efficient RFI dairy cattle (Xie et al., 2019; Liu and VandeHaar, 2020), despite an absence of significant differences in urinary or fecal N excretions between extreme individuals (Xie et al., 2019).

In summary, our results suggest that irrespective of the diet, efficient RFI beef cattle are associated with a greater partition of N intake into gain (i.e higher NUE) compared to their inefficient counterparts. In addition, we pointed out the limits of the reference method (N balance in a digestibility stall) to capture individual NUE differences across extreme RFI young bulls.

Dressing percentage increases in RFI efficient animals, irrespective of the diet

The higher partition of N intake into gain noted in efficient RFI animals was associated with heavier and leaner carcasses, as in Basarab et al. (2003) and Asher et al. (2018). Indeed at similar body weight, efficient RFI animals presented a greater dressing percentage than their non-efficient counterparts, which resulted from a higher carcass weight, a greater muscle to fat ratio in the carcass and a smaller non-carcass part (essentially visceral organs and head) whatever the diet. We failed to capture differences in the whole-body fat content across RFI groups, but Charolais breeds are among the leanest breeds (Robelin and Daenicke, 1980), with the lower phenotypic and genetic association to carcass fat deposition (Kelly et al., 2014) and differences among RFI groups might be too small to be detected. Only the non-muscle part of the carcass, calculated by adding the fat and bones, tended to be smaller in efficient vs inefficient RFI individuals. Our results agree with previous studies using large datasets already showing that dressing percentage is phenotypically and genetically higher in efficient vs non-efficient RFI Charolais young bulls (Taussat et al., 2019). In addition, differences in the non-carcass part were only due to smaller organ sizes and smaller heads of efficient RFI individuals because of similar amounts of digestive contents between RFI groups. Similarly, Kenny et al. (2018), concluded that efficient RFI animals present lighter visceral organs, mainly from the digestive tract, than inefficient RFI animals. These differences in visceral mass originated strictly from smaller rumen-reticulum in RFI efficient animals, which significantly influenced differences in body composition as suggested by the significant negative correlation ($r = -0.47$) observed between the dressing percentage and the reticulum-rumen size. This point is important because rumen size is known to vary with the feeding level (Basarab et al., 2003; Fitzsimons et al., 2014). Therefore, current results suggest that the higher intake of inefficient RFI animals may result in bigger rumens and thus in lower carcass dressing, as already hypothesized in beef cattle (Walsh et al., 2008; Campion et al., 2009). Because of their high metabolic rate, digestive organs may limit the availability of absorbed AA to the peripheral tissues (Reynolds, 2006; Lapierre et al., 2006) and thus decrease the overall NUE as observed in the present study. Although our experimental design does not allow to identify cause-effect relationships, our data may support the concept of a biological link between the dressing percentage and N use efficiency as previously reported in growing ruminants (Fluharty et al., 1999) and fishes (Azevedo et al., 2004) across diets.

Protein turnover is related to RFI in a diet-dependent manner

Because of its high metabolic cost associated with non-productive functions, protein turnover rate has been suggested to be a biological mechanism underlying RFI variation in beef cattle (Richardson and Herd, 2004; Cantalapiedra-Hijar et al., 2018). In the present study, we found lower protein turnover rate in skeletal muscle of efficient RFI cattle but only when they were fed the corn-based diet. As discussed herein, this finding is closely associated with the observed diet differences in carcass composition across RFI groups and could be explained by the contrasted nutrient absorption expected across diets.

Carcass muscle deposition tended to be higher in efficient RFI bulls fed the corn-based diet only as indicated by the muscle proportion measured in the 6th rib or estimated in the whole carcass as well as the carcass fat score, all pointing to a trend for leaner carcass. The greater carcass muscle deposition in these animals may be explained by their lower skeletal muscle protein degradation rate estimated from the urinary 3-methyl-histidine excretion, providing that protein synthesis did not decrease in a similar or greater extent. Indeed, in the present study carcass muscle proportion and dressing percentage were both negatively and significantly correlated with the skeletal muscle protein degradation rate in corn- but not in grass- based diets. Although we did not measure the fractional protein synthesis rate in this specific pool, our data suggest that both protein synthesis and degradation rates in carcass muscle were downregulated in efficient vs non-efficient RFI cattle, only when fed a corn-based diet, though to a different extent. First, in the corn-based diet the RFI difference observed for carcass muscle proportion (a proxy of the protein accretion rate) was much lower than the RFI difference found for the skeletal muscle protein degradation rate (2% vs 17%). This led us to think that protein synthesis rate may have also decreased, though to a lesser extent; otherwise the impact on carcass muscle proportion would have been greater. Second, the N isotopic turnover rate measured in plasma proteins, a proxy of the hepatic fractional synthesis rate of plasma proteins (Cantalapiedra-Hijar et al., 2019) also slowed down in efficient RFI animals but only when fed the corn-based diet. Our estimates of the fractional synthesis rate for plasma proteins in this study (4.6%/d on average) were slightly lower than previous values reported in dairy cattle (Raggio et al., 2007 [6.5 to 6.8%/d]) and may be indicative of a relatively lower metabolic rate in growing cattle vs high-yielding lactating dairy cows as well as of methodological differences across isotopic approaches (Cantalapiedra-Hijar et al., 2019). Hepatic synthesis of export proteins generally decreases as nutrient supply decreases (Connell et al., 1997; Caso et al., 2007). Lower nutrient absorption is expected with the lower feed intake of efficient RFI animals, yet lower hepatic plasma protein synthesis in efficient RFI cattle was only observed in our study with corn-based diets. Moreover, the hepatic synthesis rate of export proteins, unlike that of the constitutive ones, may increase in response to insulin secretion in a similar way as the skeletal muscle does (Boirie et al., 2001; Davis et al., 2001). According to (Raj et al., 2004) there may exist a coordinated increase in the protein synthesis rate of hepatic plasma proteins in humans facilitated by the constant delivery of amino acids from muscle degradation rate while Sheffield-Moore et al., (2005) argued that there may exist a complex relationship and interdependence between the metabolism of the hepatic synthesized plasma proteins and skeletal muscle protein. Whether this coordinated response or cross-talking observed in specific physiological or pathological situations in humans also occur in ruminants remains to be elucidated. However, our data showed that despite of using different methodology a significant correlation was observed between plasma proteins synthesis and skeletal muscle protein degradation rates only in corn-based diets, suggesting a lower protein synthesis rate in skeletal muscle of efficient RFI cattle fed the corn-based diet. With the available data, we hypothesize that both protein synthesis and degradation in carcass muscle were likely downregulated (i.e. lower protein turnover) in

efficient RFI cattle when fed corn- but not grass-based diet. The likely greater decrease in protein degradation vs synthesis in these animals would support their higher carcass muscle accretion. As discussed in the review by Cantalapiedra-Hijar et al. (2018), from a theoretical point of view, the most economical way of achieving higher growth efficiencies would be by a reduction in the protein degradation rate rather than by an increase in the synthesis rate. Our data seems to support this theoretical concept only in animals fed the corn-based diet since the greater growth efficiency of low-RFI animals (i.e. lower intake for similar growth rates) is associated with lower protein turnover rate in carcass muscle. Others studies using similar approaches did not observe however differences in protein turnover of skeletal muscle across extreme RFI beef cattle (Richardson and Herd, 2004; Castro Bulle et al., 2007; Gomes et al., 2012) even if animals were fed with energy-dense diets rich in starch. Differences in breed (all of the above-mentioned studies used early-maturing breeds), age or the extent of RFI divergences across extreme RFI animals could somehow explain this disagreement. In contrast, the study by McDonough et al., (2001) found higher calpastatin activity in muscle of efficient RFI beef cattle compatible with a lower protein degradation rate in carcass muscle.

Given the significant contribution of skeletal muscle to the whole-body protein turnover (Lobley, 2003) we would also have expected a lower whole-body protein turnover in efficient RFI cattle fed the corn-based diet. However, our proxy for the whole-body protein degradation rate (i.e. the ^{15}N depletion rate of the whole-body slow turnover pool modeled from urine kinetics) only showed numerically lower values (-12%) in efficient vs inefficient RFI cattle fed corn-based diets. Although this new proxy appears promising to discriminate the whole-body protein turnover across diets differing in protein content (Cantalapiedra-Hijar et al., 2019) or energy nature (data from the present experiment) it may not be accurate enough to discriminate individuals fed the same diet and showing relatively small differences in the whole-body protein turnover rates. In addition, 3 animals were removed from this analysis because of poor kinetics fitting, which could also contribute to the lack of significant differences across extreme animals fed the corn-based diet.

Logical questions arise on why the association between skeletal-muscle protein turnover rates and RFI are only observed with diets based on starch (corn) but not on fiber (grass). Experimental diets mainly differed in the nature and density of the energy (Table 1), leading to a theoretical greater portal absorption of glucose (+91%) and of the propionate to acetate ratio (+13.6%) in corn vs grass-based diets as predicted from chemical analysis and INRA equations (data not shown). Consequently, the expected RFI differences in the absorption of glucogenic substrates may explain the greater insulin plasma concentration observed in corn-based diets (Loncke et al. 2020). Protein synthesis is regulated by the mammalian target of rapamycin (Laplante and Sabatini, 2009), a pathway which is activated by both insulin and branched chain AA signaling cascade (Chou et al., 2012) and has been demonstrated to be upregulated in tissues of efficient RFI beef cattle fed corn-based diets (Elolimy et al., 2019). The greater insulin plasma concentration observed in animals fed the corn- vs grass-based diet could have promoted a favorable metabolic context where the greater amino acid absorption expected in inefficient RFI animals may have translated into higher skeletal muscle protein synthesis through the mammalian target of rapamycin pathway. This hypothesis may be supported by the fact that DMI, and thus nutrient absorption, was significantly and positively correlated with both protein degradation rates in skeletal muscle and synthesis rate of hepatic plasma proteins in animals fed the corn-based diet. In this regard, Jorge-Smeding et al. (2022) evaluated extreme RFI Charolais young bulls fed almost identical diets than in present study and found that the combination of high plasma insulin and branched chain AA concentrations in inefficient RFI animals was observed in corn but not in grass diets, a metabolic feature compatible with the expected increase in muscle protein turnover rates in these animals.

Finally, although lower protein turnover rates may elicit lower urinary endogenous N losses (Lobley, 2003) the improvement of NUE observed in efficient RFI cattle regardless of the diet cannot be entirely ascribed to changes in carcass muscle protein turnover measured in this experiment. Indeed, only a trend for a correlation between skeletal muscle protein degradation rate and NUE was observed in the corn-based diet.

Oxygen consumption is lower in efficient RFI animals, irrespective of the diet

A trend for efficient RFI cattle to consume less oxygen by unit of BW was found regardless of the diet and is consistent with the lower oxygen consumption expected as intake decreases (Blaxter, 1962). Lower oxygen consumption in efficient RFI cattle has been observed in the few studies conducted in beef cattle (Nkrumah et al., 2006; Chaves et al., 2015) and is indicative of lower energy expenditure of these animals. When the oxygen consumption (g/d) measured in the present study from the 100 animals was included in the RFI model it became a significant determinant, and slightly explained DMI variations beyond the metabolic BW and ADG effects, contributing to around 8% of the RFI variations (r^2 of the RFI model changed from 0.844 to 0.851). These results should be interpreted together with differences observed in the dressing percentage across RFI groups, since energy expenditure of visceral tissues is much higher than that of the skeletal-muscle (10.5 ± 3.40 vs 1.02 ± 0.33 MJ/kg tissue/day; Oddy et al., 1984; Burrin et al., 1990). The relationship between body composition and energy expenditure has been already pointed out across extreme RFI animals, where efficient RFI animals showed greater proportion of viscera and lower oxygen consumption than inefficient ones (Basarab et al., 2003; Gomes et al., 2012). Ortigues-Marty et al. (2017) reviewed that portal-drained viscera and liver together represent 80% of the increment in energy expenditure with intake in ruminants while resting skeletal-muscles represent only 5%. In the current study, we compared energy expenditure estimated from body composition determined at slaughter using average in vivo tissue metabolic rates (2.4 kJ/d/g wet tissue for the portal-drained viscera, 0.75 kJ/d/g wet tissue for the liver and 0.12 kJ/d/g wet tissue for the whole-carcass, Ortigues and Doreau, 1995; assuming similar metabolic rates across diets and RFI groups) with those derived from measured oxygen consumption (McLean and Tobin, 1992). We found that efficient RFI animals had lower energy expenditure (-2.1%) associated with splanchnic tissues (liver and portal-drained viscera) but higher energy expenditure (+4.2%) associated with heavier carcasses than inefficient ones. It could be suggested that inefficient RFI animals may utilize a higher proportion of metabolizable energy for non-productive processes than efficient animals. However, when the whole-energy expenditure was estimated from body composition and expressed per kg BW and per day, extreme RFI animals showed similar energy values (146 ± 41 kJ/d/kg empty BW) whatever the diet. These results differ from trends measured with oxygen consumption, suggesting that the different energy expenditure observed between RFI extreme animals are partially but not totally explained by differences in body composition.

Protein turnover entails a high energy cost to the organism (Lobley, 2003) with only protein synthesis accounting for around 23% of the whole-body energy expenditure in ruminants (Caton et al., 2000). We only observed differences in the protein turnover rate of skeletal muscle of animals fed the corn-based diet with no significant changes at the whole-body levels for none of the two studied diets. Since differences in energy expenditure across RFI groups were similar regardless of the diet, our data suggests that changes in the skeletal muscle protein turnover rate associated with RFI in the corn-fed animals may have had a minor impact on energy expenditure.

Conclusions

Our results highlight that some mechanisms associated with RFI were similar across two contrasted diets, such as the NUE improvement, higher dressing percentage or lower oxygen consumption in efficient vs non-efficient RFI animals. However, our results also pointed out that differences in protein turnover in carcass muscle between RFI animals were diet-dependent. The nature of absorbed nutrients and the resulting insulin response with corn- vs grass-based diets may explain the observed RFI by diet interaction in protein turnover rates. Further studies are warranted to confirm diet-specific RFI determinants in beef cattle.

Ethics approval

The protocol of this study was approved by the Ethics Committee of the Auvergne-Rhône-Alpes region and the French Ministry of Higher Education, Research and Innovation (Authorization number: APAFIS #16194-2016101016361277 v6 delivered on 14th January 2019). This experiment was conducted at INRAE, Centre Auvergne-Rhône-Alpes, France.

Data and model availability statement

The data was not deposited in an official repository. Data are confidential but available to reviewers upon request.

Authors ORCIDs

Pablo Guarnido: 0000-0002-5013-0888, Isabelle Ortigues-Marty: 0000-0002-0399-013X, Céline Chantelauze: 0000-0003-3286-3348, Pierre Nozière: 0000-0003-1727-8984, Gonzalo Cantalapiedra-Hijar: 0000-0001-9486-8238

Author contributions

Pablo Guarnido-Lopez: data curation, formal analysis, writing-original draft. Isabelle Ortigues-Marty: conceptualization, methodology, supervision. Pierre Nozière: conceptualization, methodology, data curation and formal analysis. Lorène Salis, Agathe Bes and Céline Chantelauze: data curation and formal analysis. Gonzalo Cantalapiedra-Hijar, conceptualization, methodology, formal analysis, investigation, validation, supervision, project administration, funding acquisition. All authors were involved in writing, reviewing & editing the final manuscript.

Declaration of interest

None

Acknowledgements

We wish to thank APISGENE for their financial support of this project, which forms part of the larger national program BEEFALIM 2020. Pablo Guarnido received funding from INRAE Phase division and APISGENE to conduct his PhD thesis. Thanks to Marine Gauthier (UMRH), Jeremie David (UNH) and Pascal Faure, Patrice Mandon, Sébastien Alcouffe and Dominique Chassaing (Herbipôle) for their great technical support.

References

Allen, M.S., 1996. Physical constraints on voluntary intake of forages by ruminants. *Journal of Animal Science* 74, 3063–3075.

Asher, A., Shabtay, A., Cohen-Zinder, M., Aharoni, Y., Miron, J., Agmon, R., Halachmi, I., Orlov, A., Haim, A., Tedeschi, L.O., Carstens, G.E., Johnson, K.A., Brosh, A., 2018. Consistency of Feed Efficiency Ranking and Mechanisms Associated with Inter-Animal Variation among Growing Calves. *Journal of Animal Science* 96, 990–1009.

Aufrère, J., Cartailleur, D., 1988. Mise au point d'une méthode de laboratoire de prévision de la dégradabilité des protéines alimentaires des aliments concentrés dans le rumen (Development of a laboratory method for predicting the degradability of dietary proteins in rumen-based foods). *Annales Zootechnie* 37, 255–270.

Aufrère, J., 1982. Etude de la prévision de la digestibilité des fourrages par une méthode enzymatique (Study of the forecast of the digestibility of fodder by an enzymatic method). *Annales Zootechnie* 31, 111–130.

Azevedo, P.A., Leeson, S., Cho, C.Y., Bureau, D.P., 2004. Growth, nitrogen and energy utilization of juveniles from four salmonid species: diet, species and size effects. *Aquaculture* 234, 393–414.

Basarab, J.A., McCartney, D., Okine, E.K., Baron, V.S., 2011. Relationships between progeny residual feed intake and dam productivity traits. *Canadian Journal of Animal Science* 87, 489–502.

Basarab, J.A., Price, M.A., Aalhus, J.L., Okine, E.K., Snelling, W.M., Lyle, K., 2003. Residual feed intake and body composition in young growing cattle. *Canadian Journal of Animal Science* 83, 189–204.

Benchaar, C., Hassanat, F., Gervais, R., Chouinard, P.Y., Julien, C., Petit, H.V., Massé, D.I., 2013. Effects of increasing amounts of corn dried distillers grains with solubles in dairy cow diets on methane production, ruminal fermentation, digestion, N balance, and milk production. *Journal of Dairy Science* 96, 2413–2427.

Berry, D.P., Crowley, J.J., 2012. Residual intake and body weight gain: A new measure of efficiency in growing cattle. *Journal of Animal Science* 90, 109–115.

- Blaxter, K.L., 1962. The energy metabolism of ruminants. Hutchinson. 3th Ed, Springfield, Thomas.
- Boddicker, N., Gabler, N.H., Spurlock, M.E., Nettleton, D., Dekkers, J.C.M., 2011. Effects of ad libitum and restricted feeding on early production performance and body composition of Yorkshire pigs selected for reduced residual feed intake. *Animal* 5, 1344–1353.
- Boirie, Y., Áre, B., Ritz, P., 2001. Energetic cost of protein turnover in healthy elderly humans. *Integrative Journal of Obesity* 25, 601-605.
- Boisclair, Y.R., Bauman, D.E., Bell, A.W., Dunshea, F.R., Harkins, M., 1994. Nutrient Utilization and Protein Turnover in the Hindlimb of Cattle Treated with Bovine Somatotropin. *The Journal of Nutrition* 124, 664–673.
- Bristow, A.W., Whitehead, D.C., Cockburn, J.E., 1992. Nitrogenous constituents in the urine of cattle, sheep and goats. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 59, 387–394.
- Burrin, D.G., Ferrell, C.L., Britton, R.A., Bauer, M., 1990. Level of nutrition and visceral organ size and metabolic activity in sheep*. *British Journal of Nutrition* 64, 439–448.
- Calsamiglia, S., Ferret, A., Reynolds, C.K., Kristensen, N.B., Vuuren, A.M., van, 2010. Strategies for optimizing nitrogen use by ruminants. *Animal* 4, 1184–1196.
- Campion, B., Keane, M.G., Kenny, D.A., Berry, D.P., 2009. Evaluation of estimated genetic merit for carcass weight in beef cattle: Live weights, feed intake, body measurements, skeletal and muscular scores, and carcass characteristics. *Livestock Science* 126, 87–99.
- Cantalapiedra-Hijar, G., Abo-Ismaïl, M., Carstens, G.E., Guan, L.L., Hegarty, R., Kenny, D.A., McGee, M., Plastow, G., Ortigues-Marty, I., 2018. Review: Biological determinants of between-animal variation in feed efficiency of growing beef cattle. *Animal* 12, s321-s335.
- Cantalapiedra-Hijar, G., Fouillet, H., Chantelauze, C., Khodorova, N., Bahloul, L., Ortigues-Marty, I., 2020. The isotopic nitrogen turnover rate as a proxy to evaluate in the long-term the protein turnover in growing ruminants. *Journal of Agricultural Science* 157, 701–710.
- Carbone, J.W., Margolis, L.M., Pasiakos, S.M., 2016. Cellular and Molecular Mechanisms of Protein Synthesis Among Tissues. *The Molecular Nutrition of Amino Acids and Proteins*, 39–47.
- Carmona, P., Costa, D.F.A., Silva, L.F.P., 2020. Feed efficiency and nitrogen use rankings of *Bos indicus* steers differ on low and high protein diets. *Animal Feed Science and Technology* 263, 114493.
- Caso, G., Feiner, J., Mileva, I., Bryan, L.J., Kelly, P., Autio, K., Gelato, M.C., McNurlan, M.A., 2007. Response of albumin synthesis to oral nutrients in young and elderly subjects. *The American Journal of Clinical Nutrition* 85, 446–451.
- Castro Bulle, F.C.P, Paulino, P. V., Sanches, A.C., Sainz, R.D., 2007. Growth, carcass quality, and protein and energy metabolism in beef cattle with different growth potentials and residual feed intakes. *Journal of Animal Science* 85, 928–936.
- Caton, J. S., Bauer, M. L., Hidari, H., 2000. Metabolic Components of Energy Expenditure in Growing Beef Cattle - Review -. *Asian-Australasian Journal of Animal Science* 13, 702–710.
- Chaves, A.S., Nascimento, M.L., Tullio, R.R., Rosa, A.N., Alencar, M.M., Lanna, D.P., 2015. Relationship of efficiency indices with performance, heart rate, oxygen consumption, blood parameters, and estimated heat production in Nellore steers. *Journal of Animal Science* 93, 5036–5046.

- Chou, S-D., Prince, T., Gong, J., Calderwood, S.K., 2012. mTOR Is Essential for the Proteotoxic Stress Response, HSF1 Activation and Heat Shock Protein Synthesis. *Plos one* 7, e39679.
- Connell, A., Calder, A.G., Anderson, S.E., and Lobley, G.E., 1997. Hepatic monitored protein synthesis in the sheep: effect of intake as by use of stable-isotope-labelled glycine, leucine and phenylalanine. *British Journal of Nutrition* 77, 255–282.
- Coyle, S., Fitzsimons, C., Kenny, D.A., Kelly, A.K., Mcgee, M., Simpson, A., 2016. Repeatability of feed efficiency in steers offered a high-concentrate diet. *Journal of Animal Science* 94, 719.
- da Silva, D., Pereira, G. R., Mello Lima, A., Machado, J.F., Ferreira, L.A., Tomich, R.T., Gesteira-Corvalho, S., Maurício, R.M., Magalhães Campos, M., 2020. Grouping crossbred Holstein x Gyr heifers according to different feed efficiency indexes and its effects on energy and nitrogen partitioning, blood metabolic variables and gas exchanges. *Plos one* 15, e0238419.
- Davis, T.A., Fiorotto, M.L., Beckett, P.R., Burrin, D.G., Reeds, P.J., Wray-Cahen, D., Nguyen, H.V., Beck-Ett, P.R., 2001. Differential effects of insulin on peripheral and visceral tissue protein synthesis in neonatal pigs. *American Journal Physiology and Endocrinology Metabolism* 280, E770–E779.
- Dijkstra, J., Oenema, O., van Groenigen, J.W., Spek, J.W., van Vuuren, A.M., and Bannink, A., 2013. Diet effects on urine composition of cattle and N₂O emissions. *Animal* 7, 292–302.
- Durunna, O.N., Mujibi, F.D.N., Goonewardene, L., Okine, E.K., Basarab, J.A., Wang, Z., and Moore, S.S., 2011. Feed efficiency differences and reranking in beef steers fed grower and finisher diets. *Journal of Animal Science* 89, 158–167.
- Ebeling, M.E., 1968. The Dumas Method for Nitrogen in Feeds. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* 51, 766–770.
- Eenaeme, C. Van, Evrard, M., Hornick, J.L., Baldwin, P., Diez, M., Istasse, L., 1998. Nitrogen balance and myofibrillar protein turnover in double muscled Belgian Blue bulls in relation to compensatory growth after different periods of restricted feeding. *Canadian Journal of Animal Science* 78, 549–559.
- Elolimy, A.A., Abdel-Hamied, E., Hu, L., McCann, J.C., Shike, D.W., Loo, J.J., 2019. Rapid communication: Residual feed intake in beef cattle is associated with differences in protein turnover and nutrient transporters in ruminal epithelium. *Journal of Animal Science* 97, 2181–2187.
- Faisant, N., Planchot, V., Kozłowski, F., Pacouret, M-P., Colonna, P., Champ, M., 1995. Resistant starch determination adapted to products containing high level of resistant starch. *Sciences des aliments* 15, 83–89.
- Firkins, J.L., Reynolds, C., 2005. Whole-animal nitrogen balance in cattle. In *Nitrogen and Phosphorus Nutrition of Cattle: Reducing the Environmental Impact of Cattle Operations*, pp. 167–186. CABI Publishing.
- Fitzsimons, C., Kenny, D.A., Mcgee, M., 2014. Visceral organ weights, digestion and carcass characteristics of beef bulls differing in residual feed intake offered a high concentrate diet. *Animal* 8, 949–959.
- Fluharty, F.L., McClure, K.E., Solomon, M.B., Clevenger, D.D., Lowe, G.D., 1999. Energy source and ionophore supplementation effects on lamb growth, carcass characteristics, visceral organ mass, diet digestibility, and nitrogen metabolism. *Journal of Animal Science* 77, 816–823.

- Garcia, F., Agabriel, J., 2008. CompoCow: A predictive model to estimate variations in body composition and the energy requirements of cull cows during finishing. *Journal of Agricultural Science* 146, 251–265.
- Gomes, R.C., Sainz, R.D., Silva, S.L., César, M.C., Bonin, M.N., Leme, P.R., 2012. Feedlot performance, feed efficiency reranking, carcass traits, body composition, energy requirements, meat quality and calpain system activity in Nellore steers with low and high residual feed intake. *Livestock Science* 150, 265–273.
- Guarnido-Lopez, P., Ortigues-Marty, I., Taussat, S., Fossaert, C., Renand, G., Cantalapiedra-Hijar, G., 2021. Plasma proteins $\delta^{15}\text{N}$ vs plasma urea as candidate biomarkers of between-animal variations of feed efficiency in beef cattle: Phenotypic and genetic evaluation. *Animal* 15, 100318.
- Hristov, A.N., Bannink, A., Crompton, L.A., Huhtanen, P., Kreuzer, M., McGee, M., Nozière, P., Reynolds, C.K., Bayat, A.R., Yáñez-Ruiz, D.R., Dijkstra, J., Kebreab, E., Schwarm, A., Shingfield, K.J., Yu, Z., 2019. Invited review: Nitrogen in ruminant nutrition: A review of measurement techniques. *Journal of Dairy Science* 102, 5811–5852.
- Huntington, G.B., Archibeque, S.L., 1999. Practical aspects of urea and ammonia metabolism in ruminants Hemp as a feedstuff for production animals View project Professor Emeritus View project. In *American Society of Animal Science*. North Carolina State University, Raleigh.
- Inkster, J.E., Deb.Hovell, F.D., Kyle, D.J., Brown, D.S., Lobley, G.E., 1989. The effect of clenbuterol on basal protein turnover and endogenous nitrogen loss of sheep. *British Journal of Nutrition* 62, 285–296.
- INRA, 2018. INRA feeding system for ruminants. Wageningen Academic Publishers.
- Jorge-Smeding, E., Bonnet, M., Renand, G., Taussat, S., Graulet, B., Ortigues-Marty, I., Cantalapiedra-Hijar, G., 2021. Common and diet-specific metabolic pathways underlying residual feed intake in fattening Charolais yearling bulls. *Scientific Reports*, (In press)
- Kelly, M.J., Tume, R.K., Fortes, M., Thompson, J.M., 2014. Whole-genome association study of fatty acid composition in a diverse range of beef cattle breeds. *Journal of Animal Science* 92, 1895–1901.
- Kenny, D.A., Fitzsimons, C., Waters, S.M., McGee, M., 2018. Invited review: Improving feed efficiency of beef cattle - The current state of the art and future challenges. *Animal* 12, 1815–1826.
- Kleiber, M., 1961. The fire of life. An introduction to animal energetics. The fire of life. An introduction to animal energetics. John Wiley & Sons Ed, Inc., New York: London.
- Kohn, R.A., Dinneen, M.M., Russek-Cohen, E., 2005. Using blood urea nitrogen to predict nitrogen excretion and efficiency of nitrogen utilization in cattle, sheep, goats, horses, pigs, and rats. *Journal of Animal Science* 83, 879–889.
- Labussière, E., Dubois, S., Gilbert, H., Thibault, J.N., Le Floc’h, N., Noblet, J., Van Milgen, J., 2015. Effect of inflammation stimulation on energy and nutrient utilization in piglets selected for low and high residual feed intake. *Animal* 9, 1653–1661.
- Lahart, B., Prendiville, R., Buckley, F., Kennedy, E., Conroy, S.B., Boland, T.M., McGee, M., 2020. The repeatability of feed intake and feed efficiency in beef cattle offered high-concentrate, grass silage and pasture-based diets. *Animal* 14, 2288–2297.

- Lapierre, H., Pacheco, D., Berthiaume, R., Ouellet, D.R., Schwab, C.G., Dubreuil, P., Holtrop, G., Lobley, G.E., 2006. What is the true supply of amino acids for a dairy cow? *Journal of dairy science* 89, E1–E14.
- Laplante, M., Sabatini, D.M., 2009. mTOR signaling at a glance. *Journal of Cell Science* 122, 3589–3594.
- Lines, D.S., Pitchford, W.S., Bottema, C.D.K., Herd, R.M., Oddy, V.H., 2014. Selection for residual feed intake affects appetite and body composition rather than energetic efficiency. *Animal Production Science* 58, 175–184.
- Liu, E., VandeHaar, M.J., 2020. Relationship of residual feed intake and protein efficiency in lactating cows fed high- or low-protein diets. *Journal of Dairy Science* 103, 3177–3190.
- Lobley, G.E., 2003. Protein turnover-what does it mean for animal production? *Canadian Journal of Animal Science* 87, 327–340.
- Lobley, G.E., Harris, A.M., Anderson, S.E., 1992. Responses in tissue protein synthesis to sub- and supra-maintenance intake in young growing sheep : comparison of large-dose and continuous-infusion techniques. *British Journal of Nutrition* 68, 373–388.
- McLean, J. A., Tobin, G., 1990. *Animal and Human Calorimetry*. Cambridge University Press, Cambridge, U.K.
- Makkar, H., Beaver, D., 2012. Optimization of feed use efficiency in ruminant production systems. *FAO Symposium Proceedings*, Bangkok, Thailand.
- Martin, A.K., 1966. Some errors in the determination of nitrogen retention of sheep by nitrogen balance studies. *British Journal of Nutrition* 20, 325–337.
- McDonagh, M.B., Herd, R.M., Richardson, E.C., Oddy, V.H., Archer, J.A., Arthur, P.F., 2001. Meat quality and the calpain system of feedlot steers following a single generation of divergent selection for residual feed intake. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 41, 1013–1021.
- Midttun, Ø., Kvalheim, G., Ueland, P.M., 2013. High-throughput, low-volume, multianalyte quantification of plasma metabolites related to one-carbon metabolism using HPLC-MS/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 405, 2009–2017.
- Mottet, A., de Haan, C., Falcucci, A., Tempio, G., Opio, C., Gerber, P., 2017. Livestock: On our plates or eating at our table? A new analysis of the feed/food debate. *Global Food Security* 14, 1–8.
- Moughan, P.J., Fuller, M.F., 2003. Amino Acids in Animal Nutrition. In *Amino Acids in Animal Nutrition*, pp. 187–202. CAB International.
- Mpetile, Z., 2014. Effect of divergent selection for residual feed intake on immune system of Yorkshire pigs. Iowa State University, Digital Repository, Ames.
- Nishizawa, N., Toyoda, Y., Noguchi, T., Hareyama, S., Itabashi, H., Funabiki, R., 1979. N-tau-methylhistidine content of organs and tissues of cattle and an attempt to estimate fractional catabolic and synthetic rates of myofibrillar proteins of skeletal muscle during growth by measuring urinary output of N-tau-methylhistidine. *The British journal of nutrition* 42, 247–252.
- Nkrumah, J.D., Okine, E.K., Mathison, G.W., Schmid, K., Li, C., Basarab, J.A., Price, M.A., Wang, Z., Moore, S.S., 2006. Relationships of feedlot feed efficiency, performance, and feeding behavior

with metabolic rate, methane production, and energy partitioning in beef cattle. *Journal of Animal Science* 84, 145–153.

Oddy, V.H., Gooden, J.M., Annison, E.F., 1984. Partitioning of nutrients in Merino ewes. I. Contribution of skeletal muscle, the pregnant uterus and the lactating mammary gland to total energy expenditure. *Australian Journal of Biological Science* 37, 375–388.

Ortigue-Marty, I., Cantalapiedra-Hijar G., Vernet, J., Nozière, P., 2017. De l'énergie de la ration à l'utilisation des nutriments chez les ruminants : quel rôle pour les tissus splanchniques ? *Cahiers de Nutrition et de Diététique* 52, 45–53.

Ortigue, I., Doreau, M., 1995. Responses of the splanchnic tissues of ruminants to changes in intake: absorption of digestion end products, tissue mass, metabolic activity and implications to whole animal energy metabolism. *Annales de Zootechnie* 44, 321–346.

Pfeffer, E., Schuba, J., Südekum, K-H., 2016. Nitrogen supply in cattle coupled with appropriate supply of utilisable crude protein at the duodenum, a precursor to metabolisable protein. *Archives of Animal Nutrition* 70, 293–306.

Raggio, G., Lobley, G.E., Lemosquet, S., Rulquin, H., Lapierre, H., 2006. Effect of casein and propionate supply on whole body protein metabolism in lactating dairy cows. *Canadian Journal of Animal Science* 86, 81–89.

Raj, D.S.C., Dominic, E.A., Wolfe, R., Shah, V.O., Bankhurst, A., Zager, P.G., Ferrando, A., 2004. Coordinated increase in albumin, fibrinogen, and muscle protein synthesis during hemodialysis: Role of cytokines. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* 286, E658-E664.

Reynolds, C.K., 2006. Splanchnic Metabolism of Amino Acids in Ruminants. In *Ruminant Physiology. Digestion, metabolism and impact of nutrition on gene expression, immunology and stress.*, pp. 225–248. Academic Publishers, The Netherlands, Wageningen.

Richardson, E.C., Herd, R.M., 2004. Biological basis for variation in residual feed intake in beef cattle. 2. Synthesis of results following divergent selection. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 44, 431.

Robelin, J., Geay, Y., 1975. Estimation de la composition de la carcasse des taurillons à partir de la composition de la 6ème côte. *Centre Recherche Zootechnie Vétérinaire* 22, 41–44.

Robelin, J., Geay, Y., Barbojron, C., and Jailler, R., 1978. Estimation de la composition chimique du corps entier des bovins à partir du poids des dépôts adipeux totaux. *Annales de Zootechnie* 27, 159–167.

Robelin, J., Geay, Y., Barbojron, C., Jailler, R., 1978. Estimation de la composition chimique du corps entier des bovins à partir du poids des dépôts adipeux totaux. *Annales de Zootechnie* 27, 159–167.

Rumsey, T.S., Elsasser, T.H., Kahl, S., 1999. Performance and digestibilities of beef cattle fed diets supplemented with either soybean meal or roasted soybeans and implanted with Synovex. *Journal of Animal Science* 77, 1631–1637.

Sheffield-Moore, M., Paddon-Jones, D., Sanford, A.P., Rosenblatt, J.I., Matlock, A.G., Cree, M.G., Wolfe, R.R., 2005. Mixed muscle and hepatic derived plasma protein metabolism is differentially regulated in older and younger men following resistance exercise. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* 288, 922–929.

- Van Soest, P.J., Robertson, J.B., Lewis, B.A., 1991. Methods for Dietary Fiber, Neutral Detergent Fiber, and Nonstarch Polysaccharides in Relation to Animal Nutrition. *Journal of Dairy Science* 74, 3583–3597.
- Taussat, S., Saintilan, R., Krauss, D., Maupetit, D., Fouilloux, M.N., Renand, G., 2019. Relationship between feed efficiency and slaughter traits of french charolais bulls. *Journal of Animal Science* 97, 2308–2319.
- Walsh, K., O’Kiely, P., Moloney, A.P., Boland, T.M., 2008. Intake, performance and carcass characteristics of beef cattle offered diets based on whole-crop wheat or forage maize relative to grass silage or ad libitum concentrates. *Livestock Science* 116, 223–236.
- Wang, Z., Colazo, M.G., Basarab, J.A., Goonewardene, L.A., Ambrose, D.J., Marques, E., Plastow, G., Miller, S.P., Moore, S.S., 2012. Impact of selection for residual feed intake on breeding soundness and reproductive performance of bulls on pasture-based multisire mating. *Journal of Animal Science* 90, 2963–2969.
- Xie, Y., Wu, Z., Wang, D., Liu, J., 2019. Nitrogen partitioning and microbial protein synthesis in lactating dairy cows with different phenotypic residual feed intake. *Journal of Animal Science and Biotechnology* 10, 54.
- Zerjal, T., Härtle, S., Gourichon, D., Guillory, V., Bruneau, N., Laloë, D., Pinard-van der Laan, M-H., Trapp, S., Bed’hom, B., Quéré, P., 2021. Assessment of trade-offs between feed efficiency, growth-related traits, and immune activity in experimental lines of layer chickens. *Genetics Selection Evolution* 53, 1–17.

Tables

 Table 1: Ingredients, chemical composition and feed values of the experimental diets tested on fattening Charolais bulls¹

	Grass-based diet	Corn-based diet
Ingredient composition (% of DM)		
Forages		
Corn silage	-	62.1 ± 0.84
Grass silage	59.2 ± 3.15	-
Wheat straw	5.08 ± 0.82	4.08 ± 0.16
Concentrate		
Wheat grain	7.68 ± 0.22	20.8 ± 0.42
Beet pulp	23.7 ± 3.22	-
Soybean meal	3.93 ± 1.47	11.5 ± 0.23
Bicarbonate	-	0.67 ± 0.01
Minerals and vitamin mix*	0.38 ± 0.01	0.35 ± 0.01
Chemical composition (g/kg of DM)		
OM	883 ± 5.75	955 ± 1.56
Crude protein	141 ± 4.94	140 ± 8.48
NDF	454 ± 37.5	331 ± 1.41
ADF	254 ± 21.2	158 ± 10.6
Starch	48.5 ± 4.90	329 ± 1.41
Starch/NDF (g/g)	0.11 ± 0.02	0.99 ± 0.01
In vitro enzymatic digestibility ² (%)		
DM	73.3 ± 3.01	75.3 ± 1.04
OM	74.2 ± 4.03	77.4 ± 1.02
Feed Values ³		
Net Energy (Mcal/kg)	1.51 ± 0.09	1.66 ± 0.01
Rumen CP degradability (%) ⁴	74.8 ± 1.13	72.8 ± 0.21
MP (g/kg of DM)	82.0 ± 0.00	84.9 ± 1.41
MP/Net energy (g/Mcal) ⁵	54.3 ± 3.57	51.1 ± 0.46
RPB (g/kg of DM) ⁶	9.00 ± 4.24	4.00 ± 5.65
Energy density (Mcal/UEB) ⁷	1.61 ± 0.13	1.87 ± 0.04

¹Means and SD of experimental diets from the two years (2019 and 2020).

*Minerals and vitamin mix: 5 % P, 25 % Ca, 8 % Mg, 0.2 % Na, vitamin A (210 mg/kg), vitamin D3 (3.75 mg/kg), vitamin E (2730 mg/kg) and vitamin B1 (4.5 mg/kg).

²Estimated from enzymatic digestion with pepsine-cellulase (Aufrère, 1982)

³Feed values were estimated from chemical composition and proportion of ingredients by taking into account digestive interactions (INRA, 2018).

⁴Estimated from an enzymatic hydrolysis assay for each feed in the concentrate (Aufrère and Cartailleur, 1988) or from chemical composition (CP and NDF) for forages (INRA, 2018).

⁵Metabolizable to Net energy ratio. Recommended values are between 53 and 48 for body weights of 400 and 700 kg, respectively, in fattening Charolais bulls (INRA, 2018).

⁶Rumen protein balance, representing nitrogen intake minus non-ammonia nitrogen at the duodenum (INRA, 2018).

⁷Dietary energy was calculated as energy level divided by fill units (UEB; INRA, 2018)

Table 2: Animal performance during a 84-d feed efficiency test in extreme RFI Charolais young bulls fed either a grass-silage or corn-silage diet

	Grass-based diet		Corn-based diet		SEM	<i>P</i> -value		
	Low RFI	High RFI	Low RFI	High RFI		Diet	RFI	Diet x RFI
Number of animals	8	8	8	8				
Animal performances								
Initial body weight (kg)	440	412	429	429	2.1	0.86	0.41	0.40
Initial age (days)	294	293	294	294	12.9	0.67	0.48	0.38
Final body weight (kg)	540	512	560	561	9.8	0.07	0.47	0.43
DMI (kg/d)	7.93	8.47	8.65	9.75	0.147	0.001	0.004	0.29
ADG (kg/d) [‡]	1.15	1.12	1.57	1.59	0.011	0.001	0.92	0.75
FCE (kg/kg)	0.145	0.132	0.181	0.163	0.0036	0.001	0.04	0.68
RFI (kg/d)	-0.45	0.49	-0.58	0.48	0.012	0.58	<0.001	0.28
Adipocyte size*								
Day 0 (µm)	70.8	68.3	62.3	67.9	14.7	0.19	0.63	0.22
Day 84 (µm)	87.2	82.3	85.4	92.1	10.7	0.30	0.81	0.14
Gain (µm/d)	0.19	0.17	0.32	0.29	0.13	0.009	0.56	0.93
Ultrasound fat depth [†]								
Day 0 (cm)	0.26	0.23	0.25	0.25	0.016	0.63	0.26	0.27
Day 84 (cm)	0.34	0.33	0.36	0.39	0.018	0.04	0.52	0.35
Gain (µm/d)	9.52	11.9	13.1	16.6	1.70	0.09	0.09	0.96

* Adipocytes were sampled by subcutaneous biopsy conducted in the middle of a triangle formed by the last lumbar vertebrae, tail base and ischial tuberosity and measured with optic microscopy (Garcia and Agabriel, 2008).

[†] Ultrasound fat depth represents the average from four anatomical regions (back, rib, gluteus and lumbar region) measured by ultrasound echography.

[‡] Average daily gain has been calculated as the linear regression of body weight over time (0-84d).

Table 3: Nitrogen balance of extreme RFI Charolais young bulls fed either a grass-silage or corn-silage diet

	Grass-based diet		Corn-based diet		SEM	<i>P</i> -value		
	Low RFI	High RFI	Low RFI	High RFI		Diet	RFI	Diet x RFI
Number of animals	8	8	8	8				
BW before N balance (kg)*	576	550	599	598	15.2	0.02	0.37	0.40
Nitrogen balance								
g/kg BW/d								
N intake	0.314	0.332	0.318	0.362	0.0074	0.02	0.001	0.10
N feces	0.113	0.120	0.103	0.122	0.0039	0.33	0.002	0.15
N digested	0.200	0.211	0.215	0.240	0.0057	0.001	0.006	0.23
N urines	0.121	0.124	0.123	0.143	0.0046	0.03	0.01	0.06
Total N excreted	0.234 ^c	0.244 ^b	0.226 ^c	0.266 ^a	0.0049	0.20	0.001	0.009
N retained	0.079	0.087	0.092	0.096	0.0088	0.16	0.45	0.82
N partition								
g/g N intake								
N feces	0.360	0.363	0.323	0.337	0.0092	0.001	0.33	0.51
N urines	0.388	0.381	0.387	0.397	0.0194	0.69	0.94	0.65
Total N excreted	0.749	0.744	0.710	0.734	0.0202	0.26	0.65	0.49
NUE ¹	0.251	0.256	0.289	0.265	0.0212	0.26	0.65	0.49
g/g digested N								
N urines	0.608	0.600	0.571	0.601	0.0632	0.57	0.73	0.55
N retained	0.391	0.400	0.428	0.399	0.0311	0.57	0.73	0.55

^{a,b,c} Averages with different letters on the same row are significantly different ($P < 0.05$)

*Nitrogen balance trials were conducted 15 days (first group) and 32 days (second group) after the end of the first feed efficiency test

¹N use efficiency, calculated as retained N by unit of N intake

Table 4: Plasma and urinary metabolites as well as urinary parameters in extreme RFI Charolais young bulls fed either a grass-silage or corn-silage diet sampled during the nitrogen balance trial

	Grass-based diet		Corn-based diet		SEM	P-value		
	Low RFI	High RFI	Low RFI	High RFI		Diet	RFI	Diet x RFI
Number of animals	8	8	8	8				
Plasma metabolites								
Insulin ($\mu\text{g/L}$)	0.34	0.36	0.69	0.92	0.051	0.001	0.06	0.08
Urea concentration (g/L)	0.132	0.125	0.163	0.175	0.01	0.003	0.82	0.47
Urine metabolites ¹								
Urea								
Concentration (g/L)	4.57	4.80	9.33	10.7	0.02	0.001	0.97	0.96
Excretion (g/d)	62.1	62.3	77.2	101	16.9	0.001	0.04	0.06
Creatinine								
Concentration (mM)	14.4	13.5	22.4	19.5	1.91	0.001	0.01	0.15
Excretion (mmol/d)	194	178	183	184	3.8	0.64	0.21	0.16
3-methyl-histidine								
Concentration (mM)	197	188	351	334	13.8	0.001	0.35	0.81
Excretion (mmol/d)	2680	2494	2884	3144	76.7	0.01	0.81	0.12
3-methyl-histidine /Creatinine	13.8	13.9	15.7	17.1	0.26	0.001	0.16	0.19
Urinary parameters								
N concentration (g/L)	0.50	0.51	0.87	0.89	0.02	0.001	0.73	0.85
Urea N/total N (g/g)	0.41	0.42	0.48	0.54	0.02	0.001	0.03	0.14
Urea clearance (L/d/BW)*	0.86	0.90	0.82	0.98	0.13	0.83	0.27	0.49

¹Urine metabolites were analyzed from a representative sample of 24h urine total collection performed during 10d.

*Urea clearance rate, expressed as liters of plasma daily cleared of urea per kg of body weight and calculated according to Kohn et al., 2005.

Table 5: Isotopic N kinetics in plasma and urine, and estimated fractional degradation rate of skeletal muscle proteins of extreme RFI Charolais young bulls fed either a grass-silage or corn-silage diet

	Grass-based diet		Corn-based diet		SEM	<i>P</i> -value		
	Low RFI	High RFI	Low RFI	High RFI		Diet	RFI	Diet x RFI
Number of animals [†]	8	8	8	8				
Plasma								
Initial ¹⁵ N enrichment (δ ¹⁵ N ₀ , ‰)	21.1	21.7	17.9	18.5	1.76	0.03	0.58	0.99
Final ¹⁵ N enrichment (δ ¹⁵ N _∞ , ‰)	8.19	7.90	6.61	7.14	0.314	<0.001	0.60	0.08
Fractional depletion rate (k, %/d) ^a	4.38 ^c	4.33 ^c	4.61 ^b	5.12 ^a	0.001	0.001	0.11	0.04
Urine								
Initial ¹⁵ N enrichment (δ ¹⁵ N ₀ , ‰)								
Fast turnover pool	49.1	46.1	43.6	48.3	4.79	0.56	0.99	0.50
Slow turnover pool	14.8	15.4	11.8	13.9	1.28	0.01	0.37	0.76
Fractional depletion rate (k, %/d)								
Fast turnover pool	81.7	79.5	86.8	87.1	4.38	0.12	0.92	0.68
Slow turnover pool ^β	5.28	5.32	6.26	7.11	0.053	0.01	0.34	0.38
Skeletal-muscle								
FDR (%/day) [*]	1.43 ^b	1.39 ^b	1.40 ^b	1.64 ^a	0.015	0.07	0.11	0.02

^{a,b} Averages with different letters within the same row are significantly different ($P<0.05$)

[†] 3 animals were removed from the urinary ¹⁵N kinetics (2 individuals RFI- and 1 individual RFI+, both in the corn-based diet) because of their poor bi-exponential model's fitting.

^a The plasmatic fractional depletion rate of ¹⁵N represent the fractional synthesis rate (FSR) of plasma proteins (Cantalapiedra-Hijar et al., 2019).

^β The urinary fractional depletion rate of ¹⁵N in the slow turnover pool represents the fractional degradation rate (FDR) of the whole-body protein mass (Cantalapiedra-Hijar et al., 2019).

^{*} Fractional degradation rate estimated according to Castro-Bulle et al. (2007) from the measured urinary 3-methyl-histidine excretion during N balance (Table 4) and the estimated muscle in carcass (Table 8).

Table 6: Oxygen consumption and CO₂ emission[†] in extreme RFI Charolais young bulls fed either a grass-silage or corn-silage diet.

	Grass-based diet		Corn-based diet		SEM	P-Value		
	Low RFI	High RFI	Low RFI	High RFI		Diet	RFI	Diet x RFI
Number of animals	8	8	8	8				
O ₂								
L/d	4173	4191	4416	4509	153.6	0.03	0.65	0.76
L/kg BW/d	7.06	7.31	7.17	7.37	0.194	0.41	0.08	0.71
CO ₂								
L/d	4702	4762	4899	4992	262.1	0.12	0.57	0.90
L/kg BW/d	7.92	8.32	7.96	8.15	0.241	0.67	0.05	0.47
CO ₂ /O ₂ (L/L)	1.13	1.14	1.11	1.11	0.005	0.01	0.83	0.56

[†]O₂ consumption and CO₂ emission were measured through the Greenfeed ® system in g/d, transformations to L/d were conducted following Kleiber (1961) and assuming standard conditions of temperature and humidity.

Table 7: Measured body composition at slaughter of extreme RFI Charolais bulls fed either a grass-silage or corn-silage diet

	Grass-based diet		Corn-based diet		SEM	<i>P</i> -values		
	Low RFI	High RFI	Low RFI	High RFI		Diet	RFI	Diet x RFI
Number of animals	8	8	8	8				
Slaughter age (d)	509	512	509	507	3.2	0.69	0.96	0.78
Fattening duration (d)	216	217	215	213	1.7	0.54	0.95	0.67
Body weight before bleeding (kg)	676	657	696	696	15.6	0.03	0.48	0.48
Carcass conformation score [†]	10.7	10.7	11.2	11.0	0.12	0.10	0.63	0.51
Carcass fat score ^{††}	5.15 ^b	5.00 ^b	5.12 ^b	5.87 ^a	0.115	0.04	0.13	0.05
Carcass weight (kg)	419	399	447	430	9.82	0.009	0.03	0.86
Dressing percentage (%)	62.0	60.7	64.4	62.0	0.42	0.003	0.003	0.18
Digestive content (kg)	66.5	69.4	64.4	66.8	4.28	0.59	0.54	0.96
Empty body weight (kg)	610	588	632	629	13.2	0.009	0.28	0.39
Organs and body parts (% empty body weight)								
Blood	3.82	4.12	3.52	4.36	0.255	0.08	0.64	0.49
Tongue	0.49	0.51	0.51	0.47	0.015	0.38	0.19	0.06
Head	2.71	2.79	2.51	2.61	0.038	<0.001	0.02	0.94
Feet	0.59	0.6	0.54	0.54	0.018	0.006	0.86	0.95
Testicles	0.16	0.16	0.15	0.13	0.008	0.04	0.24	0.14
Lungs	0.7	0.71	0.73	0.69	0.013	0.75	0.62	0.44
Liver	1.05	1.07	0.97	1.02	0.017	0.002	0.16	0.47
Heart	0.42	0.43	0.40	0.39	0.012	0.05	0.92	0.61
Kidneys	0.19	0.2	0.18	0.18	0.004	0.009	0.35	0.25
Skin	9.12	9.03	8.52	9.25	0.248	0.46	0.21	0.12
Whole digestive tract	5.09	5.26	4.53	4.79	0.141	0.002	0.16	0.74
Rumen-reticulum	1.80	1.89	1.50	1.71	0.039	<0.001	0.001	0.14
Omasum	1.02	0.91	0.47	0.71	0.034	0.001	0.29	0.56
Abomasum	0.33	0.36	0.3	0.34	0.008	0.13	0.11	0.82
Intestines	1.93	2.09	1.97	2.03	0.051	0.85	0.16	0.44

Urinary bladder	0.02	0.02	0.02	0.02	0.001	0.12	0.83	0.93
Total internal fat ¹	2.61	2.49	2.55	2.86	0.205	0.45	0.64	0.31
Internal organs	7.85	8.01	7.21	7.45	0.41	<0.001	0.09	0.93
Subcutaneous fat ²	0.0035	0.0033	0.0037	0.0055	0.00012	0.03	0.12	0.07
6 th rib tissue composition (%)								
Muscle	71.6	70.7	75.5	71.8	0.93	0.01	0.02	0.13
Fat	9.70	9.74	8.68	10.7	0.66	0.97	0.12	0.14
Bone	14.6	15.0	11.7	14.0	0.56	0.001	0.02	0.11
Others ³	3.99	4.34	3.9	3.32	0.251	0.03	0.66	0.07
Muscle to Fat ratio	7.38	7.26	8.69	6.71	0.62	0.4	0.07	0.08

[†] EU Beef Classification Scheme scale for carcass conformation, where 1 represents the poorest and 15 the best carcass.

^{††} EU Beef Carcass Classification Scheme scale for fat score, where 1 represents the leanest and 15 the fattest carcass

¹ Internal fat includes the mesenteric, peritoneal, perirenal and pericardial fat.

² Subcutaneous fat includes the carcass fat deposited between the skin and the muscle.

³ Nerves and cartilages.

^{a,b} Averages with different letters within the same row are significantly different ($P < 0.05$).

Table 8: Estimated carcass tissue composition and total body chemical composition and gains in extreme RFI young Charolais fed either a grass-silage or corn-silage diet

	Grass-based diet		Corn-based diet		SEM	<i>P</i> -values		
	Low RFI	High RFI	Low RFI	High RFI		Diet	RFI	Diet x RFI
Number of animals	8	8	8	8				
Carcass tissue composition								
Muscle								
kg	294	280	322	302	6.32	<0.001	0.003	0.61
%	70.3	70.2	71.8	70.3	0.43	0.11	0.05	0.08
Fat								
kg	61.6	58.2	63.3	66.4	3.54	0.07	0.94	0.22
%	14.6	14.5	14.1	15.3	0.47	0.62	0.16	0.09
Skeleton								
kg	63.3	61.1	62.9	61.8	1.10	0.62	0.16	0.10
%	15.1	15.3	14.1	14.4	0.24	0.87	0.12	0.61
Chemical whole-body composition								
Protein								
kg	119	115	125	122	2.0	0.005	0.07	0.72
%	19.7	19.7	19.7	19.5	0.11	0.55	0.23	0.16
Fat								
kg	87.6	82.2	89.8	96.8	5.19	0.09	0.80	0.19
%	14.2	13.9	14.4	15.7	0.58	0.24	0.46	0.17
Water								
kg	376	364	390	383	5.0	0.004	0.07	0.69
%	61.7	62.1	61.8	61.0	0.40	0.18	0.52	0.18
Mineral								
kg	26.1	25.2	27.0	26.6	0.33	0.004	0.07	0.71
%	4.28	4.31	4.28	4.23	0.321	0.25	0.70	0.25
Energy								
Mcal	1530	1469	1580	1624	54.2	0.03	0.81	0.23

Mcal/EBW	2.50	2.47	2.49	2.57	0.041	0.22	0.55	0.18
Estimated body gains ¹ (kg)								
Empty body weight	241	227	264	261	34.3	0.02	0.47	0.62
Total protein	48.3	45.7	53.4	50.1	7.61	0.04	0.26	0.95
Total fat	45.9	40.7	47.9	54.7	15.7	0.07	0.84	0.19
Estimated nitrogen balance (0-196 d)								
N intake (g/d)	187	196	193	209	4.75	0.05	0.01	0.43
N retained (g/d) ²	39.1	37.0	43.3	41.6	2.09	0.05	0.37	0.92
NUE (g/g)	0.208	0.189	0.224	0.200	0.0125	0.29	0.08	0.83

¹Gains were calculated as the difference between the end and the start of the experiment. Composition at the start was estimated from the diameter of subcutaneous adipose cells sampled by biopsy at the start of the experiment test and expressed as% of EBW (Garcia and Agabriel, 2008), whereas composition at the end was estimated from the 6th rib dissection (Robelin and Geay, 1975, 1978) and expressed as% of EBW.

²N retained was calculated as the estimated protein gain divided by the length from the start to the end of the experimental period (196d).

^{a,b}Averages with different letters within the same row are significantly different ($P < 0.05$).

Supplementary material

Protein metabolism, body composition and oxygen consumption in extreme residual feed intake young bulls fed two contrasted diets¹

Pablo Guarnido-Lopez¹, Isabelle Ortigues-Marty¹, Lorène Salis¹, Céline Chantelauze^{1,2}, Agathe Bes¹, Pierre Nozière¹, Gonzalo Cantalapiedra-Hijar^{1*}

¹*INRAE, VetAgro Sup, UMR Herbivores, Université Clermont Auvergne, F-63122 Saint-Genès-Champanelle, France*

²*Université Clermont Auvergne, INRAE, UNH, Plateforme d'Exploration du Métabolisme, Metabo-HUB, Clermont, F-63000 Clermont-Ferrand, France*

*Corresponding author: Gonzalo Cantalapiedra-Hijar. Email: gonzalo.cantalapiedra@nrae.fr

Table S1: Animal performance during a 84-d feed efficiency test in all Charolais young bulls fed grass-silage and corn-silage diets

	Grass- based diets	Corn- based diets	SEM	P-value
Number of animals	50	50		
<i>Animal performances</i>				
Initial body weight (kg)	410	418	1.0	0.39
Final body weight (kg)	509	551	1.1	<0.001
DMI (kg/d)	8.01	9.16	0.017	<0.001
ADG (kg/d) [‡]	1.15	1.59	0.005	<0.001
FCE (kg/kg)	0.144	0.174	0.0005	<0.001
<i>Adipocyte size*</i>				
Day 0 (µm)	66.4	66.9	0.16	0.78
Day 84 (µm)	83.2	91.2	0.20	<0.001
Gain (µm/d)	0.22	0.31	0.003	0.009
<i>Ultrasound fat depth[†]</i>				
Day 0 (cm)	0.24	0.25	0.000	0.12
Day 84 (cm)	0.33	0.37	0.000	0.001
Gain (µm/d)	10.7	14.3	0.06	0.02

* Adipocytes were sampled by subcutaneous biopsy conducted in the middle of a triangle formed by the last lumbar vertebrae, tail base and ischial tuberosity and measured with optic microscopy (Garcia and Agabriel, 2008).

[†] Ultrasound fat depth represents the average from four anatomical regions (back, rib, gluteus and lumbar region) measured by ultrasound echography.

[‡] Average daily gain has been calculated as the linear regression of body weight over time (1-84d).

Table S2: Pearson's correlation coefficients between the first (0-84d) and the second[†] (84-196d) feed efficiency test for animal performances of the extremes and all Charolais bulls

	Grass-based diets	Corn-based diets	Both diets
Whole population (n=100)			
DMI (kg/d)	0.78***	0.67***	0.79***
ADG (kg/d)	0.27*	-0.14 ^{NS}	0.01 ^{NS}
FCE (kg/kg)	0.30*	0.03 ^{NS}	0.001 ^{NS}
RFI (kg/d)	0.44***	0.57***	0.51***
Extremes RFI animals (n=32)			
DMI (kg/d)	0.82***	0.61**	0.75***
ADG (kg/d)	0.23 ^{NS}	-0.31 ^{NS}	-0.14 ^{NS}
FCE (kg/kg)	0.15 ^{NS}	-0.09 ^{NS}	-0.17 ^{NS}
RFI (kg/d)	0.50**	0.68***	0.59***

*** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$, t $P < 0.10$, NS = $P > 0.10$.

[†] The second RFI test was conducted on average during 112 days between the end of the first efficiency test (84d) and animal slaughter (196 ± 11.8 d)

Table S3: Pearson's correlations between animal performances measured during the feed efficiency test (d0-d84) and during the nitrogen balance on the digestibility stall.

Variables		Correlation
DMI _(d0-d84)	DMI _(NB)	$r= 0.77; P=0.001$
DMI _(NB)	Intake N _(NB)	$r= 0.91; P<0.001$
ADG _(d0-d84)	ADG _(NB)	$r= -0.22; P=NS$
ADG _(NB)	Retained N _(NB)	$r= 0.49; P=0.004$
FCE _(d0-d84)	FCE _(NB)	$r= -0.07; P=NS$
FCE _(NB)	NUE _(NB)	$r= 0.59; P<0.001$

Abbreviations: NB= Nitrogen balance, DMI= Dry matter intake, ADG= Average daily gain, FCE= Feed conversion efficiency, NUE= Nitrogen use efficiency and NS= non-significant.

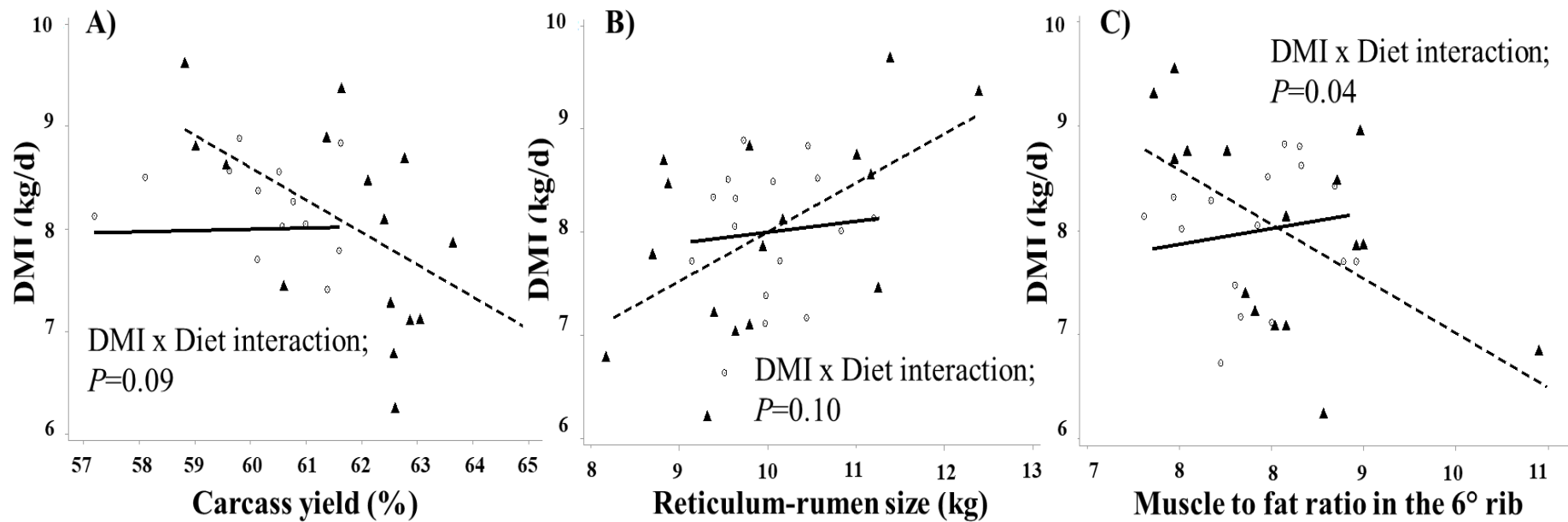


Figure S1: Relationships between DMI and carcass yield (Panel A), reticulum-rumen size (Panel B) and the Muscle to ratio fat in the 6th rib (Panel C) by diet. Variables have been corrected by the year effect (2018-2019/2019-2020). Dotted grey lines represent corn-based diets and thick black line grass-based diets. Symbols are individual raw values, where dotted grey line and triangles represented animals fed corn-based diets whereas the thick continuous line and black points represent animals fed grass-based diets.

Table S4: Pearson's correlations between animal performances, feed efficiency, protein metabolism and energy expenditure in animals fed grass-based diets.

Grass-based diets	FCE	RFI	DMI	ADG	NUE	Urea N/total N	Plasma proteins FSR	Whole-body protein FDR	Skeletal-muscle protein FDR	Oxygen consumption	Dressing percentage
RFI	-0.39 ^t										
DMI	0.28 ^{NS}	0.48*									
ADG	0.88***	-0.67 ^{NS}	0.70***								
NUE	0.30 ^{NS}	-0.27 ^{NS}	-0.41 ^t	0.06 ^{NS}							
Urea N/total N	0.04 ^{NS}	0.24 ^{NS}	0.38 ^t	0.23 ^{NS}	-0.02 ^{NS}						
Plasma proteins FSR	-0.29 ^{NS}	-0.14 ^{NS}	-0.46**	-0.44 ^t	-0.16 ^{NS}	-0.44 ^t					
Whole-body FDR	0.21 ^{NS}	-0.21 ^{NS}	-0.40 ^{NS}	0.03 ^{NS}	0.19 ^{NS}	-0.20 ^{NS}	0.45 ^t				
Skeletal-muscle FDR	0.07 ^{NS}	-0.21 ^{NS}	0.17 ^{NS}	0.18 ^{NS}	-0.18 ^{NS}	0.06 ^{NS}	-0.30 ^{NS}	-0.24 ^{NS}			
Oxygen consumption	0.46 ^{NS}	0.25 ^{NS}	0.44*	0.57**	0.06 ^{NS}	-0.02 ^{NS}	-0.02 ^{NS}	0.15 ^{NS}	0.11 ^{NS}		
Dressing percentage	-0.12 ^{NS}	-0.44 ^t	-0.08 ^{NS}	-0.11 ^{NS}	-0.22 ^{NS}	-0.14 ^{NS}	0.13 ^{NS}	-0.05 ^{NS}	-0.10 ^{NS}	-0.53**	
Carcass muscle (%)	-0.45 ^t	0.15 ^{NS}	-0.09 ^{NS}	-0.38 ^{NS}	-0.15 ^{NS}	-28 ^{NS}	0.07 ^{NS}	-0.18 ^{NS}	-0.39 ^{NS}	-0.33 ^{NS}	0.49**

*** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$, t $P < 0.10$, NS = $P > 0.10$.

Abbreviations: NB= Nitrogen balance, DMI= Dry matter intake, ADG= Average daily gain, FCE= Feed conversion efficiency, NUE= Nitrogen use efficiency, FSR= Fractional synthesis rate, FDR= Fractional degradation rate.

Table S5: Pearson's correlations between animal performances, feed efficiency, protein metabolism and energy expenditure in animals fed corn-based diets.

Corn-based diets	FCE	RFI	DMI	ADG	NUE	Urea N/total N	Plasma proteins FSR	Whole-body protein FDR	Skeletal-muscle protein FDR	Oxygen consumption	Dressing percentage
RFI	-0.48**										
DMI	-0.10 ^{NS}	0.58**									
ADG	0.73***	0.00 ^{NS}	0.58**								
NUE	0.58**	-0.37 ^{NS}	-0.65***	0.02 ^{NS}							
Urea N/total N	-0.29 ^{NS}	0.48**	0.80***	0.30 ^{NS}	-0.60**						
Plasma proteins FSR	-0.30 ^{NS}	0.54**	0.47**	0.06 ^{NS}	-0.38 ^{NS}	-0.32 ^{NS}					
Whole-body FDR	-0.42 ^t	0.24 ^{NS}	-0.18 ^{NS}	-0.41 ^{NS}	0.05 ^{NS}	-0.23 ^{NS}	0.06 ^{NS}				
Skeletal-muscle FDR	0.17 ^{NS}	0.38 ^{NS}	0.71***	0.33 ^{NS}	-0.40 ^t	0.69***	0.47*	0.06 ^{NS}			
Oxygen consumption	0.34 ^{NS}	0.14 ^{NS}	0.14 ^{NS}	0.40 ^t	0.45*	0.12 ^{NS}	0.21 ^{NS}	-0.18 ^{NS}	0.15 ^{NS}		
Dressing percentage	0.35 ^{NS}	-0.67***	-0.57***	-0.09 ^{NS}	0.27 ^{NS}	-0.09 ^{NS}	-0.65***	-0.02 ^{NS}	-0.55**	-0.38 ^t	
Carcass muscle (%)	0.43 ^t	-0.66***	-0.73***	-0.12 ^{NS}	0.59***	-0.19 ^{NS}	-0.58***	-0.11 ^{NS}	-0.56**	0.08 ^{NS}	0.76***

*** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$, t $P < 0.10$, NS = $P > 0.10$.

Abbreviations: NB= Nitrogen balance, DMI= Dry matter intake, ADG= Average daily gain, FCE= Feed conversion efficiency, NUE= Nitrogen use efficiency, FSR= Fractional synthesis

Complément : Une approche biomoléculaire pour étudier le métabolisme protéique (Annexe 1).

Dans ce dernier travail de thèse, l'objectif a été d'analyser le métabolisme protéique directement sur les tissus prélevés à l'abattoir (muscle et foie) des animaux extrêmes selon l'IR classés dans le deuxième travail de thèse (n=32) et en essayant de contrôler au mieux l'influence de l'ingéré sur les voies moléculaires analysées. Dans ce travail, j'ai voulu aborder le turnover protéique depuis une autre approche biomoléculaire afin de mieux interpréter les mesures faites *in vivo* à l'échelle de l'animal entier. Etant données l'influence et l'association de la quantité ingérée tant sur l'IR comme sur le turnover protéique, dans cette partie je me suis intéressé à étudier le turnover protéique en limitant au mieux l'influence de l'ingéré.

Pour cette approche biomoléculaire, j'ai choisi deux tissus. Tout d'abord le muscle squelettique, comme responsable d'une grande proportion des demandes corporelles en AAs (Bergen, 2021), et qu'impacte en conséquence, la partition entre le catabolisme et l'anabolisme hépatiques (Reynolds, 2006). Puis le foie en raison de son rôle fondamental dans cette partition des AAs et notamment la transamination, fortement associée au catabolisme d'AAs. Pour étudier l'effet strict de l'EA (IR) sur le métabolisme protéique, indépendamment des effets induits par des différences de quantités ingérées, 3 h avant l'abattage les animaux ont tous reçu la même quantité (2,5kg) de leur concentré respectif (régimes maïs et herbe). Tous les animaux se trouvaient ainsi dans le même état postprandial. Les analyses biomoléculaires sur les tissus musculaire et hépatique ont été faites post mortem avec la technique du Western blot. En plus, j'ai aussi analysé sur le tissu hépatique les activités enzymatiques des transaminases (ASAT et ALAT). Le métabolisme protéique a été analysé à travers ses principales voies de synthèse et de dégradation protéiques. Pour la synthèse nous avons analysé la voie classique de l'Akt, qui continue avec mTor et finalise avec la S6K. Pour la dégradation protéique nous avons analysé les principales voies intracellulaires, la première la via de l'ubiquitine au niveau du protéasome et la deuxième la voie de l'autophagie.

Les résultats de ce travail montrent que les animaux inefficients selon l'IR présentent une dégradation protéique intra-cellulaire et une activité enzymatique des transaminases plus importante que chez les animaux efficaces quel que soit le concentré distribué pré-abattage (herbe vs maïs). En outre, les animaux efficaces ont montré un potentiel de synthèse protéique, exprimé par le ratio de la protéine p-S6K : S6K, plus important que celui des inefficients et uniquement expliqué par l'effet long terme de l'ingéré (différent entre extrêmes IR dans la phase *in vivo*) sur l'abondance de la protéine totale (S6K). Grâce aux résultats obtenus par cette approche biomoléculaire, il peut être conclu que si les quantités ingérées *in vivo* avaient été similaires entre animaux, les individus efficaces selon l'IR et alimentés avec un régime maïs auraient eu un taux de synthèse protéique similaire mais un taux de dégradation protéique plus bas que ceux des individus inefficients. Finalement, les résultats de ce dernier travail permettent de supposer que l'absence de différences *in vivo* de turnover protéique entre les extrêmes IR alimentés avec un régime riche en fibre serait la conséquence d'un profil de nutriments absorbés et d'un taux ou une vitesse d'absorption qui ne déclenchent pas de réponses insuliniques contrastées entre extrêmes. Ce travail complémentaire a été rendu possible grâce un financement UMRH 'Herbicides', suite à une demande de financement que j'ai rédigée et soumise. L'ensemble des analyses de laboratoire et des analyses statistiques ont été réalisées. Toutefois, par manque de temps, il n'a pas été possible de finaliser l'interprétation détaillée des données. Un rapport préliminaire est donc inclus en annexe mais les principaux résultats et conclusions seront utilisés dans la discussion générale.

Discussion générale

L'augmentation de la population mondiale, et par conséquent de la demande globale en produits animaux, nous incite à améliorer l'efficacité alimentaire (EA) chez les animaux de rente (Makkar et Beaver, 2012). Cette amélioration est particulièrement importante pour le bovin viande qui a une faible capacité de conversion des aliments en produits, plus faible que celle d'autres espèces animales (Mottet et al., 2017). L'amélioration de l'EA chez le ruminant doit tenir compte de sa capacité unique et extraordinaire à digérer et utiliser des ressources riches en cellulose, alors que les régimes riches en fourrages sont plébiscités pour réduire la concurrence entre les ressources alimentaires pour les animaux et les humains (Johnson et al., 2003). L'ingéré résiduel (IR) est l'un des critères de sélection génétique pour l'EA qui est utilisé chez le bovin à l'engrais ; il a l'avantage d'une héritabilité modérée et d'une absence de corrélation avec les performances de croissance des animaux (Arthur et Herd, 2012 ; Berry et Crowley, 2013). Cependant, des effets indésirables peuvent apparaître lorsque l'EA est le seul critère génétique sélectionné (Rauw, 2012). Parmi les effets indésirables potentiellement co-sélectionnés avec l'IR, on note une interaction négative avec le statut immunitaire des animaux ou leurs performances reproductives (Wang et al., 2012 ; Zerjal et al., 2021). Un autre problème majeur, particulièrement important chez le bovin allaitant, est l'interaction entre le classement des animaux en termes d'EA et le type de régime utilisé (Coyle et al., 2016 ; Asher et al., 2018 ; Lahart et al., 2020), suggérant qu'un animal efficace avec un régime ne l'est pas forcément avec un autre. Comprendre les mécanismes biologiques à l'origine des différences de l'IR est une étape primordiale pour contribuer à prévenir les effets indésirables éventuels d'une sélection génétique axée sur ce critère (Cantalapiedra-Hijar et al., 2018). En outre, comprendre les mécanismes biologiques associés à l'IR peut contribuer à élaborer et formuler des rations adaptées à l'efficacité individuelle des animaux, ce qui peut impacter l'EA globale du système bovin viande (Tullo et al., 2019 ; Lovarelli et al., 2020). Parmi les mécanismes biologiques d'intérêt, le métabolisme protéique, et plus concrètement le turnover protéique, a été identifié comme un déterminant majeur des variations individuelles de l'EA chez le bovin viande (Herd et al., 2004 ; Herd et Arthur, 2009a ; Cantalapiedra-Hijar et al., 2018). Ce processus pourrait aussi contribuer à expliquer les effets indésirables associés à une sélection génétique sur l'EA (Rauw et al., 1998 ; Lines et al., 2014).

Mon projet de thèse a comme objectif d'étudier la relation entre la variabilité individuelle de l'EA, caractérisée par le critère IR, et le métabolisme protéique chez le bovin viande en évaluant la contribution de l'effet régime à cette relation. La relation entre l'IR et le métabolisme protéique est analysée avec deux régimes contrastés et à plusieurs échelles : i) tout d'abord, une échelle macro (animal entier) avec l'évaluation du métabolisme protéique au travers de l'efficacité d'utilisation de l'azote (EUA). En effet, comme discuté ci-après je considère que, s'il existe un lien entre l'IR et le métabolisme protéique, il devrait être observé sur l'EUA. D'autres variables biologiquement pertinentes pour le lien entre l'IR et l'EUA ont aussi été étudiées au niveau corps entier, ii) puis une échelle intermédiaire entre l'animal entier et les tissus, pour étudier les mécanismes en lien avec le métabolisme protéique qui pourraient être associés à l'IR. Parmi ces mécanismes j'ai priorisé l'étude du turnover protéique comme mécanisme majeur pouvant expliquer les variations d'EA étant donné son influence sur la dépense énergétique et les besoins azotés des tissus et iii) enfin, une échelle moléculaire, dans laquelle j'étudie les voies de signalisation impliquées dans le lien potentiel entre le turnover protéique et l'IR.

Pour répondre à cet objectif, je me suis appuyé sur deux dispositifs expérimentaux complémentaires. D'abord un dispositif expérimental avec un très large effectif ($n = 588$ taurillons ; la moitié alimentée avec un régime à base de d'ensilage d'herbe et l'autre moitié à base d'ensilage de maïs ; Tableau 1 de la publication #1) qui s'appuie sur 4 fermes expérimentales réparties sur le territoire français. Ce dispositif nous a permis d'évaluer la relation entre l'IR et l'EUA à une grande échelle et à travers l'utilisation de biomarqueurs proposés dans la littérature pour évaluer l'EUA. L'article #1 de ma thèse fait référence à ce dispositif, nommé ci-après comme « **dispositif à grande échelle** ». Bien que ce

dispositif ait été analysé pour valider des biomarqueurs de l'EA chez le bovin à l'engrais, je l'ai mobilisé pour évaluer le lien spécifique entre l'EUA et l'IR. L'utilisation d'un grand dispositif animal m'a permis de mettre en évidence l'existence d'une relation entre ces deux variables, l'imprécision associée aux biomarqueurs (discutée dans l'article #1) étant largement compensée par le nombre d'observations disponibles. Un deuxième dispositif expérimental de taille plus réduite, mais plus analytique en termes de mesures, a été mis en place à INRAE de Theix. La moitié des animaux utilisés était par ailleurs incluse dans le dispositif à grande échelle. Parmi un total de 100 animaux phénotypés, j'ai identifié puis sélectionné les 32 animaux les plus extrêmes selon leur IR et alimentés avec les mêmes deux régimes contrastés que dans le dispositif à grande échelle. Les animaux extrêmes ont été soumis à une batterie de mesures et d'analyses permettant à la fois de confirmer le lien entre l'IR et l'EUA et d'explorer des mécanismes du métabolisme protéique à l'origine des différences d'IR. L'article #2 ainsi que le travail présenté en annexe font référence à ce dispositif, nommé ci-après comme « **dispositif analytique** ». Sur ce dispositif analytique le turnover protéique a été évalué selon différentes méthodes combinant des approches classiques de référence (excrétion urinaire de 3-méthyl-histidine), des méthodes indirectes développées dans l'équipe Dinamic de l'UMRH (turnover isotopique pour une évaluation à long-terme) et enfin des méthodes moléculaires et enzymatiques sur les tissus prélevés à l'abattoir (western blot et activités des transaminases).

En préalable, je souhaite clarifier un concept que j'utilise dans cette discussion. J'ai choisi d'établir des corrélations entre variables afin d'établir les associations entre variables (ici quantitatives) et ainsi leur degré de dépendance (Armatte, 2001). Cependant, une corrélation ne veut en aucun cas dire causalité, la causalité étant associée à l'effet d'un facteur connu, ou contrôlé artificiellement (ex : le niveau de protéine ou un traitement hormonal) sur une variable de réponse (Follon, 1990). Dans cette thèse, les facteurs contrôlés sont la nature du régime et le degré d'efficacité associé aux deux groupes d'animaux extrêmes pour l'IR. J'ai toutefois conscience que le classement d'IR n'est pas un facteur expérimental du même ordre que l'effet régime en raison du choix opéré sur les animaux après la mesure de leur IR. Ainsi, j'admets que, malgré les relations et associations observées et malgré nos plans expérimentaux (tant le dispositif à grande échelle que le dispositif analytique), il n'est pas possible de conclure à un lien de cause à effet entre le classement IR des animaux et les variables mesurées.

Relation entre l'ingéré résiduel et l'efficacité d'utilisation de l'azote chez le bovin viande

L'EA est un caractère mathématiquement et biologiquement corrélé à l'EUA. L'EUA reflète le rapport entre la quantité d'azote retenu et la quantité d'azote ingéré. Concernant le critère IR, les animaux sélectionnés comme efficaces ont un gain de poids fortement associé à l'azote retenu (car chez le bovin viande la majeure partie du gain est constituée de muscle squelettique, Castro Bulle et al., 2007) et similaire à celui des inefficaces. Par contre, ils ont une MSI inférieure, ce qui se traduit logiquement par une ingestion d'azote inférieure (Koch et al., 1962 ; Archer et al., 1999 ; Arthur et al., 2004) en supposant un même tri alimentaire entre les deux groupes extrêmes (Dykier et al., 2020). En conséquence, le rapport entre l'azote retenu et l'azote ingéré (EUA) devrait être supérieur chez les efficaces, selon l'IR. Chez la vache laitière, la relation négative entre l'IR et l'EUA a été démontrée récemment (Xie et al., 2019 ; Liu et VandeHaar, 2020) lorsque le calcul d'EUA ne prend en compte que l'azote sécrété dans le lait et non l'azote retenu. A l'opposé, cette relation n'a jamais été significative chez le bovin viande lorsque la rétention d'azote a été calculée à partir de mesures de bilan d'azote (Tableau 8), technique considérée pourtant comme une méthode de référence pour évaluer la rétention protéique chez l'animal en croissance (Hristov et al., 2019). Cependant, dans cette thèse les animaux efficaces selon l'IR ont aussi une EUA supérieure, comme suggéré par les différentes données que nous avons obtenues (résumées dans le Tableau 9 ci-après) et les travaux publiés à partir de mesures de bilans d'azote (+8,39 % par rapport aux inefficaces ; $P=0,02$ d'après une petite méta-analyse issue du Tableau 8).

Tableau 8 : Synthèse des travaux publiés et de nos résultats sur l'EUA [calculé d'après le ratio azote retenu (g/j) /azote ingéré (g/j)] du bovin viande déterminé par bilan d'azote en stalle de digestibilité

Travaux	Type d'animal	Jours de mesure	EUA des extrêmes selon l'IR (g/g)		Différence entre extrêmes selon l'IR	
			Efficaces	Inefficaces	CV (%)	P-value ^a
Lines et al. (2014)	Angus	5 Jours	0,202	0,191	5,45%	P= NS
Assis Lage et al. (2019)	Gyr (pré-ruminant)	5 Jours	0,621	0,568	8,53%	P= NS
Carmona et al. (2020) (régime bas en protéine)	Brahman	7 jours	0,263	0,238	9,51%	P= NS
Carmona et al. (2020) (régime haut en protéine)	Brahman	7 jours	0,163	0,139	14,72%	P= NS
Da Costa Gomez. (2013)	Nellore	3 jours	0,382	0,331	13,35%	P= NS
Dispositif analytique de cette thèse (régime herbe)	Charolais	10 jours	0,251	0,256	-1,99%	P= NS
Dispositif analytique de cette thèse (régime maïs)	Charolais	10 jours	0,289	0,265	8,30%	P= NS
Moyenne			0,310	0,284	8,39%	P=0,02

^a L'analyse statistique incluait l'effet de l'IR comme effet fixe et l'effet de l'étude comme effet aléatoire.

Dans cette thèse, l'EUA a été évaluée par plusieurs approches complémentaires basées sur l'utilisation de biomarqueurs, des méthodes indirectes et des méthodes de références. Les deux biomarqueurs utilisés avaient été proposés comme indicateurs d'EUA à l'échelle individuelle, d'une part la concentration plasmatique d'urée, biomarqueur classique de l'excrétion d'azote et indirect de l'EUA (Jonker et al., 1998 ; Kohn et al., 2005 ; Krogh et al., 2019), et d'autre part l'abondance naturelle de l'azote 15 ($\delta^{15}\text{N}$) dans le plasma, nouveau biomarqueur de l'EUA (Cantalapiedra-Hijar et al., 2018). Les deux biomarqueurs reflètent la balance protéique du rumen, c'est-à-dire l'équilibre entre la production et l'assimilation d'ammoniac par les bactéries du rumen (Wattiaux et Reed, 1995 ; Cantalapiedra-Hijar et al., 2015a ; INRA, 2018) et le catabolisme hépatique des AAs (Lobley et al., 1995 ; Cantalapiedra-Hijar et al., 2015b). Une balance protéique du rumen positive (INRA, 2018) est associée à une faible EUA (Bach et al., 2005) au niveau digestif. Un catabolisme élevé des AAs augmentera la partition de l'azote ingéré vers l'excrétion urinaire au détriment de la rétention (anabolisme), conduisant à une faible EUA (Hanigan et al., 1998 ; Lapierre et al., 2005). Les valeurs les plus élevées de concentration d'urée ou de $\delta^{15}\text{N}$ plasmatique traduisent une utilisation de l'azote au niveau ruminal et métabolique moins efficace, et donc une EUA plus faible (da Silva et al., 2016 ; Cantalapiedra-Hijar et al., 2018 ; Angelidis et al., 2019).

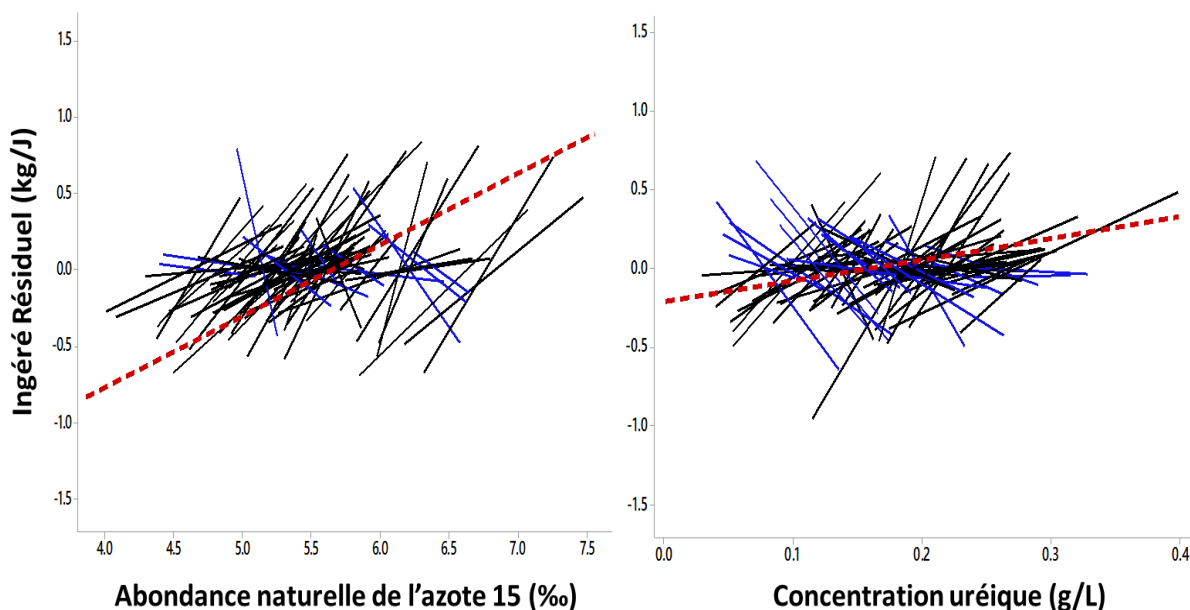


Figure 20 : Relations entre l'IR et l'EUA déterminée d'après l'abondance naturelle de l'azote 15 (panneau de gauche) et la concentration d'urée dans le plasma (panneau de droite) dans le dispositif à grande échelle. Chaque ligne noire représente un groupe contemporain (ferme/période/régime/lot). La ligne en pointillé représente la relation générale pour tous les groupes contemporains. Les lignes bleues représentent les relations des groupes contemporains qui vont dans le sens contraire à la relation générale (lignes bleues avec l'azote 15 = 10/71, et avec l'urée = 31/71).

Dans notre dispositif à grande échelle (Figure 20), nous avons obtenu des relations (corrélations) significatives et positives entre l'IR et les processus d'inefficacité d'utilisation de l'azote évalués par les biomarqueurs (avec l'urée : $r=0,09$; $P=0,03$ et avec le $\delta^{15}\text{N}$: $r=0,28$; $P<0,001$). Bien que les deux biomarqueurs reflètent des processus similaires d'EUA et soient corrélés entre eux ($r=0,21$; $P<0,001$), le $\delta^{15}\text{N}$ a été significativement corrélé dans plus de cas avec l'IR (nombre de lignes noires > bleues de la Figure 1) et il a présenté un meilleur ajustement (en termes de R^2 , AIC et RSR) que l'urée, ce qui

nous a aussi permis de valider le $\delta^{15}\text{N}$ comme biomarqueur de l'IR chez le bovin viande quel que soit le régime (Tableau 6 de la publication #1).

Sachant que la relation entre l'IR et le métabolisme protéique commence avec des différences d'EUA, je montre les résultats d'EUA déterminée selon différentes approches. Pour cet exercice j'ai pris les animaux extrêmes sur l'IR du dispositif à grande échelle (en ne considérant que les 10% les plus et les moins efficaces, n=116 parmi 588) et les animaux extrêmes du dispositif analytique (n=32 parmi 100) et j'ai estimé la variation d'EUA entre animaux extrêmes intra-régime (Tableau 9). Les résultats montrent une différence d'EUA significative entre extrêmes selon l'IR (+16,8% ; $P=0,003$) avec le biomarqueur $\delta^{15}\text{N}$. Les résultats de l'urée montrent que même si l'urémie peut être globalement associée à l'EUA (corrélation), ce biomarqueur ne permet pas discriminer l'EUA au niveau individuel comme déjà démontré dans d'autres études chez le ruminant (Hof et al., 1997 ; Huhtanen et al., 2015 ; Dechow et al., 2017 ; Krogh et al., 2019). Lorsque j'ai réévalué la relation entre l'IR et l'EUA dans le dispositif analytique sur les 32 extrêmes, les résultats statistiques de variation d'EUA ont été moins significatifs qu'avec les extrêmes du dispositif à grande échelle (percentile 90 vs percentile 10), peut-être en raison du plus petit nombre d'animaux testés (n=32 vs n=117) et de leur plus faible écart d'IR. L'IR des animaux extrêmes a varié de 1,57 kg MSI/j dans le dispositif à grand échelle mais seulement de 1,01 kg MSI/j dans le dispositif analytique.

Tableau 9 : Résumé des différentes approches d'étude de l'EUA dans cette thèse

Dispositif	Méthode	Régime herbe	Régime maïs	P-value	
		Ecart entre efficaces et inefficaces (%)	Ecart entre efficaces et inefficaces (%)	Effet de l'IR	Interaction IR x régime
Grande échelle	$\delta^{15}\text{N}$	+15,4	+18,6	0,003	0,53
Grande échelle	Concentration d'urée	+15,6	+3,5	0,46	0,45
Analytique	Bilan d'azote	-2,0	+8,4	0,65	0,49
Analytique	Estimation à partir des données de l'abattoir	+9,2	+10,8	0,08	0,83
Analytique	Proportion N uréique vs N urinaire total	+2,4	+11,2	0,03	0,14
Analytique	$\delta^{15}\text{N}^*$	+3,5	+7,5	0,60	0,08
Analytique	Concentration d'urée	+5,4	+6,9	0,82	0,47

* Dans le dispositif analytique, la valeur asymptotique de la courbe de déplétion de l'azote 15 modélisée suite à l'arrêt de l'administration de l'urée marquée (Tableau 5 de la publication #2) représente l'abondance naturelle de l'azote 15 dans le plasma et peut être interprétée de la même façon que le $\delta^{15}\text{N}$ du dispositif de grande échelle.

Cependant, les résultats (significativement différents ou pas) ont toujours été cohérents avec mes hypothèses d'une meilleure EUA chez les animaux efficaces selon l'IR. En réalité, la variation moyenne d'EUA des extrêmes du dispositif analytique est significativement différente (8,31% CV, $P = 0,04$) lorsque je prends en compte les moyennes des deux régimes obtenues avec toutes les méthodes utilisées (n=7). Lorsque je m'attache à chaque méthode prise individuellement, seules l'estimation d'EUA à partir des données de l'abattoir (10,1% CV ; $P=0,08$) et la proportion d'azote uréique dans l'azote urinaire (7,6% CV ; $P=0,03$) montrent des tendances ou des différences significatives d'EUA. Je considère la proportion d'azote uréique dans l'azote urinaire comme un proxy de l'EUA (au niveau animal entier) parce qu'il reflète la partition d'azote ingéré en azote urinaire (Huntington et Archibeque, 1999 ; Spek et al., 2013).

La première grande conclusion de cette thèse est qu'il existe une relation entre l'IR et l'EUA indiquant que les animaux efficaces selon l'IR ont une EUA plus importante quel que soit le régime utilisé. Dans les paragraphes suivants, je m'intéresse aux variables analysées et disponibles dans le dispositif à grande échelle qui pourraient expliquer biologiquement la relation significative entre l'IR et l'EUA.

Matière sèche ingérée. Comme attendu par la construction du modèle permettant le calcul de l'IR, une corrélation forte et positive existe entre l'IR et la MSI ($r=0,57$, $P<0,001$; dispositif à grande échelle). Étant donné la corrélation positive attendue entre MSI et N ingéré au niveau individuel (Stallcup et al., 1975) et négative entre l'azote ingéré et l'EUA (Angelidis et al., 2019), il peut être attendu que les animaux efficaces quant à l'IR montrent une EUA (N ingéré/N retenu) plus importante. Ainsi, la MSI des animaux du dispositif à grande échelle, plus faible pour les animaux plus efficaces, a montré des corrélations positives avec la concentration d'urée ($r=0,12$; $P=0,005$) et avec le $\delta^{15}\text{N}$ ($r=0,22$; $P<0,001$), ce qui pourrait démontrer un rôle de l'ingéré dans la relation entre l'IR et l'EUA, comme suggéré en relation inter-régime par Foskolos et Moorby (2018), Angelidis et al. (2019) et les systèmes d'alimentation des ruminants (NRC, 2016 ; INRA, 2018). D'un point de vue biologique, une augmentation de la MSI est positivement associée à deux phénomènes qui vont impacter négativement l'EUA : les pertes fécales d'azote endogène (INRA, 2018) et le catabolisme hépatique des AAs (Lobley et al., 1992). Les pertes fécales d'azote endogène représentent un résidu des sécrétions du système digestif et des desquamations des tissus digestifs (Swanson, 1977) et varient avec la MSI et les caractéristiques du régime (Verité et Peyraud, 1989). Une MSI plus élevée entraînera davantage de desquamations de l'épithélium digestif et plus de sécrétions digestives (Tamminga, 1992), augmentant ainsi les pertes fécales de protéiques endogènes. Dans le cas des animaux du dispositif à grande échelle, j'ai calculé que ces pertes protéiques représenteraient en moyenne 13% de l'azote ingéré (INRA, 2018), avec un écart théorique de 6,7% ($P<0,001$) entre les groupes d'animaux les plus (percentile 10) et les moins (percentile 90) efficaces selon l'IR. En ce qui concerne la production hépatique d'urée (uréogénèse), résultant de la quantité d'ammoniac produite au niveau ruminal et de la quantité des AAs absorbés excédentaires (Bach et al., 2005 ; Bergen et al., 2021), elle augmente avec la MSI (Reynolds et al., 1988). Ce phénomène se traduit par une quantité plus importante d'azote ingéré (ou digéré) qui est transformé en azote urinaire, comme démontré précédemment avec des porcs classés selon leur IR (Barea et al., 2010). De plus, une MSI plus faible a été associée à une digestibilité de la ration plus élevée (INRA, 2018), comme démontré avec des animaux efficaces selon l'IR (+4% de digestibilité dans tout le tractus digestif ; Bonilha et al., 2017). Donc, il peut être attendu qu'une meilleure digestibilité, notamment de l'azote, contribue à augmenter l'EUA quel que soit le régime.

Composition corporelle. La composition corporelle doit aussi être considérée lorsqu'on analyse la relation entre l'IR et l'EUA. Une corrélation négative, phénotypique et génétique, a été démontrée entre l'IR et la composition corporelle de telle sorte que les animaux les plus efficaces ont un rendement de carcasse supérieur à celui des animaux les moins efficaces (Renand et Krauss, 2002 ; Taussat et al., 2019). Le rendement de carcasse reflète la partition du PV de l'animal entre sa carcasse et le compartiment non-carcasse constitué essentiellement par les organes internes, les contenus digestifs, la tête et les pieds. Dans une synthèse récente, Kenny et al. (2018) ont observé que les bovins viande efficaces selon l'IR ont un rendement de carcasse plus important que les inefficaces, avec une carcasse plus lourde et des organes plus petits (spécialement ceux du tractus digestif). Dans ma thèse j'ai pu confirmer cette relation car les animaux les plus efficaces ont eu un rendement de carcasse supérieur (+3,1% ; $P=0,003$), expliqué par une quantité du muscle dans la carcasse plus importante (+5,8% ; $P=0,003$) et un compartiment non-carcasse plus petit, notamment pour la tête et le rumen (-3,5% et -8,5%, respectivement ; $P<0,02$). Quelques travaux chez le bovin et le poisson (Fluharty et al., 1999 ; Azevedo et al., 2004) ont mis en relation la composition corporelle et l'EUA mais dans des comparai-

sons entre régimes ou traitements mais pas au niveau individuel. Je considère qu'une proportion plus importante d'azote déposé dans la carcasse au détriment de la non-carcasse (notamment des organes) peut contribuer à expliquer les différences d'EUA observées entre mes animaux extrêmes en IR. En effet, les organes, spécialement les TDVP, prélèvent une quantité élevée d'AAs plasmatiques pour leur propre utilisation (Hanigan et al., 2004). En cohérence, dans le dispositif à grande échelle une corrélation positive a été observée entre le rendement de carcasse et l'EUA quel que soit le biomarqueur utilisé ($\delta^{15}\text{N}$: $r= 0,28$; $P<0,001$ et urée : $r=0,11$; $P=0,02$; relation non publiée). Autant dans des travaux précédents que dans notre dispositif expérimental utilisant des animaux extrêmes, plus d'azote ingéré a été orienté vers le dépôt dans la carcasse chez les animaux efficaces selon l'IR (Basarab et al., 2003 ; Asher et al., 2018). Après la soumission de l'article #2 j'ai voulu calculer, à partir des données d'abattage et des équations de prédiction, la quantité de protéine déposée par unité de PV dans la carcasse et dans le compartiment non-carcasse. Pour cela, j'ai estimé la quantité totale de protéines du compartiment non-carcasse d'après la différence entre la protéine totale dans le corps entier et la protéine déposée dans la carcasse et j'ai supposé un pourcentage de protéine dans le muscle de 18,8% chez le taurillon Charolais (Renand et al., 2001). Les résultats de ces estimations montrent une plus forte proportion de protéines déposées dans la carcasse chez les animaux efficaces comparé aux moins efficaces (81,2% vs 77,8% ; $P=0,05$) et une tendance à présenter moins de protéine dans la non-carcasse (11% vs 12% ; $P=0,09$). Ces résultats sont compatibles avec une meilleure EUA chez les animaux efficaces, et suggèrent une plus forte proportion d'AAs utilisés vers l'anabolisme dans les tissus périphériques, et notamment dans le muscle squelettique chez le bovin viande.

Association entre ingéré et composition corporelle. En réalité, les deux variables précédemment analysées, l'ingéré et la composition corporelle, sont fortement associées entre elles. Dans notre dispositif à grande échelle, l'ingéré était négativement corrélé au rendement de carcasse ($r= -0,41$; $P<0,001$). Cette relation négative semble être surtout expliquée par une relation positive entre l'ingéré et la taille des organes (compartiment non-carcasse), notamment le rumen. Cette relation a été démontrée chez des animaux monogastriques (Ferrell et Koong, 1986) et chez les ruminants (Taylor et Murray, 1991 ; Allen, 1996 ; Fitzsimons et al., 2014). En fait, il a été suggéré que les animaux inefficaces selon l'IR ont un rendement de carcasse plus faible en raison de l'effet positif du niveau d'ingestion sur la taille du rumen (Walsh et al., 2008 ; Campion et al., 2009). Dans notre étude le niveau d'ingestion (kg MSI/kg PV) des animaux extrêmes était positivement corrélé à la taille de leur rumen quel que soit le régime ($r= 0,44$; $P=0,01$). De plus l'ingéré et la taille du rumen sont négativement corrélés au rendement de carcasse ($r= -0,51$ et $r= -0,55$, respectivement ; $P<0,003$). En combinant les résultats obtenus dans ma thèse à partir du biomarqueur $\delta^{15}\text{N}$, de la MSI observée et de la composition corporelle prédite, nous concluons à une partition de l'azote ingéré en faveur de l'azote retenu (EUA) chez les animaux efficaces selon l'IR.

Autres. L'association entre l'EUA et l'IR a été démontrée à partir d'un ensemble de résultats obtenus dans les deux dispositifs complémentaires de ma thèse. Bien que des phénomènes digestifs puissent contribuer à cette relation, comme l'efficacité de synthèse protéique des bactéries du rumen (Bach et al., 2005), je fais l'hypothèse du rôle prépondérant du métabolisme protéique sur la relation entre l'IR et l'EUA, comme suggéré précédemment (Cantalapiedra-Hijar et al., 2018b). En effet, les mécanismes métaboliques sont d'après plusieurs auteurs des déterminants majeurs des différences individuelles de l'EA mesurée d'après l'IR (Cantalapiedra-Hijar et al., 2018 ; Duarte et al., 2019 ; Novais et al., 2019 ; Zhang et al., 2019 ; Banerjee et al., 2020). De plus, d'autres résultats obtenus dans le cadre du programme BEEFALIM 2020, dans lequel le dispositif expérimental de ma thèse s'insère, suggèrent un métabolisme des AAs différent entre les animaux extrêmes quant à leur IR et un rôle du turnover protéique (Cantalapiedra-Hijar et al., 2018 ; Jorge-Smeding et al., 2022).

En résumé, les animaux efficients selon l'IR ont montré une EUA supérieure à celle des animaux inefficients. Bien que mon dispositif expérimental ne permette pas d'établir des relations de cause à effet, cette relation pourrait en partie être expliquée par des variables qui sont fortement corrélées comme la MSI et la composition corporelle. Dans le même temps, ces variables explicatives sont connues pour leur lien biologique avec le métabolisme protéique, le turnover protéique et le catabolisme hépatique des AAs, raison pour laquelle ces mécanismes ont été étudiés finement dans le dispositif analytique de ma thèse, ou indirectement estimés par l'approche biomoléculaire.

Contribution de l'effet régime à la relation entre l'efficacité alimentaire et l'efficacité d'utilisation de l'azote

Certains éléments issus des deux dispositifs expérimentaux suggèrent que même si la relation IR-EUA est négative quel que soit le régime, elle pourrait être plus forte avec des régimes riches en amidon (régime à base de maïs) qu'avec des régimes plus celluloseux (régime à base d'herbe).

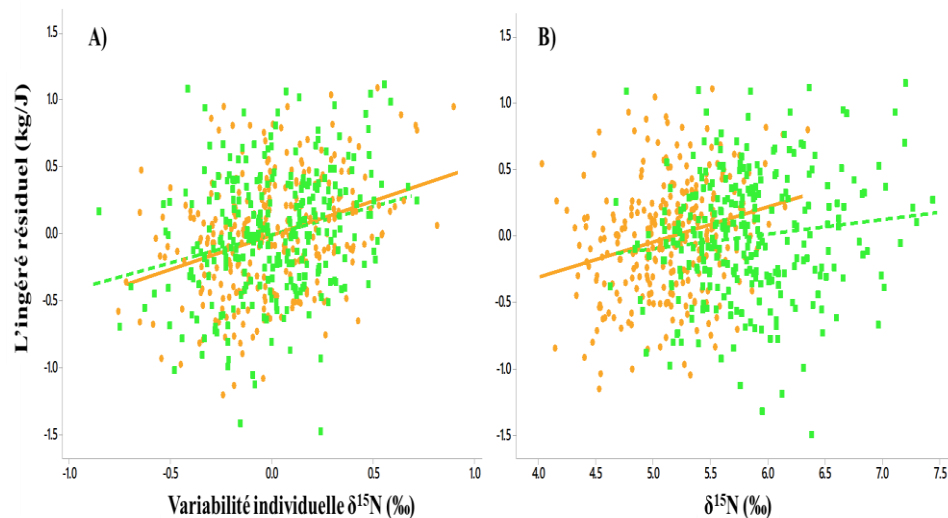


Figure 21 : Relation entre l'IR et l'EUA mesurée avec le biomarqueur $\delta^{15}\text{N}$ par régime lorsque cette relation a été établie avec des données qui représentent la variabilité individuelle du $\delta^{15}\text{N}$ (différence entre la valeur du $\delta^{15}\text{N}$ d'un individu et sa moyenne de son groupe contemporain). Les points et lignes vertes se rapportent au régime herbe tandis que les jaunes au régime maïs.

Dans la publication #1, les résultats statistiques ne permettent pas conclure à une relation entre l'IR et l'EUA différente entre régimes ($P > 0,63$). Si je ne considère que les animaux extrêmes de ce grand dispositif (percentile 90 vs percentile 10) il n'y a pas non plus d'interaction entre l'effet régime et l'IR sur l'EUA ($P > 0,45$) quel que soit le biomarqueur (Tableau 8). Je considère donc que l'influence du régime sur la relation entre l'IR et l'EUA est mineure. Cependant, la relation entre l'IR mesurée et l'EUA, évaluée d'après le biomarqueur $\delta^{15}\text{N}$, varie numériquement selon les régimes (+18,1% avec le régime maïs ; $P = 0,47$ dans la Figure 21). De plus, en regardant l'autre index d'EA étudié dans la publication #1, le RGI, phénotypiquement et génétiquement associé à l'IR (Berry et Crowley, 2013 ; Taussat et al., 2019), il peut être observé que la pente est numériquement mais aussi significativement plus importante avec le régime maïs qu'avec le régime herbe (+25% ; $P < 0,05$).

En conséquence, dans le dispositif analytique j'ai évalué la relation entre l'IR et l'EUA de manière directe et certains résultats, bien que non significatifs, suggèrent une relation entre l'IR et l'EUA légèrement différente entre les régimes herbe et maïs (Figure 22). Je considère que cette interaction, suggérée mais non démontrée, du régime avec l'EUA par rapport à l'IR pourrait être expliquée par les différences de caractéristiques des régimes.

Effizienz d'utilisation de l'azote (EUA)

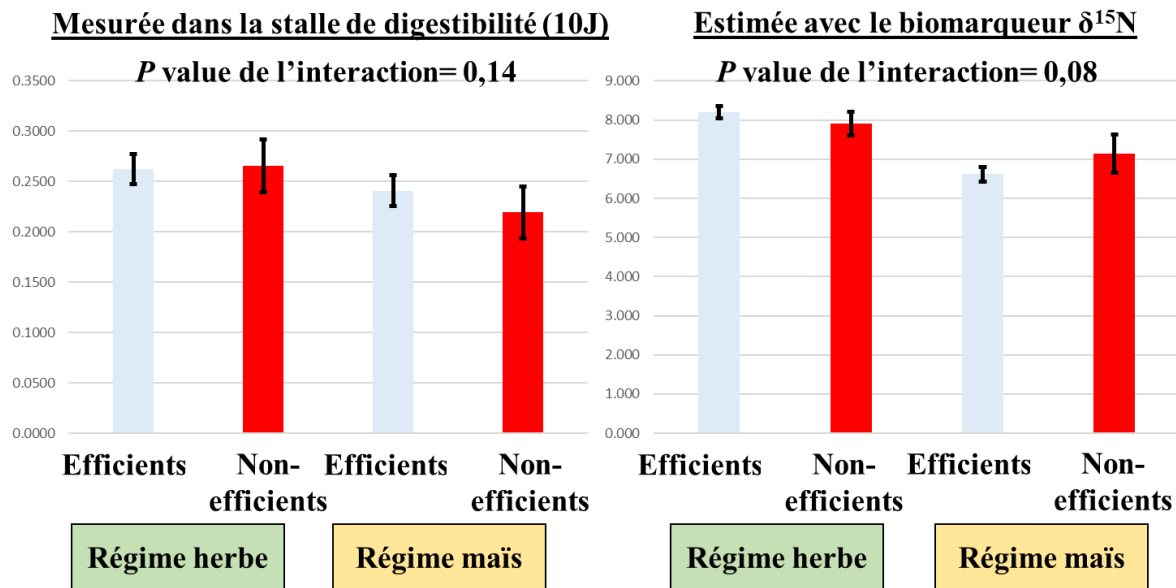


Figure 22 : Effizienz d'utilisation de l'azote mesurée dans le dispositif analytique à partir du bilan d'azote (méthode de référence en stalle de digestibilité, graphique de gauche) ou estimée d'après l'abondance naturelle de l'azote 15 obtenue à partir de l'asymptote de la courbe de déplétion de l'azote 15 (méthode indirecte, graphique de droite).

Pour étudier l'effet éventuel du régime, je me suis d'abord intéressé à l'influence des caractéristiques du régime sur l'ingéré et la composition corporelle. Dans le dispositif à grande échelle, la relation entre la MSI et l'EUA ($\delta^{15}\text{N}$) est significativement dépendante du régime, la réponse étant plus importante avec le régime maïs (+44% ; $P=0,09$). De façon similaire, la relation entre le rendement de carcasse et l'EUA est numériquement différente entre régimes (relation plus importante avec le régime maïs, +46%, $P=0,63$). Et enfin la relation entre la MSI et la composition de la carcasse (discutée dans la section précédente) est plus importante avec le régime maïs (+29% ; $P=0,06$). Si l'on considère les caractéristiques chimiques des régimes, il peut être observé que les deux régimes ont été formulés à même teneur de matières azotées totales (14%) mais à concentration et nature d'énergie différentes. Dans la publication #2, j'ai expliqué que la principale caractéristique chimique qui variait entre régimes était l'énergie nette, en quantités (0,93 UFV vs 0,86 UFV), densité (1,06 UFV/UEB vs 0,91 UFV/UEB) et surtout nature (rapport amidon/NDF : 0,99 vs 0,11). Le régime maïs présente une densité énergétique considérablement plus élevée que le régime herbe (+16%), en raison de teneurs plus faibles en fibres (-28%) mais plus élevées en amidon (+84%). La concentration de fibres a été largement considérée comme la principale caractéristique du régime qui peut diminuer l'ingéré des animaux (Allen, 1996, 2004). Il est donc possible que les animaux nourris à base d'herbe aient été restreints en ingéré par rapport aux animaux maïs. Cette hypothèse peut être analysée à partir du dispositif analytique : les animaux extrêmes herbe ont présenté deux fois moins de variation d'ingéré que les animaux maïs (6% CV vs 12% CV ; $P=0,29$), ce qui est cohérent avec des études précédentes dans lesquelles les animaux extrêmes selon l'IR et restreints (alimentés sous-ad libitum) ont présenté une faible variabilité d'ingéré (Herd et al., 2011 ; Boddicker et al., 2011). La relation entre l'IR et l'EUA est plus faible si un facteur du régime comme la densité énergétique diminue la variabilité d'ingéré entre extrêmes selon l'IR. %

L'hypothèse d'une limitation de l'ingéré des animaux extrêmes du dispositif analytique est cohérente avec les variations de taille de rumen : taille de rumen plus grande (+16,6% ; $P < 0,001$), mais variabilité de taille beaucoup plus faible (4,8% CV vs 12,3% CV ; $P = 0,14$) pour les animaux extrêmes herbe comparés aux extrêmes maïs. Ces résultats convergent vers une restriction physique de l'ingéré des animaux extrêmes herbe en raison de la plus forte fibrosité du régime, comme suggéré précédemment par les études d'Allen (1996, 2004).

En résumé, les résultats obtenus ne confirment pas l'hypothèse initiale selon laquelle la relation entre l'IR et l'EUA différerait selon les régimes. Les résultats suggèrent que la contribution du régime à la relation entre l'IR et l'EUA est cohérente avec les résultats des deux dispositifs, en montrant que l'interaction avec l'effet régime n'est pas significative ($P > 0,05$; Tableau 8) avec aucun des méthodes utilisées pour mesurer l'EUA. Malgré tout, une convergence de tendances suggère que cette relation entre l'IR et l'EUA pourrait être légèrement plus importante avec le régime maïs et expliquer en partie l'interaction significative observée pour le turnover protéique (discuté dans la section suivante). De plus, les principales différences de caractéristiques de régime que sont la teneur et la nature de l'énergie, pourraient expliquer les différences d'ingéré et de composition corporelle (taille des organes), notées entre régimes, tous deux étroitement associés à l'EUA, l'EA et au métabolisme protéique.

Le turnover protéique est-il associé au classement IR des animaux ?

La vitesse à laquelle les protéines corporelles d'un animal se renouvellent, le turnover protéique, a été suggéré comme étant un déterminant majeur des différences individuelles de l'EA chez le bovin en croissance-engraissement (Richardson et al., 2004 ; Herd et Arthur, 2009b ; Cantalapiedra-Hijar et al., 2018). Le turnover protéique a été aussi associé à l'EUA dans des études de comparaison entre régimes alimentaires (Zhang et al., 2016) ou traitements hormonaux (Buttery et al., 1978 ; Eisemann et al., 1986), relation qui, à ma connaissance, n'a pourtant pas été explorée à l'échelle individuelle. Par conséquent, je me suis intéressé au métabolisme et turnover protéiques comme déterminant possible des variations individuelles d'EA, notamment sur l'IR, chez le bovin viande. Le terme « déterminant » fait référence à un mécanisme à l'origine d'un phénotype, c'est-à-dire un phénomène biologique qui contribue à l'expression d'un caractère observable/mesurable d'un animal et qui est en partie sa cause. Or, aucune des études de la littérature ayant travaillé avec l'IR n'a contrôlé le turnover protéique pour pouvoir conclure à son rôle déterminant dans l'expression du phénotype IR. Dans ma thèse je suis également confronté à cette problématique, et par conséquent les liens entre l'IR et le turnover protéique sont discutés sans que l'on puisse malheureusement dépasser les limites imposées par les simples associations entre variables. Néanmoins quelques hypothèses d'interprétation sont émises.

Dans mon projet de thèse, je me suis appuyé sur deux approches complémentaires pour mesurer le turnover protéique et évaluer sa relation avec l'EA, une approche au niveau de l'animal entier et ses compartiments et une autre approche au niveau moléculaire. Comme discuté dans la synthèse bibliographique réalisée par Cantalapiedra-Hijar et al. (2018) sur les déterminants biologiques à l'origine des variations individuelles de l'EA, il est extrêmement compliqué de discerner le vrai rôle d'un mécanisme dans les variations d'EA lorsqu'il co-varie avec le niveau d'ingestion. Ainsi, concernant le turnover protéique il est régulé par la quantité (McNurlan et Garlick, 1989 ; Waterlow, 2006) et la nature (Boisclair et al., 1994 ; Lobley, 1998) des nutriments absorbés, de telle sorte qu'un niveau d'ingestion supérieur, qui entraîne une absorption de nutriments plus importante, augmente le turnover protéique (Reeds et al., 1981 ; Reeds et Fuller, 1983 ; Harris, 1992). Néanmoins, cette relation peut être revue à l'inverse et l'on peut également analyser l'impact qu'un changement de turnover protéique pourrait avoir sur les besoins énergétiques et le niveau d'ingestion qui en résultent. Par exemple, les études utilisant des implants avec des stéroïdes anabolisants (trenbolone ou hormone de la croissance), censés augmenter la synthèse et le turnover protéique (Foster et al., 1991 ; Kerth et al., 2003) ont la plupart constaté une augmentation de l'ingéré des animaux traités par rapport à ceux du lot témoin (Vernon et Buttery, 1978 ; Sinnott-Smith et al., 1983 ; Hunter et Vercoe, 1987 ; Johnson et al., 1996), l'augmentation de l'ingéré étant toutefois plus limitée que l'augmentation du gain de poids. Par conséquent, il ne sera pas possible, à partir de mon dispositif analytique, de discerner si un TP diminué est la cause d'une meilleure EA ou si, à l'inverse, l'ingestion moins élevée des animaux efficients entraîne un TP plus faible. Pour dépasser cette difficulté, deux approches sont discutées ici pour essayer de dissocier l'effet des « quantités ingérées » de l'effet phénotype IR.

La première stratégie a été proposée par Cantalapiedra-Hijar et al. (2018), il s'agit de regarder le lien entre les mécanismes étudiés et l'EA lorsque cette dernière est ajustée à mêmes quantités ingérées. Lorsque les performances des animaux sont ajustées à même PV et MSI, l'EA n'est plus exprimée par IR mais par le gain résiduel (GR), un autre critère d'évaluation de l'EA proposé pour la sélection génétique (Berry et Crowley, 2013b ; Taussat et al., 2019). Bien que le GR soit corrélé à l'IR ($r = -0,42$; $P = 0,02$, dans cette thèse) il présente l'avantage d'être dé-corrélé des quantités ingérées (Freetly et al., 2020) et donc de mieux traduire les phénomènes de régulation métabolique propres à l'individu. La

corrélation calculée ici entre le turnover protéique et le GR ($r= 0,39$; $P=0,04$ Tableau 10) semble renforcer l'hypothèse selon laquelle le turnover protéique est associé à l'EA indépendamment des quantités ingérées, mais en lien avec l'efficacité métabolique de l'individu (ex : accréation protéique accrue comme conséquence d'une plus faible dégradation protéique ; Lobley, 2003).

La deuxième stratégie que j'ai explorée, a consisté à évaluer les voies de signalisation de la synthèse et de la dégradation protéiques dans deux tissus clés du métabolisme protéique, le muscle et le foie, et lorsque les animaux étaient alimentés la veille de leur abattage avec les mêmes quantités d'aliment concentré quel que soit leur phénotype ou classement IR. J'ai pu ainsi évaluer chez les animaux extrêmes l'activation de certaines protéines impliquées dans la synthèse et la dégradation protéiques dans un état postprandial caractérisé par un ingéré identique entre les groupes IR (c'est-à-dire 2,5 kg de leur concentré respectif, ingéré en totalité 3h avant l'abattage avec une période de jeûne préalable de 12h-14h). Les résultats de l'approche moléculaire des voies de signalisation de la synthèse et dégradation protéique dans le muscle squelettique *longissimus dorsi* réalisée dans des conditions d'alimentation restreinte et identique entre groupes IR (cf travail complémentaire en Annexe 1) m'ont permis de tirer certaines conclusions sur les mécanismes à l'origine des variations de turnover protéique observées in vivo avec une alimentation à volonté. Ainsi, la dégradation protéique est diminuée in vivo chez les animaux efficaces alimentés avec le régime maïs par des phénomènes qui ne sont pas uniquement reliés à l'ingéré mais aussi au métabolisme propre de l'individu. En revanche, la synthèse protéique in vivo semble être légèrement diminuée chez les animaux efficaces alimentés avec le régime maïs probablement au travers de l'effet de l'ingéré et de l'absorption postprandiale des nutriments. Je fais donc l'hypothèse que chez les animaux maïs, s'ils étaient placés à même niveau d'ingestion, les efficaces auraient une dégradation protéique toujours plus basse mais une synthèse protéique similaire à celles des inefficaces. Comme discuté ci-après, chez les animaux alimentés avec le régime herbe, les caractéristiques du régime en termes d'encombrement, taux de passage et d'absorption et type de nutriments absorbés ne permettent pas d'induire des différences de turnover protéique chez les extrêmes.

Tableau 10 : Turnover protéique évalué avec deux approches différentes chez des jeunes bovins en engraissement (dispositif analytique) qui diffèrent sur leur EA mesurée avec deux critères (IR et GR)

Approche animal entier sur le taux fractionnel de dégradation protéique du muscle squelettique estimé avec la 3MH						
Variables	Deux régimes	Régime herbe		Régime maïs		
MSI ^u (g/j)	0,44**	0,17 ^{NS}		0,71***		
GMQ ^u (kg/j)	-0,12 ^{NS}	0,19 ^{NS}		0,27 ^{NS}		
Ingéré résiduel (kg/j) [†]	0,35**	0,07 ^{NS}		0,58***		
Gain résiduel (kg/j) [†]	-0,39***	-0,42 [†]		-0,36 [†]		
Approche moléculaire sur le muscle squelettique						
Variables	Potentiel de synthèse protéique (pS6K:S6K)			Potentiel de dégradation protéique (Ub)		
	Deux régimes	Régime herbe	Régime maïs	Deux régimes	Régime herbe	Régime maïs
Ingéré résiduel (kg/j) ^u	-0,61***	-0,55**	-0,30 [†]	0,42***	0,58**	0,30 [†]
Gain résiduel (kg/j) ^u	0,30*	0,27 ^{NS}	0,34 [†]	-0,24 [†]	-0,29 ^{NS}	-0,17 ^{NS}

*** $P<0.001$, ** $P<0.01$, * $P<0.05$, [†] $P<0.10$, NS = $P>0.10$.

Abréviations : 3MH : 3-méthyl-histidine, MSI : Matière sèche ingérée, GMQ : gain moyen quotidien, Ub : voie de l'ubiquitine.

[†]Toutes les performances sont mesurées pendant la même période de mesure que le métabolisme protéique (112 j) entre le premier test de l'IR (jour 84) et l'abattoir (jour 196).

La discussion qui suit se centre sur le lien entre l'IR et la synthèse et la dégradation protéiques évaluées avec les deux approches mentionnées précédemment. Comme discuté dans la publication #2, nos résultats, en accord avec les données de la littérature scientifique, suggèrent un rôle prépondérant de la dégradation protéique par rapport à la synthèse, sur les variations individuelles de l'EA. Ci-après j'analyse le lien entre l'IR et d'une part la synthèse protéique et d'autre part la dégradation protéique.

La synthèse protéique. Les résultats obtenus avec l'approche biomoléculaire permettent de conclure que le (faible) lien entre IR et la synthèse protéique observé in vivo est probablement tiré par les variations d'ingestion. En conditions d'alimentation à volonté, la synthèse protéique aurait un impact mineur sur les changements de masse musculaire observés entre les extrêmes IR (environ 2% d'écart dans le taux fractionnel de synthèse protéique estimé entre les animaux extrêmes alimentés avec le régime maïs, publication #2). Dans des conditions d'alimentation restreinte et identique, le potentiel de synthèse protéique apparemment plus élevé chez les animaux efficaces sur l'IR (plus d'activation des voies de synthèse protéique à mêmes quantités protéines totales ; panneau C Figure 23) ne serait la seule conséquence des quantités ingérées plus faibles observées au cours de l'engraissement. Il est à noter que malgré l'effort mis en place dans l'approche moléculaire pour évaluer le turnover protéique en dissociant les effets de l'IR et du niveau d'ingestion, l'influence de l'ingéré sur les expressions des protéines impliquées dans les voies de la synthèse et dégradation protéique n'est pas complètement effacée. En effet, les différences d'ingestion entre les groupes IR extrêmes a sans doute un effet long terme sur l'expression des protéines analysées qui perdure au-delà d'une alimentation identique le jour de l'abattage. D'après plusieurs études chez l'humain, la souris et le poisson (Borgenvik et al., 2012), cet effet long terme de l'ingéré ne serait observable que sur la quantité totale de protéines exprimées (dans ma thèse Akt et S6K totales) et aurait un impact mineur ou nul sur leur état d'activation (dans ma thèse p-Akt et p-S6K), ce dernier dépendant plutôt des changements métaboliques à court terme tels que ceux déclenchés par l'absorption postprandiale de nutriments (Hunter, 2000 ; Iliuk et al., 2016). Lansard et al. (2009) ont étudié les mêmes voies de signalisation de la synthèse protéique que dans cette thèse (Akt et S6K ; voir Figure 12 dans la synthèse bibliographique pour plus de détails sur les voies impliquées) chez le poisson dans une étude comparant l'état à jeun vs réalimentation. Ils ont trouvé que la protéine totale était surtout influencée par les quantités ingérées mesurées pendant les 5 jours pré-abattage tandis que la protéine phosphorylée, et donc active, était seulement impactée par l'état d'absorption postprandial résultant de l'ingestion 2 h avant abattage. Donc, l'expression de la protéine totale, qui représente la quantité de protéine dans le pool protéique analysé, semble être impactée par des phénomènes d'ingestion à long terme alors que la protéine phosphorylée, qui représente la protéine activée, serait plutôt influencée par des phénomènes à court terme tels que ceux déclenchés par l'absorption postprandiale des nutriments. Souvent dans la littérature scientifique, le potentiel de synthèse protéique est évalué au regard du rapport entre la protéine phosphorylée et la protéine totale (Welle et al., 2009 ; Thomson, 2018). Cependant, étant données les particularités de l'approche mise en place, j'ai choisi de discuter séparément les résultats de la protéine totale, de la protéine phosphorylée et du rapport des deux (Figure 23). Cette discussion sera centrée notamment sur la protéine S6K, la plus proche de la synthèse protéique ribosomale (Ruvinsky et Meyuhas, 2006 ; Tavares et al., 2015).

A partir uniquement des résultats obtenus pour le rapport p-S6K/S6K totale, il pourrait être conclu que les animaux efficaces ont un potentiel de synthèse protéique supérieur à celui des animaux inefficaces selon l'IR. Cependant, les interprétations des résultats concernant la protéine totale et phosphorylée nuancent ce message et tendent vers un concept des variations de synthèse protéique tirées principalement par l'ingéré.

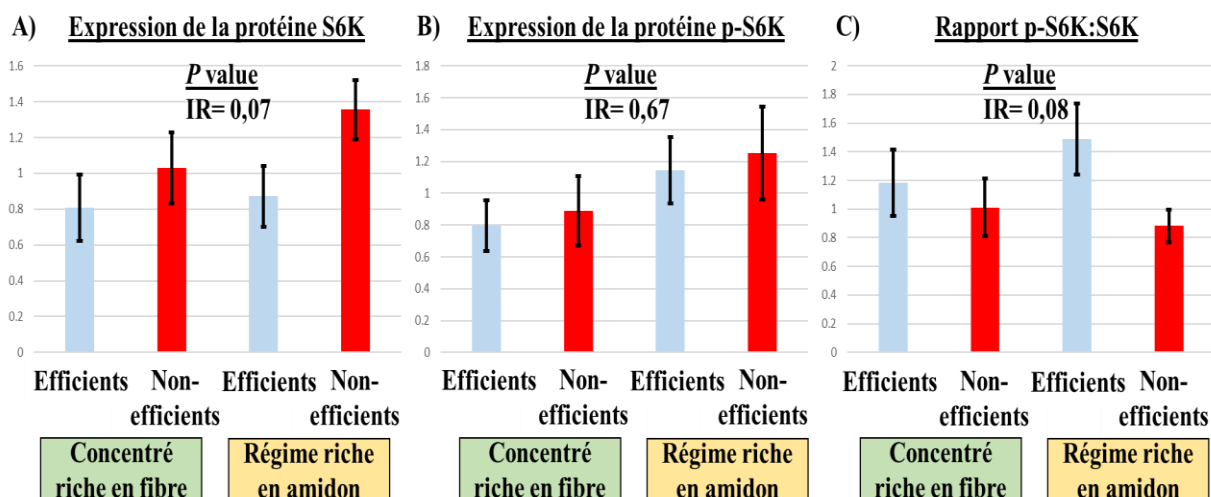


Figure 23 : Synthèse protéique intra-cellulaire (voie de signalisation de la protéine S6K) mesurée par western-blot sur les animaux extrêmes selon l'IR et alimentés à base d'un concentré fibreux ou d'un concentré riche en amidon. Il est affiché l'expression de la protéine S6K totale (panneau A), de la protéine phosphorylée p-S6K (panneau B) et du rapport entre les deux protéines (panneau C).

Les animaux inefficients selon l'IR ont une quantité plus importante de protéine S6K totale, cohérente avec une quantité aussi plus importante de protéine totale Akt (+25% ; $P=0,10$). Ces résultats doivent être interprétés comme l'effet long terme de l'ingéré sur les voies de la synthèse protéique et non pas comme un phénomène répondant aux quantités ingérées immédiatement avant l'abattage (Gingras et al., 2007). Une quantité totale des protéines S6K et Akt plus élevée chez les animaux inefficients serait donc le résultat à long terme d'une ingestion de nutriments plus importante chez ces animaux (Article #2). Inversement la protéine phosphorylée, qui reflète des régulations à court terme liées à l'absorption postprandiale (a priori identique entre groupes) était similaire entre groupes et entre régimes.

Par conséquent, je considère que le résultat significatif observé pour le rapport p-S6K/S6K totale est la conséquence des différences historiques d'ingéré entre les animaux extrêmes non contrôlés malgré une alimentation pré-abattage identique entre groupes. Mes résultats sont en accord avec ceux obtenus récemment par Elolimy et al. (2019) chez le bovin viande, où les protéines totales de la voie de la synthèse protéique (Akt et S6K) étaient plus abondantes chez les animaux inefficients avec pourtant une quantité similaire de protéines phosphorylées associée au fait d'avoir abattu les animaux à jeun. Cela a favorisé un rapport p-S6K : S6K plus élevé chez les animaux efficients. Je considère donc que la synthèse protéique évaluée au niveau biomoléculaire est plus efficiente chez les animaux efficients selon l'IR car, à même quantité de nutriments absorbés, l'activation des voies de la synthèse protéique en termes du rapport p-S6K : S6K est plus importante, ce qui serait expliqué par l'ingéré historique plus faible des animaux efficients. De façon similaire, une étude d'expression de gènes a identifié certaines voies de la synthèse protéique (ex : protéine ribosomale et mitochondriale) plus activées chez les animaux efficients selon l'IR ce qui peut traduire une efficacité de la synthèse protéique plus importante (Chen et al., 2011). Lorsque ces résultats biomoléculaires sont extrapolés à une situation d'alimentation à volonté, il peut être attendu que les animaux efficients ayant un ingéré plus faible présentent un taux de synthèse protéique (rapport pS6K : S6K totale) légèrement plus faible ou similaire à celui des inefficients, comme démontré dans l'approche au niveau de l'animal entier. En conclusion, si les animaux extrêmes sur IR avaient consommé in vivo les mêmes quantités de MSI de chaque régime, on pourrait attendre, d'après les résultats de l'approche biomoléculaire, un même taux de synthèse protéique.

La dégradation protéique. Les résultats obtenus avec les deux approches mises en place pour évaluer la dégradation protéique convergent pour considérer une dégradation protéique dans le muscle squelettique (*longissimus dorsi*) plus faible chez les animaux efficients sur leur IR (Tableau 10). Cependant, alors que l'approche biomoléculaire montre un effet similaire quel que soit le régime alimentaire, l'approche au niveau de l'animal entier, montre que la dégradation protéique n'est différente entre extrêmes IR qu'avec le régime riche en amidon (publication #2 Tableau 5). Cette apparente contradiction entre les deux approches semble provenir du mode d'alimentation utilisé dans les deux approches (à volonté vs concentré limité).

Un apport de concentré équivalent avant l'abattage avait été réfléchi pour promouvoir un pic d'absorption de nutriments permettant de déclencher l'activation des voies de signalisation de la synthèse et dégradation protéiques de façon plus importante que dans un état de jeûne (Duchêne et al., 2008 ; Ryan et al., 2008 ; Lansard et al., 2009). Ces voies de signalisation ont été analysées autour du pic d'absorption postprandiale (3h ; Jenny et Polan, 1975 ; Evans et al., 1975a), moment auquel les animaux ont été abattus. De plus, l'alimentation pré-abattage était constituée uniquement de concentré (Tableau 1 de l'annexe 1), sans ensilage, normalement distribué à hauteur de 40% de la ration totale. Dans ces conditions, j'attends une absorption de nutriments, au pic d'absorption postprandial, beaucoup plus importante et rapide qu'avec le régime entier où l'encombrement créée par le fourrage aurait diminué le taux de transit et la digestibilité de la ration (Waldo, 1973, 1986) et par conséquent la vitesse d'absorption de nutriments.

J'ai essayé de répondre à la question « le turnover protéique est-il associé à l'IR ? » en tenant compte de l'impact du régime sur cette relation avec deux approches complémentaires. Les résultats de l'analyse biomoléculaire peuvent être interprétés comme une évaluation des phénomènes de régulation métabolique propres à l'individu (en limitant l'interférence de l'ingéré), tandis que l'analyse au niveau de l'animal entier pourrait refléter aussi ce qui se passe dans les animaux lorsqu'ils consomment à volonté. On peut donc attendre que les différences de turnover protéique entre individus extrêmes selon l'IR soient expliquées en partie par les différences de quantités ingérées, comme décrit précédemment, mais mes résultats issus de l'approche biomoléculaire (travail complémentaire en annexe 1) suggèrent en plus une influence du métabolisme de l'animal (peut être dicté par la génétique) indépendamment de l'ingéré.

En résumé, les résultats de la dégradation protéique observés entre extrêmes maïs dans la publication #2 pourraient confirmer l'hypothèse formulée dans ma thèse ainsi que dans des études précédentes en utilisant des méthodologies très différentes [Cantalapiedra-Hijar et al. (2018) : synthèse des travaux analytiques sur différentes espèces animales ; Elolimy et al. (2019) : étude appliquant la même approche biomoléculaire que moi ; Duarte et al. (2019) : méta-analyse des études d'association pangénomique] relative à une dégradation protéique négativement associée à l'EA quel que soit le critère utilisé chez le bovin viande. Néanmoins cette hypothèse ne semble pas être confirmée chez les animaux alimentés avec un régime riche en fibre. Dans la prochaine section j'explique l'interaction entre le classement IR et le type de régime sur le turnover protéique.

Quels mécanismes pourraient expliquer une relation régime-dépendante entre le turnover protéique et l'IR chez le bovin à viande ?

D'après la synthèse bibliographique que j'ai réalisée, la relation entre le turnover protéique et l'EA chez le ruminant a généralement été étudiée et confirmée chez des animaux recevant des régimes de production riches en amidon (McCarthy et al., 1983 ; Boisclair et al., 1994 ; Oddy et al., 1995 ; da Costa Gomes et al., 2013 ; Zorzi et al., 2013). Si les régimes riches en amidon sont très utilisés dans les études du turnover protéique c'est qu'ils sont les plus fréquents pour les vaches laitières et les agneaux/bovins en engraissement.

Je considère la nature et la quantité des nutriments absorbés comme étant les principaux facteurs pouvant expliquer la relation régime-dépendante entre l'IR et le turnover protéique. La nature des nutriments absorbés peut expliquer certainement cette interaction étant donné le rôle direct des substrats glucogéniques et de la réponse insulémique qui en résulte, tant sur la synthèse (Bolster et al., 2004) que sur la dégradation protéiques (Suryawan et Davis, 2014). Indirectement, j'attends aussi que les différences de turnover protéique contribuent aux variations de composition corporelle, toutes deux associées dans différentes études (Kelly et al., 2010 ; Asher et al., 2018). Dans la publication #2, j'ai indiqué que la principale caractéristique qui varie entre les régimes maïs et herbe est l'énergie en termes de teneur (0,93 UFV/kg MS vs 0,86 UFV/kg MS), densité énergétique (1,06 UFV/UEB vs 0,91 UFV/UEB) et surtout de nature (rapport amidon/NDF : 0,99 vs 0,11). Ces différences entre régimes auront une influence sur la digestibilité des rations (+2% dans le régime maïs, Tableau 1, publication #2) et puis sur la quantité et la nature des nutriments absorbés (INRA, 2018). Concernant les nutriments absorbés, j'ai estimé à partir de la composition chimique des ingrédients mesurée et des équations de prédiction développées par mon équipe (Loncke et al., 2020) que l'absorption en veine porte des substrats glucogéniques était plus importante avec le régime maïs qu'avec le régime herbe [glucose = 316 vs 48.5 g/j par animal, rapport acétate : propionate = 3,28 vs 3,81 (-14%)]. Cet apport différentiel explique à son tour l'insulinémie plus importante chez les animaux nourris avec le régime maïs vs herbe dans notre étude (Tableau 4 dans la publication #2 ; +58,9% ; $P=0,001$) et dans des études précédentes (Tufan et al., 2016 ; Nichols et al., 2019). Étant données les différences d'ingéré entre extrêmes selon l'IR (11% d'écart sur le niveau d'ingestion ; MSI/PV), il peut être attendu que les animaux inefficients auront une absorption de substrats glucogéniques et d'AAs plus importante que les efficaces. De plus, la différence d'absorption en substrats glucogéniques entre extrêmes est attendue d'être proportionnellement plus importante avec le régime maïs vs herbe car la proportion des substrats glucogéniques avec le régime herbe est très faible par rapport au régime maïs.

Dans ce sens, une étude basée sur une analyse par métabolomique réalisée sur les animaux les plus extrêmes ($n = 48$) issus du dispositif à grande échelle a conclu que l'ingestion mesurée d'amidon, l'absorption estimée de glucose et la concentration plasmatique en AAs ramifiés et en insuline étaient toujours plus élevées chez les animaux inefficients vs efficaces sur l'IR mais uniquement lorsqu'ils étaient alimentés avec le régime à base de maïs [+14%, +15% et +21% respectivement; $P \leq 0,01$ (Jorge-Smeding et al., 2021)]. Étant donnée l'influence de l'absorption des nutriments glucogéniques et des AAs sur la réponse insulémique (Lobley et al., 1998), ces résultats expliqueraient pourquoi la concentration plasmatique d'insuline était plus importante chez les inefficients seulement avec le régime maïs. Les résultats de ma thèse montrent également que les animaux inefficients selon l'IR présentent une insulinémie plus forte que les animaux efficaces (+25% ; $P=0,08$) mais uniquement avec le régime maïs, sans différences entre les extrêmes herbe.

Je peux donc conclure à partir des données générées dans ma thèse et dans une étude complémentaire (Jorge-Smeding et al., 2021) réalisée à partir du même dispositif animal que les différences entre régimes de nutriments absorbés, et la réponse insulémique qui en résulte, peuvent expliquer l'interaction observée entre le type de régime et l'IR sur le turnover protéique. En effet, l'insuline et les AAs ramifiés ont été identifiés comme signaux d'activation de la synthèse protéique à travers la voie de mTOR (Laplante et Sabatini, 2009). Par conséquent, sachant que la synthèse et la dégradation protéiques sont des processus dépendants de l'ingéré (Waterlow, 2006), il peut être attendu qu'avec des régimes donnant lieu à une absorption plus importante de nutriments glucogéniques, l'activation de la voie mTOR par l'insuline et les acides aminés ramifiés soit plus élevée chez les extrêmes alimentés avec un régime à base maïs vs herbe.

Enfin, à partir des données générées par l'approche biomoléculaire (alimentation restreinte et identique), je fais l'hypothèse que la nature des régimes (maïs vs herbe) pourrait aussi jouer sur la vitesse ou le taux d'absorption des nutriments (en plus de leur nature) et contribuer en partie à l'interaction entre l'IR et le régime alimentaire sur le turnover protéique. En effet, des données de la littérature chez l'humain suggèrent que le profil et la vitesse d'absorption de nutriments (notamment l'amplitude du pic d'absorption postprandiale) est un des signaux essentiels pour déclencher les voies associées à la synthèse et dégradation protéique (Chow et al., 2006).

En résumé, l'interaction observée entre le régime et le classement IR des animaux sur le turnover protéique pourrait être expliquée par une plus grande différence d'absorption de nutriments glucogéniques et de régulations insulémiques associées, entre les extrêmes du régime maïs comparé à ceux du régime herbe. L'hypothèse d'une vitesse d'absorption différentielle (en plus de la nature des nutriments) entre les régimes est aussi émise pour expliquer cette interaction.

Influence du turnover protéique sur l'EA chez le bovin viande

Dans cette dernière partie de la discussion j'aimerais mettre le turnover protéique au centre de la relation entre l'EA et le métabolisme protéique (Figure 24), en expliquant mes hypothèses relatives à son influence sur d'une part la composition corporelle et l'EUA (Flèche 2 bleue de la Figure 24), et d'autre part la dépense énergétique, la MSI et l'IR (Flèches 1 bleue et 5 noire de la Figure 24). Cependant, pour faciliter la compréhension, je me limiterai à discuter en priorité les résultats observés uniquement avec le régime mais pour lequel le turnover protéique a été plus faible chez les animaux efficaces selon l'IR.

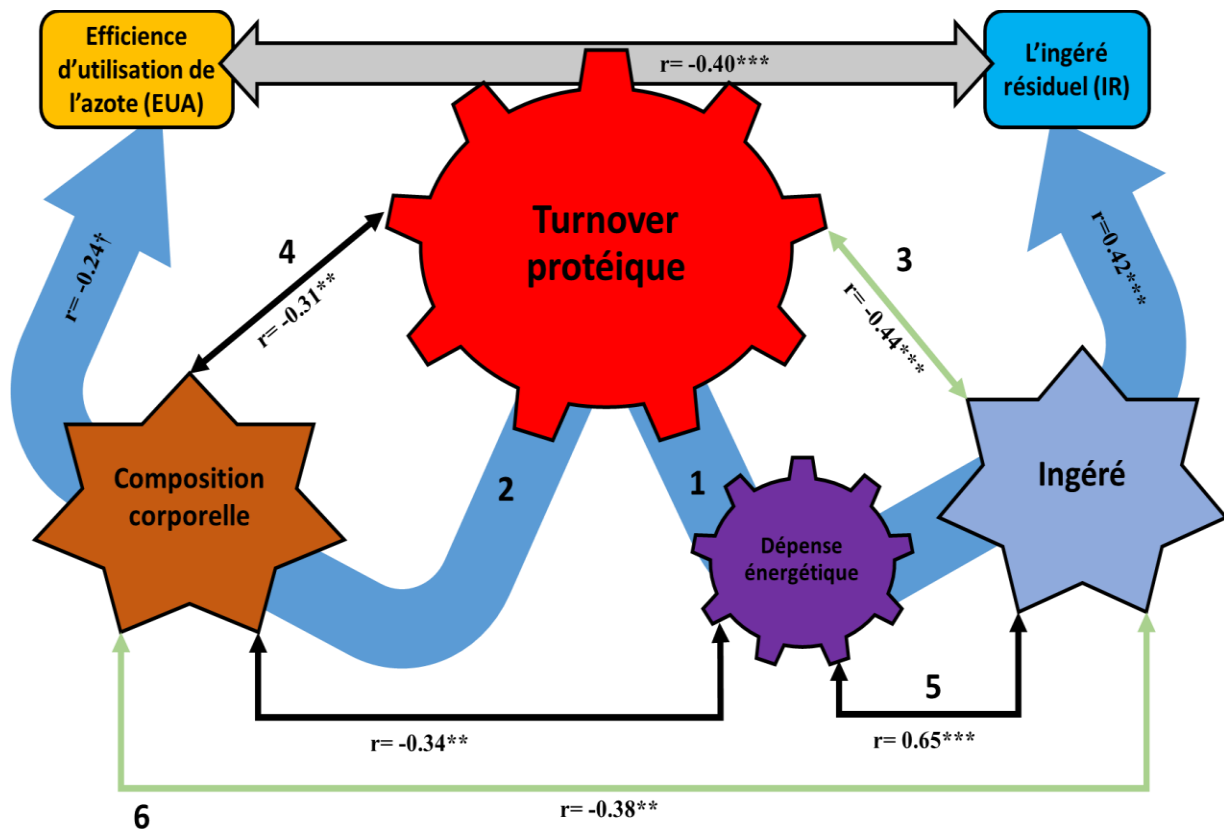


Figure 24 : Schéma conceptuel présentant mes hypothèses sur le lien entre le métabolisme protéique (EUA) et l'IR avec le turnover protéique comme déterminant majeur de cette relation. Les flèches bleues épaisses (1 et 2) sont les relations identifiées dans ce travail de thèse qui pourraient mettre le turnover protéique dans le centre de la relation entre l'EUA et l'IR. Les lignes fines noires sont des relations établies dans ce travail de thèse et la littérature scientifique. Les lignes fines vertes sont similaires aux noires mais pointent sur une interaction significative entre l'effet régime et le classement IR ($P < 0,10$).

*** $P < 0,001$ ** $P < 0,01$ * $P < 0,05$ † $P < 0,10$.

Hypothèse sur l'influence du turnover protéique sur la composition corporelle et l'EUA (flèche 2, Figure 5).

Les résultats du turnover protéique mesuré dans le muscle pourraient expliquer pourquoi à même PV initial et final et à même durée d'engraissement, les individus efficaces ont un poids de carcasse et une quantité de muscle squelettique plus importants que les inefficients. D'un point de vue biologique, une baisse du taux de dégradation protéique avec un taux de synthèse protéique similaire ou légèrement diminué conduit à un taux d'accrétion protéique plus élevé. Ainsi, Lorenzen et al. (2000a) ont montré que des agneaux sélectionnés pour un taux de dégradation protéique plus faible avaient un gain protéique plus important sans changements significatifs du taux de synthèse protéique. Lobley (2003) expliquait comment l'efficacité de rétention protéique, déterminée d'après le rapport entre le taux de synthèse protéique totale et le taux d'accrétion protéique totale, pouvait être plus élevée lorsque la dégradation protéique diminuait par rapport à une synthèse protéique augmentée. Mon hypothèse est que le turnover protéique impacte l'EUA au travers notamment de son influence sur la proportion de muscle squelettique. Ce phénomène a été en partie démontré dans l'étude d'Eanaeme et al. (1998) qui a montré l'influence d'une modification du turnover protéique du muscle squelettique sur le catabolisme hépatique des AAs. Comme discuté précédemment, une partie des AAs issus des protéines dégradées ne peuvent pas être re-synthétisées du fait de l'incorporation d'un groupe amine terminal qui détermine la fin de leur demi-vie (Eldeeb et Fahlman, 2016). Par conséquent, ces AAs sont catabolisés dans le foie puis excrétés dans les urines sous forme d'azote uréique. Waterlow (1970 ; 2006) montre dans un travail de synthèse chez la souris que le taux de resynthèse des AAs dans un même organe (la plus grande partie sort de l'organe et est re-synthétisée ailleurs) représente 10-30% dans le muscle squelettique et jusqu'à 50% dans le foie en postprandial. Un taux de turnover protéique, et donc de synthèse et de dégradation des protéines, plus important peut conduire à une incorporation plus élevée de groupes amines terminaux (Giglione et al., 2004), et donc à un catabolisme hépatique des AAs plus important chez les animaux inefficients. Cette hypothèse a été aussi formulée par Oddy et Richardson (2004), mais malheureusement, une relation positive entre le turnover protéique et le catabolisme hépatique des AAs n'a jamais été prouvée chez des animaux en bonne santé, elle l'a été uniquement chez des individus atteints de maladies comme l'urémie (Mitch et al., 1993 ; England et Price, 1995). Mes résultats ne permettent pas de prouver cette relation non plus mais ils la suggèrent. Les animaux inefficients ont une activité de transaminase aspartate alanine-transférase (ALAT) plus importante (+24,6% ; $P=0,06$) que les efficaces quel que soit le régime, ce qui a été associé à un catabolisme des AAs plus élevé (Bourdel et al., 1983). Ces résultats sont aussi cohérents avec ceux de Cantalapiedra-Hijar et al. (2020) sur les animaux plus extrêmes issus du même dispositif à grande échelle, et qui suggèrent une transamination plus importante des AAs chez les individus inefficients selon l'IR quel que soit le régime. Je considère que les résultats de cette thèse suggèrent une relation positive entre le turnover protéique et le catabolisme des AAs car la dégradation protéique intra-cellulaire (voie de l'ubiquitine) du muscle squelettique a été positivement corrélée aux activités des enzymes hépatiques ALAT ($r= 0.40$; $P=0.02$). Ces résultats sont issus de l'étude ex vivo en postprandial, et j'attendrais une corrélation similaire lorsque les animaux ingèrent à volonté. Compte tenu de l'influence du catabolisme des AAs sur l'EUA (Nichols et al., 2019), la corrélation négative trouvée dans le dispositif analytique entre la dégradation protéique et l'EUA (données de l'abattoir, $r= -0,17$; $P=0,09$) renforce l'hypothèse d'un turnover protéique impactant positivement le catabolisme des AAs hépatiques et négativement l'EUA. Ainsi, le fait d'avoir noté un turnover protéique différent entre animaux extrêmes IR et d'avoir observé des corrélations significatives (même si faibles) ou des tendances entre le turnover protéique et l'EUA avec le régime mais semble renforcer l'hypothèse émise à partir du dispositif à grande échelle (Figure 21) d'une relation entre l'IR et l'EUA plus importante avec le régime mais. En conséquence, je considère que le turnover protéique pourrait contribuer à expliquer les différences d'EUA observées entre extrêmes IR.

Hypothèse sur l'influence du turnover protéique sur la dépense énergétique, les quantités ingérées et l'IR (flèche 1, Figure 5).

Les phénomènes biologiques à l'origine d'une relation entre turnover protéique et IR sont, d'après la plupart des auteurs, en lien avec la dépense énergétique qui se situe à l'interface des deux (Caton et al., 2000 ; Lobley, 2003). Mes résultats montrent que les animaux efficaces selon l'IR ont tendance à avoir une dépense énergétique plus faible (-4,2% de consommation d'oxygène en g/kg PV ; $P=0,08$) que les inefficients, quel que soit le régime. Cette très légère baisse de dépense énergétique peut résulter d'un ingéré plus faible (corrélation entre la consommation d'O₂ et MSI : $r=0,38$; $P=0,03$) et d'un rendement de carcasse plus élevé (corrélation entre la consommation d'O₂ et le rendement de carcasse : $r=-0,34$; $P=0,02$) avec des organes plus petits (à forte dépense énergétique par g de tissu, Ortigues et Doreau, 1995). Mon hypothèse est que le turnover protéique pourrait impacter l'IR à travers son influence sur la dépense énergétique (corrélation entre la TFDMS et la consommation d'O₂ : $r=0,39$; $P=0,03$) et donc, sur les quantités ingérées. Cependant, je considère que les différences de turnover protéique entre individus ne contribuent pas à expliquer une grande partie des différences de dépense énergétique observées entre les extrêmes selon l'IR parce que : i) seulement 8% des différences entre extrêmes selon l'IR sont expliqués par les différences de dépense énergétique entre animaux (publication #2). En regardant les résultats de composition corporelle des animaux extrêmes, j'attends que la plupart des différences de dépense énergétique entre extrêmes soit associée à la composition corporelle [sachant que les animaux extrêmes ont une dépense énergétique calculée des tissus splanchniques plus faible de -2,1% et de la carcasse plus élevée de +4,2% par rapport aux inefficients] et à l'ingéré, avec peut-être une contribution mineure du turnover protéique, ii) Les différences de turnover entre animaux extrêmes sont fondamentalement associées à la dégradation protéique et non à la synthèse protéique, or le coût énergétique de la dégradation protéique est significativement moins important que celui de la synthèse (0,36 Mcal/kg vs 1,45 Mcal/kg ; Lobley et al., 2000b) et iii) Les différences de turnover protéique observées sont principalement associées au muscle squelettique, et même si le muscle squelettique représente le pool protéique le plus important du corps chez le bovin viande, le turnover protéique et le taux métabolique de ce tissu sont significativement plus faibles que ceux des organes (Ortigues et Doreau, 1995) en parallèle de leur dépense énergétique [1,02 MJ/kg tissu/jour vs 10,5 MJ/kg tissu/jour, respectivement (Oddy et al., 1984 ; Burrin et al., 1990)].

J'en conclus pour le régime maïs, que les animaux supérieurs en termes d'IR ont un turnover protéique plus faible, évalué d'après la baisse de dégradation protéique. Ces différences de turnover protéique peuvent expliquer en partie les différences observées de composition corporelle, et par conséquent, de dépense énergétique et d'EA, ainsi que les différences estimées de catabolisme hépatique des AAs, ce qui aide à comprendre le lien entre turnover protéique et EUA.

Conclusions et perspectives

Conclusions

L'objectif de ce travail a été d'évaluer la relation entre l'ingéré résiduel (IR), un critère d'efficacité alimentaire utilisé en sélection génétique, et le métabolisme protéique en analysant la contribution du régime à cette relation.

Ce travail a mis en évidence qu'il existe une relation entre le métabolisme protéique et l'IR chez le bovin viande. Cette relation a d'abord été démontrée au niveau de l'animal entier, où le métabolisme protéique a été apprécié par son effet global sur l'efficacité d'utilisation de l'azote (EUA), en montrant que les individus efficaces selon l'IR ont aussi une EUA supérieure. Bien que cette relation ait été confirmée quel que soit le régime alimentaire utilisé, des tendances observées dans cette thèse suggèrent une plus forte relation entre l'EUA et l'IR chez les animaux nourris avec un régime riche en amidon comparé à un régime riche en fibre. Le turnover protéique pourrait être à l'origine d'une relation régime-dépendante entre l'IR et l'EUA. Ainsi, les animaux efficaces selon l'IR ont présenté un turnover protéique plus faible, en termes de dégradation protéique, que les animaux inefficaces mais seulement avec le régime riche en amidon, alors qu'il n'y a pas de différences chez les animaux du régime riche en fibre. Cette interaction significative semble être due aux fortes différences dans la nature de l'énergie des deux régimes alimentaires (amidon vs fibre), favorisant une absorption de substrats glucogéniques supérieure (notamment pour le glucose et le rapport acétate/propionate) mais aussi plus rapide (taux d'absorption) chez les animaux alimentés avec le régime riche en amidon. Une absorption contrastée, mais aussi probablement plus rapide, en nutriments glucogéniques chez les animaux maïs semble être responsable d'une réponse insulinaire très différente entre les extrêmes IR des deux régimes alimentaires, un signal clé de l'état d'activation des voies moléculaires de la synthèse et dégradation protéique.

Mes résultats suggèrent que, dans les conditions expérimentales utilisées dans ma thèse, les phénomènes de régulation de la synthèse et dégradation protéiques n'opèrent pas de la même façon lorsqu'on évalue des animaux extrêmes sur l'IR entre régimes. Ainsi, la dégradation protéique est diminuée chez les animaux efficaces alimentés avec le régime maïs par des phénomènes qui ne sont pas uniquement reliés à l'ingéré mais aussi au métabolisme propre de l'individu. En revanche, la synthèse protéique semble être légèrement diminuée chez les animaux efficaces alimentés avec le régime maïs probablement au travers uniquement de l'effet de l'ingéré. Les données générées dans ma thèse suggèrent que si les animaux maïs avaient été alimentés *in vivo* à même niveau d'ingestion, les individus efficaces auraient eu une dégradation protéique toujours plus basse mais une synthèse protéique similaire par rapport aux individus inefficaces.

Les résultats de cette thèse démontrent comment les animaux efficaces selon l'IR utilisent l'azote ingéré de manière plus efficace grâce à des modifications de métabolisme protéique, notamment du turnover qui partitionne l'azote en faveur du dépôt musculaire et au détriment des urines. Les conséquences de l'utilisation de l'IR comme index de sélection génétique pourraient donc à la fois améliorer l'économie des élevages en lien avec le prix de la protéine et réduire les rejets azotés vers l'environnement.

Perspectives

D'après les principales conclusions de cette thèse, l'approfondissement de la relation entre le métabolisme protéique et l'EA devraient porter sur l'effet du régime. Dans mon point de vue il y a une perspective principale à suivre et d'autres points intéressants à étudier ensuite.

La première perspective porte sur le turnover protéique des animaux extrêmes alimentés à l'herbe. Il s'agirait d'analyser plus finement le turnover protéique entre extrêmes alimentés avec le régime herbe en utilisant d'autres méthodes, plus sensibles à de faibles variations de turnover (ex : méthodes de référence ; Waterlow, 2006), de façon à confirmer soit le manque de différence entre extrêmes du taux du turnover protéique, soit les limites des méthodes utilisées dans cette thèse pour détecter de faibles différences. En effet, même si l'impact des deux approches (animal entier et biomoléculaire) a été discuté, l'absence de différences de turnover protéique entre extrêmes alimentés avec le régime herbe a été un peu surprenante. Les méthodes de mesure du turnover protéique utilisées dans ce travail ont été choisies car elles sont non-invasives, elles permettent d'évaluer le turnover sur un temps long et leur capacité à détecter des différences de turnover entre régimes contrastés en teneur protéique avait été démontrée (Harris et Milne, 1980 ; Cantalapiedra-Hijar et al., 2019). L'utilisation de méthodes de référence aurait néanmoins l'inconvénient de faire mesures invasives à court terme sur des animaux en conditions non-physiologiques.

Compte tenu de l'association connue entre la MSI et le turnover protéique (Jones et al., 1990), nous avons appliqué une approche qui tentait d'isoler l'effet de l'IR de celui des quantités ingérées. Pour mieux explorer cette idée, je propose d'utiliser des lignées génétiques d'animaux extrêmes selon l'IR et de les nourrir à même niveau d'ingestion en évaluant leur turnover protéique. Une telle stratégie expérimentale permettrait de tester s'ils les différences de turnover protéique sont strictement associées à la génétique ou liées à l'ingéré.

De la même manière et en essayant d'isoler l'effet de l'IR de celui des quantités ingérées, il peut être très intéressant d'évaluer avec des méthodes plus directes si vraiment les animaux inefficients ont un catabolisme hépatique des AAs [ex : avec des méthodes d'infusion des isotopes (Harris et al., 1992)] et des pertes protéiques endogènes fécales [ex : avec des canules duodénales (Swanson, 1977)] plus élevées que les efficaces, comme suggéré par les résultats de cette thèse et les travaux antérieurs (Richardson et al., 2004 ; Herd et al., 2004). Cependant, la recherche devant prendre en compte le bien-être animal et les demandes sociétales, l'utilisation de méthodes invasives n'est pas souhaitable ce qui nécessiterait le développement de nouvelles approches (peut être indirectes comme celles utilisées dans cette thèse).

Enfin le turnover protéique pourrait être encore évalué au niveau biomoléculaire mais à travers d'autres voies métaboliques de la dégradation (protéine MDM2 proto-oncogène, protéine ligase de l'ubiquitine NEDD4) et de la synthèse protéiques (mTor, ou le facteur d'élongation 2 EIF2K) ainsi que d'autres pools (intestins, rumen, peau, muscle non-squelettique) comme dans des travaux précédents (Elolimy et al., 2019). Il pourrait aussi être intéressant de mesurer les mêmes voies de synthèse protéique que dans cette thèse chez des animaux extrêmes selon l'IR mais restreints à un même niveau d'alimentation pendant une longue période. Ainsi, il pourrait être confirmé que la synthèse protéique est vraiment dépendante des quantités ingérées et indépendante de l'IR.

Références bibliographiques

- Agreste, S., and Puccio, L. 2011. Wavelet-based watermarking algorithms: theory, applications and critical aspects. *International Journal of Computer Mathematics*, 88(9), 1885-1895.
- Alemu, A. W., Amiro, B. D., Bittman, S., MacDonald, D., and Ominski, K. H. 2017. Greenhouse gas emission of Canadian cow-calf operations: A whole-farm assessment of 295 farms. *Agricultural systems*, 151, 73-83.
- Allen, M.S., 1996. Physical constraints on voluntary intake of forages by ruminants. *Journal of Animal Science* 74, 3063–3075.
- Allen, M.S., 2004. Drives and limits to feed intake in ruminants. *Animal Production Science* 54, 1513–1524.
- Andersen, B. B. 1978. Animal size and efficiency, with special reference to growth and feed conversion in cattle. *Animal Science*, 27(3), 381-391.
- Andrade, D. K. B. D., Vêras, A. S. C., Ferreira, M. D. A., Santos, M. V. F. D., Melo, W. S. D., and Pereira, K. P. 2009. Body composition and net protein and energy requirements for weight gain of crossbred dairy cattle in grazing. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 38, 746-751.
- Angelidis, A., Crompton, L., Misselbrook, T., Yan, T., Reynolds, C.K., and Stergiadis, S., 2019. Evaluation and prediction of nitrogen use efficiency and outputs in faeces and urine in beef cattle. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 280, 1–15.
- Archer, A, E. C., Richardson, R. M., Herd, and Arthur, P.F., 1999. Potential for selection to improve efficiency of feed use in beef cattle: A review. Article in *Australian Journal of Agricultural Research* 50, 147–161.
- Armatte, M., 2001. Le statut changeant de la corrélation en économétrie (1910-1944). *JSTOR* 52, 617–631.
- Arthur, P. F., Archer, J. A., Johnston, D. J., Herd, R. M., Richardson, E. C., and Parnell, P. F. 2001. Genetic and phenotypic variance and covariance components for feed intake, feed efficiency, and other postweaning traits in Angus cattle. *Journal of animal science*, 79(11), 2805-2811.
- Arthur, P.F., Archer, J.A., and Herd, R.M., 2004. Feed intake and efficiency in beef cattle: Overview of recent Australian research and challenges for the future. In *Australian Journal of Experimental Agriculture*, pp. 361–369. CSIRO.
- Arthur, P.F., and Herd, R.M., 2012. Genetic Improvement of Feed Efficiency. In *Feed Efficiency in the Beef Industry*, pp. 93–103. Wiley-Blackwell.
- Asher, A., Shabtay, A., Cohen-Zinder, M., Aharoni, Y., Miron, J., Agmon, R., Halachmi, I., Orlov, A., Haim, A., Tedeschi, L.O., Carstens, G.E., Johnson, K.A., and Brosh, A., 2018. Consistency of Feed Efficiency Ranking and Mechanisms Associated with Inter-Animal Variation among Growing Calves. *Journal of Animal Science* 96, 990–1009.

- Asmare, A., Puchala, R., Merkel, R.C., Sahlu, T., and Goetsch, A.L., 2006. Changes in Energy Expenditure by Meat Goats with Varying Levels of Feed Intake Near Maintenance and Below. *Journal of applied animal research* 29, 81–89.
- Azevedo, P.A., Leeson, S., Cho, C.Y., and Bureau, D.P., 2004. Growth, nitrogen and energy utilization of juveniles from four salmonid species: diet, species and size effects. *Aquaculture* 234, 393–414.
- Bach, A., Calsamiglia, S., and Stern, M.D., 2005. Nitrogen metabolism in the rumen. *Journal of Dairy Science* 88, E9–E21.
- Banerjee, P., Carmelo, V.A.O., and Kadarmideen, H.N., 2020. Integrative Analysis of Metabolomic and Transcriptomic Profiles Uncovers Biological Pathways of Feed Efficiency in Pigs. *Metabolites* 10, 275.
- Barea, R., Dubois, S., Gilbert, H., Sellier, P., van Milgen, J., and Noblet, J., 2010. Energy utilization in pigs selected for high and low residual feed intake. *Journal of Animal Science* 88, 2062–2072.
- Basarab, J.A., Price, M.A., Aalhus, J.L., Okine, E.K., Snelling, W.M., and Lyle, K.L., 2003. Residual feed intake and body composition in young growing cattle. *Canadian Journal of Animal Science* 83, 189–204.
- Baldwin, R. L., France, J., Beever, D. E., Gill, M., and Thornley, J. H. 1987. Metabolism of the lactating cow: III. Properties of mechanistic models suitable for evaluation of energetic relationships and factors involved in the partition of nutrients. *Journal of Dairy Research*, 54(1), 133-145.
- Bergen, W.G., 2021. *Amino Acids in Beef Cattle Nutrition and Production*. Springer, Cham.
- Berry, D.P., and Crowley, J.J., 2013. CELL BIOLOGY SYMPOSIUM: Genetics of feed efficiency in dairy and beef cattle 1. *Journal of Animal Science* 91, 1594–1613.
- Berry, D. P., Coffey, M. P., Pryce, J. E., De Haas, Y., Løvendahl, P., Krattenmacher, N., and Veerkamp, R. F. 2014a. International genetic evaluations for feed intake in dairy cattle through the collation of data from multiple sources. *Journal of dairy science*, 97(6), 3894-3905.
- Berry, D. P., Wall, E., and Pryce, J. E. 2014b. Genetics and genomics of reproductive performance in dairy and beef cattle. *animal*, 8(s1), 105-121.
- Berthiaume, R., Dubreuil, P., Stevenson, M., McBride, B. W., and Lapierre, H. 2001. Intestinal disappearance and mesenteric and portal appearance of amino acids in dairy cows fed ruminally protected methionine. *Journal of Dairy Science*, 84(1), 194-203.
- Blake, R. W., and Custodio, A. A. 1984. Feed efficiency: a composite trait of dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 67(9), 2075-2083.
- Blouin, J. P., Bernier, J. F., Reynolds, C. K., Lobley, G. E., Dubreuil, P., and Lapierre, H. 2002. Effect of supply of metabolizable protein on splanchnic fluxes of nutrients and hormones in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 85(10), 2618-2630.
- Boddicker, N., Gabler, N.K., Spurlock, M.E., Nettleton, D., and Dekkers, J.C.M., 2011. Effects of ad libitum and restricted feed intake on growth performance and body composition of Yorkshire pigs selected for reduced residual feed intake1. *Journal of Animal Science* 89, 40–51.
- Boisclair, Y. R., Bell, A. W., Dunshea, F. R., Harkins, M., and Bauman, D. E. 1993. Evaluation of the arteriovenous difference technique to simultaneously estimate protein synthesis and degradation in the hindlimb of fed and chronically underfed steers. *The Journal of nutrition*, 123(6), 1076-1088.

- Boisclair, Y.R., Bauman, D.E., Bell, A.W., Dunshea, F.R., and Harkins, M., 1994. Nutrient Utilization and Protein Turnover in the Hindlimb of Cattle Treated with Bovine Somatotropin. *The Journal of Nutrition* 124, 664–673.
- Bonilha, S.F.M., Branco, R.H., Mercadante, M.E.Z., dos Santos Gonçalves Cyrillo, J.N., Monteiro, F.M., and Ribeiro, E.G., 2017. Digestion and metabolism of low and high residual feed intake Nellore bulls. *Tropical Animal Health and Production* 49, 529–535.
- Borgenvik, M., Apró, W., and Blomstrand, E., 2012. Intake of branched-chain amino acids influences the levels of MAFbx mRNA and MuRF-1 total protein in resting and exercising human muscle. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* 302, 510–521.
- Bottje, W. G., and Carstens, G. E. 2009. Association of mitochondrial function and feed efficiency in poultry and livestock species. *Journal of animal science*, 87(suppl_14), E48-E63.
- Broderick, G. A., Wallace, R. J., and Ørskov, E. R. 1991. Control of rate and extent of protein degradation. In *Physiological aspects of digestion and metabolism in ruminants* (pp. 541-592). Academic Press.
- Brito, L. F., Oliveira, H. R., Houlihan, K., Fonseca, P. A., Lam, S., Butty, A. M., and Schenkel, F. S. 2020. Genetic mechanisms underlying feed utilization and implementation of genomic selection for improved feed efficiency in dairy cattle. *Canadian journal of animal science*, 100(4), 587-604.
- Brunes, L. C., Baldi, F., Lopes, F. B., Lôbo, R. B., Espigolan, R., Costa, M. F., and Magnabosco, C. U. 2021. Weighted single-step genome-wide association study and pathway analyses for feed efficiency traits in Nellore cattle. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 138(1), 23-44.
- Bolster, D. R., Jefferson, L. S., and Kimball, S. R., 2004. Regulation of protein synthesis associated with skeletal muscle hypertrophy by insulin-, amino acid- and exercise-induced signalling. *Proceedings of the Nutrition Society*, 63(2), 351-356.
- Bouquet, A., Fouilloux, M. N., Renand, G., and Phocas, F. 2010. Genetic parameters for growth, muscularity, feed efficiency and carcass traits of young beef bulls. *Livestock Science*, 129(1-3), 38-48.
- Bourdel, G., Hitier, Y., Lardeux, B., and Girard-Globa, A., 1983. Activity of several enzymes of amino acid catabolism in the liver of rats fed protein as a meal. *Reproduction nutrition and development* 23, 875–881.
- Brown, M.S, Ponce, C.H. and Pulikanti, R., 2006. Adaptation of beef cattle to high-concentrate diets: Performance and ruminal metabolism. *Journal of Animal Science* 84, E25–E33.
- Burrin, D.G., Ferrell, C.L., Britton, R.A., and Bauer, M., 1990. Level of nutrition and visceral organ size and metabolic activity in sheep*. *British Journal of Nutrition* 64, 439–448.
- Buttery, P.J., Vernon, B.G., and Pearson, J.T., 1978. Anabolic agents—some thoughts on their mode of action. *Proceedings of the Nutrition Society* 37, 311–315.
- Carbone, J. W., Margolis, L. M., and Pasiakos, S. M. 2016. Cellular and Molecular Mechanisms of Protein Synthesis Among Tissues. *The Molecular Nutrition of Amino Acids and Proteins*, 39-47.
- Carré, B., Mignon-Grasteau, S., and Juin, H. 2008. Breeding for feed efficiency and adaptation to feed in poultry. *World's Poultry Science Journal*, 64(3), 377-390.
- Carriquiry, M. A., Dong, F., Du, X., Elobeid, A. E., Fabiosa, J. F., Chavez, E. C., and Pan, S. 2010. World market impacts of high biofuel use in the European Union (No. 1040-2016-84875).

- Carstens, G. E., and Tedeschi, L. O. 2006. Defining feed efficiency in beef cattle. In Proceedings of Beef Improvement Federation 38th Annual Research Symposium and Annual Meeting, Choctaw, Mississippi (pp. 12-21).
- Campion, B., Keane, M.G., Kenny, D.A., and Berry, D.P., 2009. Evaluation of estimated genetic merit for carcass weight in beef cattle: Live weights, feed intake, body measurements, skeletal and muscular scores, and carcass characteristics. *Livestock Science* 126, 87–99.
- Cantalapiedra-Hijar, G., Abo-Ismael, M., Carstens, G.E., Guan, L.L., Hegarty, R., Kenny, D.A., McGee, M., Plastow, G., and Ortigues-Marty, I., 2018. Review: Biological determinants of between-animal variation in feed efficiency of growing beef cattle. *Animal*, 1–15.
- Cantalapiedra-Hijar, G., Fouillet, H., Huneau, J.F., Fanchone, A., Doreau, M., Nozière, P., and Ortigues-Marty, I., 2016. Relationship between efficiency of nitrogen utilization and isotopic nitrogen fractionation in dairy cows: contribution of digestion v. metabolism? *Animal* 10, 221–229.
- Cantalapiedra-Hijar, G., Fouillet, H., Chantelauze, C., Khodorova, N., Bahloul, L., and Ortigues-Marty, I. 2019. The isotopic nitrogen turnover rate as a proxy to evaluate in the long-term the protein turnover in growing ruminants. *The Journal of Agricultural Science*, 157(9-10), 701-710.
- Cantalapiedra-Hijar, G., Guarnido, P., Schiphorst, A.M., Robins, R.J., Renand, G., and Ortigues-Marty, I., 2020. Natural ¹⁵N abundance in specific amino acids indicates associations between transamination rates and residual feed intake in beef cattle. *Journal of Animal Science* 98, 1–7.
- Cantalapiedra-Hijar, G., Lemosquet, S., Rodríguez-López, J.M., and Messad, F., 2014. Diets rich in starch increase the posthepatic availability of amino acids in dairy cows fed diets at low and normal protein levels. *Journal of Dairy Science* 97, 5151–5166.
- Cantalapiedra-Hijar, G., Ortigues-Marty, I., Sepchat, B., Agabriel, J., Huneau, J.F., and Fouillet, H., 2015. Diet-animal fractionation of nitrogen stable isotopes reflects the efficiency of nitrogen assimilation in ruminants. *British Journal of Nutrition* 113, 1158–1169.
- Cardozo, P. W., Calsamiglia, S., Ferret, A., and Kamel, C. 2004. Effects of natural plant extracts on ruminal protein degradation and fermentation profiles in continuous culture. *Journal of animal science*, 82(11), 3230-3236.
- Carmona, P., Costa, D. F. A., and Silva, L. F. P. 2020. Feed efficiency and nitrogen use rankings of *Bos indicus* steers differ on low and high protein diets. *Animal Feed Science and Technology*, 263, 114493.
- Castro Bulle, F.C.P., Paulino, P.V., Sanches, A.C., and Sainz, R.D., 2007. Growth, carcass quality, and protein and energy metabolism in beef cattle with different growth potentials and residual feed intakes. *Journal of Animal Science* 85, 928–936.
- Cassady, C. J., Felix, T. L., Beever, J. E., and Shike, D. W. 2016. Effects of timing and duration of test period and diet type on intake and feed efficiency of Charolais-sired cattle 1. *Journal of animal science*, 94(11), 4748.
- Ceacero, T. M., Mercadante, M. E. Z., Cyrillo, J. N. D. S. G., Canesin, R. C., Bonilha, S. F. M., and de Albuquerque, L. G. 2016. Phenotypic and genetic correlations of feed efficiency traits with growth and carcass traits in Nellore cattle selected for postweaning weight. *PLoS One*, 11(8), e0161366.

- Ceseña, T. I., Cui, T. X., Piwien-Pilipuk, G., Kaplani, J., Calinescu, A. A., Huo, J. S., and Schwartz, J. 2007. Multiple mechanisms of growth hormone-regulated gene transcription. *Molecular genetics and metabolism*, 90(2), 126-133.
- Chen, Y., Gondro, C., Quinn, K., Herd, R.M., Parnell, P.F. and Vanselow, B., 2011. Global gene expression profiling reveals genes expressed differentially in cattle with high and low residual feed intake. *Animal Genetics* 42, 475–490.
- Chow, L. S., Albright, R. C., Bigelow, M. L., Toffolo, G., Cobelli, C., and Nair, K. S., 2006. Mechanism of insulin's anabolic effect on muscle: measurements of muscle protein synthesis and breakdown using aminoacyl-tRNA and other surrogate measures. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 291(4), E729-E736.
- Clare, M.K., Richard, P., Kate, K., Sinead, W., Mark, M.G., and David, K., 2018. Residual feed intake phenotype and gender affect the expression of key genes of the lipogenesis pathway in subcutaneous adipose tissue of beef cattle. *Journal of Animal Science and Biotechnology* 9, 1–10.
- Clark, J. H., Klusmeyer, T. H., and Cameron, M. R. 1992. Microbial protein synthesis and flows of nitrogen fractions to the duodenum of dairy cows. *Journal of dairy science*, 75(8), 2304-2323.
- Colucci, P. E., Chase, L. E., and Van Soest, P. J. 1982. Feed intake, apparent diet digestibility, and rate of particulate passage in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 65(8), 1445-1456.
- Caton, J.S., M. L. Bauer and Hidari, H., 2000. Metabolic Components of Energy Expenditure in Growing Beef Cattle - Review -. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 13, 702–710.
- Combaret, L., Taillandier, D., Polge, C., Béchet, D., and Attaix, D. 2016. Cellular mechanisms of protein degradation among tissues. *The Molecular Nutrition of Amino Acids and Proteins*, 27-37.
- Coyle, S., Fitzsimons, C., Kenny, D.A., Kelly, A.K., Mcgee, M., and Simpson, A., 2016. Repeatability of feed efficiency in steers offered a high-concentrate diet. *Journal of Animal Science* 94.
- Cundiff, L. V., MacNeil, M. D., Gregory, K. E., and Koch, R. M. 1986. Between-and within-breed genetic analysis of calving traits and survival to weaning in beef cattle. *Journal of animal science*, 63(1), 27-33.
- Da Costa Gomes, R., Sainz, R., and Leme, P., 2013. Protein metabolism, feed energy partitioning, behavior patterns and plasma cortisol in Nellore steers with high and low residual feed intake 1. *Revista Brasileira de Zootecnia* 42, 44–50.
- Da Silva, L. D., Pereira, O. G., Da Silva, T. C., Valadares Filho, S. C., and Ribeiro, K. G. 2016. Effects of silage crop and dietary crude protein levels on digestibility, ruminal fermentation, nitrogen use efficiency, and performance of finishing beef cattle. *Animal Feed Science and Technology*, 220, 22-33.
- Dakkak, A. 1995. Conséquences nutritionnelles du parasitisme gastro-intestinal chez les ruminants. In *Nutrition des ruminants domestiques: Ingestion et digestion* (pp. 853-869). Institut National de la Recherche Agronomique.
- Danfær, A., Tetens, V., and Agergaard, N. 1995. Review and an experimental study on the physiological and quantitative aspects of gluconeogenesis in lactating ruminants. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 111(2), 201-210.

- Davis, T. A., Suryawan, A. G. U. S., Bush, J. A., O'Connor, P. M. J., and Thivierge, M. C. 2003. Interaction of amino acids and insulin in the regulation of protein metabolism in growing animals. *Canadian journal of animal science*, 83(3), 357-364.
- Dechow, C.D., Baumrucker, C.R., Bruckmaier, R.M., and Blum, J.W., 2017. Blood plasma traits associated with genetic merit for feed utilization in Holstein cows. *Journal of Dairy Science* 100, 8232–8238.
- De Wrachien, D., Schultz, B., and Goli, M. B. 2021. Impacts of population growth and climate change on food production and irrigation and drainage needs: A world-wide view. *Irrigation and Drainage*, 70(5), 981-995.
- DiGiacomo, K., Maret, L. C., Wales, W. J., Hayes, B. J., Dunshea, F. R., and Leury, B. J. 2014. Thermoregulatory differences in lactating dairy cattle classed as efficient or inefficient based on residual feed intake. *Animal Production Science*, 54(10), 1877-1881.
- Dijkstra, J., Forbes, J. M., and France, J. (Eds.). 2005. Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism. Cambridge: CABI Pub.
- Ding, R., Yang, M., Wang, X., Quan, J., Zhuang, Z., Zhou, S., and Wu, Z. 2018. Genetic architecture of feeding behavior and feed efficiency in a Duroc pig population. *Frontiers in genetics*, 9, 220.
- Dini, Y., Cajarville, C., Gere, J. I., Fernandez, S., Fraga, M., Pravia, M. I., and Ciganda, V. S. 2019. Association between residual feed intake and enteric methane emissions in Hereford steers. *Translational Animal Science*, 3(1), 239-246.
- Do, D. N., Strathe, A. B., Ostensen, T., Pant, S. D., and Kadarmideen, H. N. 2014. Genome-wide association and pathway analysis of feed efficiency in pigs reveal candidate genes and pathways for residual feed intake. *Frontiers in genetics*, 5, 307.
- Dohm, M. R. 2002. Repeatability estimates do not always set an upper limit to heritability. *Functional Ecology*, 273-280.
- Duarte, D.A.S., Newbold, C.J., Detmann, E., Silva, F.F., Freitas, P.H.F., Veroneze, R., and Duarte, M.S., 2019. Genome-wide association studies pathway-based meta-analysis for residual feed intake in beef cattle. *Animal Genetics*.
- Duchêne, S., Métayer, S., Audouin, E., Bigot, K., Dupont, J., and Tesseraud, S., 2008. Refeeding and insulin activate the AKT/p70S6 kinase pathway without affecting IRS1 tyrosine phosphorylation in chicken muscle. *Domestic Animal Endocrinology* 34, 1–13.
- Durunna, O. N., Mujibi, F. D. N., Goonewardene, L., Okine, E. K., Basarab, J. A., Wang, Z., and Moore, S. S. 2011. Feed efficiency differences and reranking in beef steers fed grower and finisher diets. *Journal of Animal Science*, 89(1), 158-167.
- Dykier, K.C., Oltjen, J.W., Robinson, P.H., and Sainz, R.D., 2020. Effects of finishing diet sorting and digestibility on performance and feed efficiency in beef steers. *Animal* 14, 59–65.
- Eagle, H. 1955. The specific amino acid requirements of a human carcinoma cell (strain HeLa) in tissue culture. *The Journal of experimental medicine*, 102(1), 37-48.
- Eden, E., Geva-Zatorsky, N., Issaeva, I., Cohen, A., Dekel, E., Danon, T., and Alon, U. 2011. Proteome half-life dynamics in living human cells. *Science*, 331(6018), 764-768.

- Eenaeme, C. V., Evrard, M., Hornick, J. L., Baldwin, P., Diez, M., and Istasse, L., 1998. Nitrogen balance and myofibrillar protein turnover in double muscled Belgian Blue bulls in relation to compensatory growth after different periods of restricted feeding. *Canadian Journal of Animal Science*, 78(4), 549-559.
- Eisemann, J.H., Tyrrell, H.F., Hammond, A.E., Reynolds, P.J., Bauman, D.E., Haaland, G.L., McMurtry, J.P., and Varga, G.A., 1986. Effect of Bovine Growth Hormone Administration on Metabolism of Growing Hereford Heifers: Dietary Digestibility, Energy and Nitrogen Balance. *The Journal of Nutrition* 116, 157–163.
- Eldeeb, M., and Fahlman, R., 2016. The-N-End Rule: The Beginning Determines the End. *Protein and peptide letters* 23, 343–348.
- Erasmus, L. J., Botha, P. M., and Meissner, H. H. 1994. Effect of protein source on ruminal fermentation and passage of amino acids to the small intestine of lactating cows. *Journal of Dairy Science*, 77(12), 3655-3665.
- Elolimy, A.A., Abdel-Hamied, E., Hu, L., McCann, J.C., Shike, D.W., and Loor, J.J., 2019. RAPID COMMUNICATION: Residual feed intake in beef cattle is associated with differences in protein turnover and nutrient transporters in ruminal epithelium. *Journal of Animal Science* 97, 2181–2187.
- Elsasser, T.H., Rumsey, T.S., and Hammond, A.C., 1989. Influence of Diet on Basal and Growth Hormone-Stimulated Plasma Concentrations of IGF-I in Beef Cattle. *Journal of Animal Science* 67, 128–141.
- England, B.K., and Price, S.R., 1995. Acidosis and Glucocorticoids Interact to Provoke Muscle Protein and Amino Acid Catabolism. *Blood Purification* 13, 147–152.
- Etherton, T. D., and Bauman, D. E. 1998. Biology of somatotropin in growth and lactation of domestic animals. *Physiological reviews*, 78(3), 745-761.
- Evans, E., Buchanan-Smith, J.G., and Macleod, G.K., 1975. Postprandial Patterns of Plasma Glucose, Insulin and Volatile Fatty Acids in Ruminants Fed Low- and High-Roughage Diets. *Journal of Animal Science* 41, 1474–1479.
- Ferrell, C. L., and Jenkins, T. G. (1988). Influence of biological types on energy requirements.
- Ferrell, C.L., and Koong, K.J., 1986. Influence of Plane of Nutrition on Body Composition, Organ Size and Energy Utilization of Sprague-Dawley Rats. *The Journal of Nutrition* 116, 2525–2535.
- Felig, P. 1973. The glucose-alanine cycle. *Metabolism*, 22(2), 179-207.
- Firkins, J. L., Hristov, A. N., Hall, M. B., Varga, G. A., and St-Pierre, N. R. 2006. Integration of ruminal metabolism in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 89, E31-E51.
- Fischer, A., Friggens, N. C., Berry, D. P., and Faverdin, P. 2018. Isolating the cow-specific part of residual energy intake in lactating dairy cows using random regressions. *animal*, 12(7), 1396-1404.
- Fitzsimons, C., Kenny, D.A., and McGee, M., 2014. Visceral organ weights, digestion and carcass characteristics of beef bulls differing in residual feed intake offered a high concentrate diet. *Animal* 8, 949–959.
- Fitzsimons, C., McGee, M., Keogh, K., Waters, S. M., and Kenny, D. A. 2017. Molecular physiology of feed efficiency in beef cattle. *Biology of domestic animals*, 122-165.

- Flay, H. E., Kuhn-Sherlock, B., Macdonald, K. A., Camara, M., Lopez-Villalobos, N., Donaghy, D. J., and Roche, J. R. 2019. Hot topic: Selecting cattle for low residual feed intake did not affect daily methane production but increased methane yield. *Journal of Dairy Science*, 102(3), 2708-2713.
- Fluharty, F.L., McClure, K.E., Solomon, M.B., Clevenger, D.D., and Lowe, G.D., 1999. Energy source and ionophore supplementation effects on lamb growth, carcass characteristics, visceral organ mass, diet digestibility, and nitrogen metabolism. *Journal of Animal Science* 77, 816–823.
- Follon, J., 1990. Jean-Joël Duhot, La conception stoïcienne de la causalité. In *Revue Philosophique de Louvain*, pp. 109–113. Persée - Portail des revues scientifiques en SHS.
- Foskolos, A., and Moorby, J.M., 2018. Evaluating lifetime nitrogen use efficiency of dairy cattle: A modelling approach. *PLOS ONE* 13, e0201638.
- Foster, A.R., Houlihan, D.F., Gray, C., Medale, F., Fauconneau, B., Kaushikj, S.J. and Le Bail, P.Y., 1991. The effects of ovine growth hormone on protein turnover in rainbow trout. *General and Comparative Endocrinology* 82, 111–120.
- France, J., Hanigan, M. D., Reynolds, C. K., Dijkstra, J., Crompton, L. A., Maas, J. A., and Beever, D. E. 1999. An isotope dilution model for partitioning leucine uptake by the liver of the lactating dairy cow. *Journal of Theoretical Biology*, 198(1), 121-133.
- Freetly, H. C., Knapp, J. R., Calvert, C. C., and Baldwin, R. L. 1993. Development of a mechanistic model of liver metabolism in the lactating cow. *Agricultural Systems*, 41(2), 157-195.
- Freetly, H.C., Kuehn, L.A., Thallman, R.M., and Snelling, W.M., 2020. Heritability and genetic correlations of feed intake, body weight gain, residual gain, and residual feed intake of beef cattle as heifers and cows. *Journal of Animal Science* 98, 1–6.
- Fujita, S., Dreyer, H. C., Drummond, M. J., Glynn, E. L., Cadenas, J. G., Yoshizawa, F., and Rasmussen, B. B. 2007. Nutrient signalling in the regulation of human muscle protein synthesis. *The Journal of physiology*, 582(2), 813-823.
- Galassi, G., Malagutti, L., Colombini, S., Rapetti, L., Gallo, L., Schiavon, S., and Crovetto, G. M. 2015. Nitrogen and energy partitioning in two genetic groups of pigs fed low-protein diets at 130 kg body weight. *Italian Journal of Animal Science*, 14(3), 4012.
- Garcia, F., and Agabriel, J. 2008. CompoCow: a predictive model to estimate variations in body composition and the energy requirements of cull cows during finishing. *The Journal of Agricultural Science*, 146(3), 251-265.
- Garg, M. R., Sherasia, P. L., Bhandari, B. M., Phondba, B. T., Shelke, S. K., and Makkar, H. P. S. 2013. Effects of feeding nutritionally balanced rations on animal productivity, feed conversion efficiency, feed nitrogen use efficiency, rumen microbial protein supply, parasitic load, immunity and enteric methane emissions of milking animals under field conditions. *Animal Feed Science and Technology*, 179(1-4), 24-35.
- Garlick, P. J., McNurlan, M. A., and Ballmer, P. E. 1991. Influence of dietary protein intake on whole-body protein turnover in humans. *Diabetes Care*, 14(12), 1189-1198.
- Geay, Y. 1984. Energy and protein utilization in growing cattle. *Journal of Animal Science*, 58(3), 766-778.

- Gerber, P. J., Hristov, A. N., Henderson, B., Makkar, H., Oh, J., Lee, C., and Oosting, S. 2013. Technical options for the mitigation of direct methane and nitrous oxide emissions from livestock: a review. *animal*, 7(s2), 220-234.
- Gerrits, W. 1996. Modelling the growth of preruminant calves. Wageningen University and Research.
- Giglione, C., Boularot, A., and Meinnel, T., 2004. Protein N-terminal methionine excision. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 61(12), 1455-1474.
- Gilbert, R. A., Kelly, W. J., Altermann, E., Leahy, S. C., Minchin, C., Ouwkerk, D., and Klieve, A. V. 2017. Toward understanding phage: host interactions in the rumen; complete genome sequences of lytic phages infecting rumen bacteria. *Frontiers in microbiology*, 8, 2340.
- Gill, M., France, J., Summers, M., McBride, B. W., and Milligan, L. P. 1989a. Simulation of the energy costs associated with protein turnover and Na⁺, K⁺-transport in growing lambs. *The Journal of nutrition*, 119(9), 1287-1299.
- Gill, M., France, J., Summers, M., McBride, B. W., and Milligan, L. P. 1989b. Mathematical integration of protein metabolism in growing lambs. *The Journal of nutrition*, 119(9), 1269-1286.
- Gingras, A.A., White, P.J., Chouinard, P.Y., Julien, P., Davis, T.A., Dombrowski, L., Couture, Y., Dubreuil, P., Myre, A., Bergeron, K., Marette, A., and Thivierge, M.C., 2007. Long-chain omega-3 fatty acids regulate bovine whole-body protein metabolism by promoting muscle insulin signalling to the Akt-mTOR-S6K1 pathway and insulin sensitivity. *The Journal of Physiology* 579, 269-284.
- Goldberg, A. L. 1969. Protein turnover in skeletal muscle: I. Protein catabolism during work-induced hypertrophy and growth induced with growth hormone. *Journal of Biological Chemistry*, 244(12), 3217-3222.
- Gomes, R. C., Sainz, R. D., Silva, S. L., César, M. C., Bonin, M. N., and Leme, P. R. 2012. Feedlot performance, feed efficiency reranking, carcass traits, body composition, energy requirements, meat quality and calpain system activity in Nellore steers with low and high residual feed intake. *Livestock Science*, 150(1-3), 265-273.
- Green, T. C., Jago, J. G., Macdonald, K. A., and Waghorn, G. C. 2013. Relationships between residual feed intake, average daily gain, and feeding behavior in growing dairy heifers. *Journal of Dairy Science*, 96(5), 3098-3107.
- Grion, A. L., Mercadante, M. E. Z., Cyrillo, J. N. S. G., Bonilha, S. F. M., Magnani, E., and Branco, R. H. 2014. Selection for feed efficiency traits and correlated genetic responses in feed intake and weight gain of Nellore cattle. *Journal of Animal Science*, 92(3), 955-965.
- Guinard, J., and Rulquin, H. 1994. Effects of graded amounts of duodenal infusions of lysine on the mammary uptake of major milk precursors in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 77(12), 3565-3576.
- Guinguina, A., Yan, T., Lund, P., Bayat, A. R., Hellwing, A. L. F., and Huhtanen, P. 2020. Between-cow variation in the components of feed efficiency. *Journal of Dairy Science*, 103(9), 7968-7982.
- Gunsett, F. C. 1984. Linear index selection to improve traits defined as ratios. *Journal of Animal Science*, 59(5), 1185-1193.
- Grummer, R.R., 1995. Impact of changes in organic nutrient metabolism on feeding the transition dairy cow. *Journal of Animal Science* 73, 2820-2833.

- Hafla, A. N., Carstens, G. E., Forbes, T. D. A., Tedeschi, L. O., Bailey, J. C., Walter, J. T., and Johnson, J. R. 2013. Relationships between postweaning residual feed intake in heifers and forage use, body composition, feeding behavior, physical activity, and heart rate of pregnant beef females. *Journal of animal science*, 91(11), 5353-5365.
- Hanigan, M. D., and Baldwin, R. L. 1994. A mechanistic model of mammary gland metabolism in the lactating cow. *Agricultural Systems*, 45(4), 369-419.
- Hanigan, M. D., Dukstra, J., Gerrits, W. J., and France, J. 1997. Modelling post-absorptive protein and amino acid metabolism in the ruminant. *Proceedings of the Nutrition Society*, 56(2), 631-643.
- Hanigan, M.D., Cant, J.P., Weakley, D.C., and Beckett, J.L., 1998. An Evaluation of Postabsorptive Protein and Amino Acid Metabolism in the Lactating Dairy Cow. *Journal of Dairy Science* 81, 3385–3401.
- Hanigan, M.D., Reynolds, C.K., Humphries, D.J., Lupoli, B., and Sutton, J.D., 2004. A Model of Net Amino Acid Absorption and Utilization by the Portal-Drained Viscera of the Lactating Dairy Cow. *Journal of Dairy Science* 87, 4247–4268.
- Hanigan, M. D. 2005. Quantitative aspects of ruminant predicting animal performance. *Animal Science*, 80(1), 23-32.
- Harmon, D. L., and Richards, C. J. 1997. Considerations for gastrointestinal cannulations in ruminants. *Journal of animal science*, 75(8), 2248-2255.
- Harris, C. I., and Milne, G. 1980. The urinary excretion of N τ -methyl histidine in sheep: an invalid index of muscle protein breakdown. *British Journal of Nutrition*, 44(2), 129-140.
- Harris, P. M., and Lobley, G. E. 1991. Amino acid and energy metabolism in the peripheral tissues of ruminants. In *Physiological aspects of digestion and metabolism in ruminants* (pp. 201-230). Academic Press.
- Harris, A.M., 1992. Effect of food intake on hind-limb and whole-body protein metabolism in young growing sheep: chronic studies based on arterio-venous techniques. *British Journal of Nutrition* 68, 389–407.
- Haverberg, L.N., Deckelbaum, L., Bilmazes, C., Munro, H.N., and Young, V.R., 1975. Myofibrillar protein turnover and urinary N- τ -methylhistidine output. Response to dietary supply of protein and energy. *Biochemical Journal* 152, 503–510.
- Hawkins, A. J. S. 1991. Protein turnover: a functional appraisal. *Functional Ecology*, 222-233.
- Hayes, J. P., and Jenkins, S. H. 1997. Individual variation in mammals. *Journal of Mammalogy*, 78(2), 274-293.
- Herd, R.M., and Arthur, P.F., 2009. Physiological basis for residual feed intake. *Journal of Animal Science* 87, 64–71.
- Herd, R.M., P. F. Arthur and Archer, J.A., 2011. Associations between residual feed intake on ad-libitum, pasture and restricted feeding in Angus cows. In *Proceedings of the 19th Association for the Advancement of Animal Breeding and Genetics*, pp. 47–50. Adelaide, SA.
- Herd, R. M., Arthur, P. F., Donoghue, K. A., Bird, S. H., Bird-Gardiner, T., and Hegarty, R. S. 2014. Measures of methane production and their phenotypic relationships with dry matter intake, growth, and body composition traits in beef cattle. *Journal of animal science*, 92(11), 5267-5274.

- Herd, R.M., Oddy, V.H., and Richardson, E.C., 2004. Biological basis for variation in residual feed intake in beef cattle. 1. Review of potential mechanisms. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 44, 423–430.
- Hernandez-Sanabria, E., Guan, L. L., Goonewardene, L. A., Li, M., Mujibi, D. F., Stothard, P., and Leon-Quintero, M. C. 2010. Correlation of particular bacterial PCR-denaturing gradient gel electrophoresis patterns with bovine ruminal fermentation parameters and feed efficiency traits. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(19), 6338-6350.
- Hernandez-Sanabria, E., Goonewardene, L. A., Wang, Z., Durunna, O. N., Moore, S. S., and Guan, L. L. 2012. Impact of feed efficiency and diet on adaptive variations in the bacterial community in the rumen fluid of cattle. *Applied and environmental microbiology*, 78(4), 1203-1214.
- Hill, R. A. (Ed.). 2012. *Feed efficiency in the beef industry*. John Wiley & Sons.
- Hocquette, J. F., Ellies-Oury, M. P., Lherm, M., Pineau, C., Deblitz, C., and Farmer, L. 2018. Current situation and future prospects for beef production in Europe—A review. *Asian-Australasian journal of animal sciences*, 31(7), 1017.
- Hof, G., Vervoorn, M.D., Lenaers, P.J., and Tamminga, S., 1997. Milk Urea Nitrogen as a Tool to Monitor the Protein Nutrition of Dairy Cows. *Journal of Dairy Science* 80, 3333–3340.
- Hoover, W. H., and Stokes, S. R. 1991. Balancing carbohydrates and proteins for optimum rumen microbial yield. *Journal of dairy science*, 74(10), 3630-3644.
- Hristov, A.N., Bannink, A., Crompton, L.A., Huhtanen, P., Kreuzer, M., McGee, M., Nozière, P., Reynolds, C.K., Bayat, A.R., Yáñez-Ruiz, D.R., Dijkstra, J., Kebreab, E., Schwarm, A., Shingfield, K.J., and Yu, Z., 2019. Invited review: Nitrogen in ruminant nutrition: A review of measurement techniques. *Journal of Dairy Science* 102, 5811–5852.
- Huber, J. T., and Kung Jr, L. 1981. Protein and nonprotein nitrogen utilization in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 64(6), 1170-1195.
- Huhtanen, P., Cabezas-Garcia, E.H., Krizsan, S.J., and Shingfield, K.J., 2015. Evaluation of between-cow variation in milk urea and rumen ammonia nitrogen concentrations and the association with nitrogen utilization and diet digestibility in lactating cows. *Journal of Dairy Science* 98, 3182–3196.
- Hunter, T., 2000. Signaling - 2000 and beyond. *Cell* 100, 113–127.
- Hunter, R.A., and Vercoe, J.E., 1987. Reduction of energy requirements of steers fed on low-quality-roughage diets using trenbolone acetate. *British Journal of Nutrition* 58, 477–483.
- Huntington, G. B. 1982. Portal blood flow and net absorption of ammonia-nitrogen, urea-nitrogen, and glucose in nonlactating Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, 65(7), 1155-1162.
- Huntington, G.B., and Archibeque, S.L., 1999. Practical aspects of urea and ammonia metabolism in ruminants Hemp as a feedstuff for production animals View project Professor Emeritus View project. In *American Society of Animal Science*, North Carolina State University, Raleigh.
- Huntington, G. B., Harmon, D. L., and Richards, C. J. 2006. Sites, rates, and limits of starch digestion and glucose metabolism in growing cattle. *Journal of animal science*, 84(suppl_13), E14-E24.
- Institute de l'élevage. 2018. Résultats 2018 des élevages BV suivis par Bovins Croissance. Publié le 11/12/2019 par Philippe Dimon, Aurélie Blachon, Bénilde Lomelet, Didier Oden, Christophe Lecomte, France Conseil Elevage.

- Institute de l'élevage. 2020. Chiffres-clés Bovins 2020. Productions Bovines lait et viande. Publié le 23/09/2020 par Groupe Economie du Bétail GEB (Institut de l'Élevage)
- Iliuk, A., Li, L., Melesse, M., Hall, M.C., and Tao, W.A., 2016. Multiplexed Imaging of Protein Phosphorylation on Membranes Based on TiIV Functionalized Nanopolymers. *Chembiochem : a European journal of chemical biology* 17, 903.
- INRA, 2018. INRA feeding system for ruminants. Wageningen Academic Publishers.
- Ipharraguerre, I. R., and Clark, J. H. 2005. Impacts of the source and amount of crude protein on the intestinal supply of nitrogen fractions and performance of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 88, E22-E37.
- Jenny, B.F., and Polan, C.E., 1975. Postprandial Blood Glucose and Insulin in Cows Fed High Grain. *Journal of Dairy Science* 58, 512–514.
- Johnson, B.J., Anderson, P.T., Meiske, J.C., and Dayton, W.R., 1996. Effect of a combined trenbolone acetate and estradiol implant on feedlot performance, carcass characteristics, and carcass composition of feedlot steers. *Journal of Animal Science* 74, 363–371.
- Johnson, T. A., Sylte, M. J., and Looft, T. 2019. In-feed bacitracin methylene disalicylate modulates the turkey microbiota and metabolome in a dose-dependent manner. *Scientific reports*, 9(1), 1-11.
- Johnson, D.E., Ferrell, C.L., and Jenkins, T.G., 2003. The history of energetic efficiency research: Where have we been and where are we going? *Journal of Animal Science* 81, E27–E38.
- Jones, S. J., Starkey, D. L., Calkins, C. R., and Crouse, J. D. 1990. Myofibrillar protein turnover in feed-restricted and realimented beef cattle. *Journal of Animal Science*, 68(9), 2707-2715.
- Jonker, J.S., Kohn, R.A., and Erdman, R.A., 1998. Using Milk Urea Nitrogen to Predict Nitrogen Excretion and Utilization Efficiency in Lactating Dairy Cows. *Journal of Dairy Science* 81, 2681–2692.
- Jorge-Smeding, E., Renand, G., Centeno, D., Pétéra, M., Durand, S., Polakof, S., and Cantalapedra-Hijar, G., 2019. Metabolomics reveals changes in urea cycle associated to residual feed intake in growing heifers. In *International Symposium on Energy and Protein Metabolism and Nutrition (ISEP)*. Belo Horizonte Brazil.
- Jorge-Smeding, E., Bonnet, M., Renand, G., Taussat, S., Graulet, B., Ortigues-Marty, I., and Cantalapedra-Hijar, G., 2021. Common and diet-specific metabolic pathways underlying residual feed intake in fattening Charolais yearling bulls. *Scientific Reports*, 11(1), 1-13.
- Kause, A., Tobin, D., Houlihan, D. F., Martin, S. A. M., Mantysaari, E. A., Ritola, O., and Ruohonen, K. 2006. Feed efficiency of rainbow trout can be improved through selection: different genetic potential on alternative diets. *Journal of Animal Science*, 84(4), 807-817.
- Kelly, A., McGee, M., Crews, Jr.D.H., Fahey, A., Wylie, A., and Kenny, D., 2010. Effect of divergence in residual feed intake on feeding behavior, blood metabolic variables, and body composition traits in growing beef heifers. *Journal of Animal Science* 88, 109–123.
- Kenny, D.A., Fitzsimons, C., Waters, S.M., and McGee, M., 2018. Invited review: Improving feed efficiency of beef cattle - The current state of the art and future challenges. *Animal* 12, 1815–1826.
- Kerth, C.R., Montgomery, J.L., Morrow, K.J., Galyean, M.L., and Miller, M.F., 2003. Protein turnover and sensory traits of longissimus muscle from implanted and nonimplanted heifers. *Journal of Animal Science* 81, 1728–1735.

- Kidane, A., Øverland, M., Mydland, L. T., and Prestløkken, E. 2018. Interaction between feed use efficiency and level of dietary crude protein on enteric methane emission and apparent nitrogen use efficiency with Norwegian Red dairy cows. *Journal of Animal Science*, 96(9), 3967-3982.
- Kirschke, H., Langner, J., Wiederanders, B., Ansorge, S., and Bohley, P. 1979. The role of cathepsins L and H from rat liver lysosomes in protein degradation. In *Processing and Turnover of Proteins and Organelles in the Cell* (pp. 107-115). Pergamon.
- Klasing, K. C., and Calvert, C. C. 1999. The care and feeding of an immune system: an analysis of lysine needs. *PUBLICATION-EUROPEAN ASSOCIATION FOR ANIMAL PRODUCTION*, 96, 253-264.
- Koch, R.M., Swiger, L.A., Chambers, D., and Gregory, K.E., 1962. Efficiency of Feed Use in Beef Cattle. *Journal of Animal Science* 22, 486–494.
- Kohn, R.A., Dinneen, M.M., and Russek-Cohen, E., 2005. Using blood urea nitrogen to predict nitrogen excretion and efficiency of nitrogen utilization in cattle, sheep, goats, horses, pigs, and rats 1. *Journal of Animal Science* 83, 879–889.
- Kong, R. S., Liang, G., Chen, Y., Stothard, P., and Guan, L. L. 2016. Transcriptome profiling of the rumen epithelium of beef cattle differing in residual feed intake. *BMC genomics*, 17(1), 1-16.
- Krogh, M.A., Hostens, M., Salavati, M., Grelet, C., Sorensen, M.T., Wathes, D.C., Ferris, C.P., Marchitelli, C., Signorelli, F., Napolitano, F., Becker, F., Larsen, T., Matthews, E., Carter, F., Vanlierde, A., Opsomer, G., Gengler, N., Dehareng, F., Crowe, M.A., Ingvarsten, K.L., and Foldager, L., 2019. Between- And within-herd variation in blood and milk biomarkers in Holstein cows in early lactation. *Animal* 14, 1067–1075.
- Kronfeld, D. S. 1982. Major metabolic determinants of milk volume, mammary efficiency, and spontaneous ketosis in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 65(11), 2204-2212.
- Korver, S. 1988. Genetic aspects of feed intake and feed efficiency in dairy cattle: a review. *Livestock Production Science*, 20(1), 1-13.
- Lahart, B., Prendiville, R., Buckley, F., Kennedy, E., Conroy, S.B., Boland, T.M., and McGee, M., 2020. The repeatability of feed intake and feed efficiency in beef cattle offered high-concentrate, grass silage and pasture-based diets. *Animal* 14, 2288–2297.
- Laisse, S., Baumont, R., Dusart, L., Gaudré, D., Rouillé, B., BeNOIT, M., and PeYRAUD, J. L. 2019. L'efficience nette de conversion des aliments par les animaux d'élevage: une nouvelle approche pour évaluer la contribution de l'élevage à l'alimentation humaine. *INRA Productions Animales*, 31(3), 269-288.
- Lansard, M., Panserat, S., Seiliez, I., Polakof, S., Plagnes-Juan, E., Geurden, I., Médale, F., Kaushik, S., Ve Corraze, G., and Skiba-Cassy, S., 2009. Hepatic protein kinase B (Akt)-target of rapamycin (TOR)-signalling pathways and intermediary metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) are not significantly affected by feeding plant-based diets. *British Journal of Nutrition* 102, 1564–1573.
- Lancaster, P. A., Carstens, G. E., Michal, J. J., Brennan, K. M., Johnson, K. A., and Davis, M. E. 2014. Relationships between residual feed intake and hepatic mitochondrial function in growing beef cattle. *Journal of animal science*, 92(7), 3134-3141.

- Lapierre, H., Blouin, J. P., Bernier, J. F., Reynolds, C. K., Dubreuil, P., and Lobley, G. E. 2002. Effect of supply of metabolizable protein on whole body and splanchnic leucine metabolism in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 85(10), 2631-2641.
- Lapierre, H., Berthiaume, R., Raggio, G., Thivierge, M.C., Doepel, L., Pacheco, D., Dubreuil, P., and Lobley, G.E., 2005. The route of absorbed nitrogen into milk protein. *Animal Science* 80, 11–22.
- Lapierre, H., and Lobley, G. E. 2001. Nitrogen recycling in the ruminant: A review. *Journal of Dairy Science*, 84, E223-E236.
- Lapierre, H., Berthiaume, R., Raggio, G., Thivierge, M. C., Doepel, L., Pacheco, D., and Lobley, G. E. 2005. The route of absorbed nitrogen into milk protein. *Animal Science*, 80(1), 11-22.
- Lapierre, H., Pacheco, D., Berthiaume, R., Ouellet, D.R., Schwab, C.G., Dubreuil, P., Holtrop, G., and Lobley, G.E., 2006. What is the True Supply of Amino Acids for a Dairy Cow? *Journal of Dairy Science* 89, E1–E14.
- Laplante, M., and Sabatini, D.M., 2009. mTOR signaling at a glance. *Journal of Cell Science* 122, 3589–3594.
- Lebzien, P., Riemeier, A., and Flachowsky, G., 2006. Investigations on the effect of the ruminal N-balance on rumen metabolism, urea content in blood serum and milk as well as some liver parameters of lactating cows. *Archives of animal nutrition* 60, 99–109.
- Lesschen, J. P., van den Berg, M., Westhoek, H. J., Witzke, H. P., and Oenema, O. 2011. Greenhouse gas emission profiles of European livestock sectors. *Animal Feed Science and Technology*, 166, 16-28.
- Lescoat, P., Sauvant, D., and Danfaer, A. 1996. Quantitative aspects of blood and amino acid flows in cattle. *Reproduction Nutrition Development*, 36(2), 137-174.
- Lescoat, P., Sauvant, D., Danfaer, A., and Sauvant, D., 1997. Quantitative aspects of protein fractional synthesis rates in ruminants. *Reproduction Nutrition Development* 37, 493–515.
- Le Naou, T., Le Floc'H, N., Louveau, I., Gilbert, H., and Gondret, F. 2012. Metabolic changes and tissue responses to selection on residual feed intake in growing pigs. *Journal of animal science*, 90(13), 4771-4780.
- Lindsay, J. A., Davies, H. L., and Leibholz, J. 1983. The digestion of barley-based diets by cattle: the effect of feeding of three diets containing different amounts of formaldehyde-treated soybean meal. *Australian Journal of Agricultural Research*, 34(6), 809-823.
- Lindsay, D. B., and Chris Reynolds. 2005. Metabolism of the portal-drained viscera and liver. 311-344.
- Lines, D.S., Pitchford, W.S., Bottema, C.D.K., Herd, R.M., and Oddy, V.H., 2014. Selection for residual feed intake affects appetite and body composition rather than energetic efficiency. *Animal Production Science* 58, 175–184.
- Ling, J. R., and Armstead, I. P. 1995. The in vitro uptake and metabolism of peptides and amino acids by five species of rumen bacteria. *Journal of Applied Bacteriology*, 78(2), 116-124.

- Liu, E., and VandeHaar, M.J., 2020. Relationship of residual feed intake and protein efficiency in lactating cows fed high- or low-protein diets. *Journal of Dairy Science* 103, 3177–3190.
- Lobley, G. E., Milne, V., Lovie, J. M., Reeds, P. J., and Pennie, K. 1980. Whole body and tissue protein synthesis in cattle. *British Journal of Nutrition*, 43(3), 491-502.
- Lobley, G. E., Harris, P. M., Skene, P. A., Brown, D., Milne, E., Calder, A. G., and Connell, A. 1992. Responses in tissue protein synthesis to sub-and supra-maintenance intake in young growing sheep: comparison of large-dose and continuous-infusion techniques. *British Journal of Nutrition*, 68(2), 373-388.
- Lobley, G. E., Connell, A., Milne, E., and Ewing, T. A. 1994. Protein synthesis in splanchnic tissues of sheep offered two levels of intake. *British Journal of Nutrition*, 71(1), 3-12.
- Lobley, G. E., Connell, A., Lomax, M. A., Brown, D. S., Milne, E., Calder, A. G., and Farningham, D. A. H. 1995. Hepatic detoxification of ammonia in the ovine liver: possible consequences for amino acid catabolism. *British Journal of Nutrition*, 73(5), 667-685.
- Lobley, G. E., and Milano, G. D. 1997. Regulation of hepatic nitrogen metabolism in ruminants. *Proceedings of the Nutrition Society*, 56(2), 547-563.
- Lobley, G., 1998. Nutritional and hormonal control of muscle and peripheral tissue metabolism in farm species. *Livestock Production Science* 56, 91–114.
- Lobley, G. E., Milano, G. D., and Van der Walt, J. G. 2000. The liver: Integrator of nitrogen metabolism. *Ruminant Physiology: Digestion, Metabolism, Growth, and Reproduction*. Editor PB Cronje, p149-168.
- Lobley, G.E., 2003. Protein turnover-what does it mean for animal production? *Can. J. Anim. Sci.* 87, 327–340.
- Lobley, G.E., Connell, A., Lomax, M.A., Brown, D.S., Milne, E., Calder, A.G., and Farningham, D.A.H., 1995. Hepatic detoxification of ammonia in the ovine liver: possible consequences for amino acid catabolism. *British Journal of Nutrition* 73, 667–685.
- Lobley, G.E., Harris, A.M., and Anderson, S.E., 1992. Responses in tissue protein synthesis to sub- and supra-maintenance intake in young growing sheep: comparison of large-dose and continuous-infusion techniques. *British Journal of Animal Nutrition* 68, 373–388.
- Lobley, G.E., Sinclair, K.D., Grant, C.M., Miller, L., Mantle, D., Calder, A.G., Warkup, C.C., Maltin, C.A., and Lobley, G.E., 2000. The effects of breed and level of nutrition on whole-body and muscle protein metabolism in pure-bred Aberdeen Angus and Charolais beef steers. *British Journal of Nutrition* 84, 275–284.
- Loncke, C., Nozière, P., Vernet, J., Lapierre, H., Bahloul, L., Al-Jammas, M., Sauvant, D., and Ortigues-Marty, I., 2020. Net hepatic release of glucose from precursor supply in ruminants: a meta-analysis. *Animal* 14, 1422–1437.
- Lonergan, E. H., Zhang, W., and Lonergan, S. M. 2010. Biochemistry of postmortem muscle—Lessons on mechanisms of meat tenderization. *Meat science*, 86(1), 184-195.
- Lorenzen, C.L., Koohmaraie, M., Fiorotto, M.L., Lorenzen, C.L., Koohmaraie, M., Shackelford, S.D., Jahoor, F., Freetly, H.C., Wheeler, T.L., Savell, J.W., and Fiorotto, M.L., 2000. Protein kinetics in

- callipyge lambs Protein kinetics in callipyge lambs 1,2. Article in *Journal of Animal Science* 78, 78–87.
- Lovarelli, D., Bacenetti, J., and Guarino, M., 2020. A review on dairy cattle farming: Is precision livestock farming the compromise for an environmental, economic and social sustainable production? *Journal of Cleaner Production* 262, 121409.
- Luo, Q. J., Maltby, S. A., Lobley, G. E., Calder, A. G., and Lomax, M. A. 1995. The effect of amino acids on the metabolic fate of $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ in isolated sheep hepatocytes. *European Journal of Biochemistry*, 228(3), 912-917.
- MacRae, J. C., Bruce, L. A., Brown, D. S., and Calder, A. G. 1997. Amino acid use by the gastrointestinal tract of sheep given lucerne forage. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 273(6), G1200-G1207.
- Makkar, H., and Beever, D., 2012. Optimization of feed use efficiency in ruminants production systems, 67.
- Malmuthuge, N., and Guan, L. L. 2017. Understanding host-microbial interactions in rumen: searching the best opportunity for microbiota manipulation. *Journal of animal science and biotechnology*, 8(1), 1-7.
- Manafiazar, G., Goonewardene, L., Miglior, F., Crews, D. H., Basarab, J. A., Okine, E., and Wang, Z. 2016. Genetic and phenotypic correlations among feed efficiency, production and selected conformation traits in dairy cows. *Animal*, 10(3), 381-389.
- Mann, G. E., Yudilevich, D. L., and Sobrevia, L. 2003. Regulation of amino acid and glucose transporters in endothelial and smooth muscle cells. *Physiological reviews*, 83(1), 183-252.
- McBride, B. W., and Kelly, J. M. 1990. Energy cost of absorption and metabolism in the ruminant gastrointestinal tract and liver: a review. *Journal of Animal Science*, 68(9), 2997-3010.
- McCarthy, F.D., Bergen, W.G., and Hawkins, D.R., 1983. Muscle protein turnover in cattle of differing genetic backgrounds as measured by urinary N tau-methylhistidine excretion. *The Journal of nutrition* 113, 2455–2463.
- McDonagh, M. B., Herd, R. M., Richardson, E. C., Oddy, V. H., Archer, J. A., and Arthur, P. F. 2001. Meat quality and the calpain system of feedlot steers following a single generation of divergent selection for residual feed intake. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 41(7), 1013-1021.
- McDonald, I. W. 1948. The absorption of ammonia from the rumen of the sheep. *Biochemical Journal*, 42(4), 584.
- McNurlan, M.A., and Garlick, P.J., 1989. Influence of nutrient intake on protein turnover. *Diabetes / Metabolism Reviews* 5, 165–189.
- Merchen, N.R., Firkins, J.L., and Berger, L.L., 1986. Effect of intake and forage level on ruminal turnover rates, bacterial protein synthesis and duodenal amino acid flows in sheep. *Journal of Animal Science* 62, 216–225.
- Metzger, M. B., Hristova, V. A., and Weissman, A. M. 2012. HECT and RING finger families of E3 ubiquitin ligases at a glance. *Journal of cell science*, 125(3), 531-537.
- Mitch, W.E., Jurkowitz, C., and England, B.K., 1993. Mechanisms That Cause Protein and Amino Acid Catabolism in Uremia. *American Journal of Kidney Diseases* 21, 91–95.

- Montanholi, Y. R., Swanson, K. C., Schenkel, F. S., McBride, B. W., Caldwell, T. R., and Miller, S. P. 2009. On the determination of residual feed intake and associations of infrared thermography with efficiency and ultrasound traits in beef bulls. *Livestock Science*, 125(1), 22-30.
- Mottet, A., de Haan, C., Falcucci, A., Tempio, G., Opio, C., and Gerber, P., 2017. Livestock: On our plates or eating at our table? A new analysis of the feed/food debate. *Global Food Security* 14, 1–8.
- Moule, S. K., Welsh, G. I., Edgell, N. J., Foulstone, E. J., Proud, C. G., and Denton, R. M. 1997. Regulation of protein kinase B and glycogen synthase kinase-3 by insulin and β -adrenergic agonists in rat epididymal fat cells: activation of protein kinase B by wortmannin-sensitive and-insensitive mechanisms. *Journal of Biological Chemistry*, 272(12), 7713-7719.
- Mpetile, Z., Young, J. M., Gabler, N. K., Dekkers, J. C. M., and Tuggle, C. K. 2015. Assessing peripheral blood cell profile of Yorkshire pigs divergently selected for residual feed intake. *Journal of animal science*, 93(3), 892-899.
- Mrode, R. A., Smith, C., and Thompson, R. 1990. Selection for rate and efficiency of lean gain in Hereford cattle. 2. Evaluation of correlated responses. *Animal Science*, 51(1), 35-46.
- Müller, M.J., and Geisler, C., 2017. From the past to future: from energy expenditure to energy intake to energy expenditure. *European Journal of Clinical Nutrition* 71, 358–364.
- Munro, J. C., Physick-Sheard, P. W., Pyle, W. G., Schenkel, F. S., Miller, S. P., and Montanholi, Y. R. 2019. Cardiac function and feed efficiency: Increased right-heart workload in feed inefficient beef cattle. *Livestock Science*, 229, 159-169.
- Nath, K., and Koch, A. L. 1970. Protein degradation in *Escherichia coli*: I. Measurement of rapidly and slowly decaying components. *Journal of Biological Chemistry*, 245(11), 2889-2900.
- Nichols, K., Dijkstra, J., van Laar, H., Pacheco, S., van Valenberg, H.J., and Bannink, A., 2019. Energy and nitrogen partitioning in dairy cows at low or high metabolizable protein levels is affected differently by postrumen glucogenic and lipogenic substrates. *Journal of Dairy Science* 102, 395–412.
- Nkrumah, J. D., Okine, E. K., Mathison, G. W., Schmid, K., Li, C., Basarab, J. A., and Moore, S. S. 2006. Relationships of feedlot feed efficiency, performance, and feeding behavior with metabolic rate, methane production, and energy partitioning in beef cattle. *Journal of animal science*, 84(1), 145-153.
- Novais, F.J., Pires, P.R.L., Alexandre, P.A., Dromms, R.A., Iglesias, A.H., Ferraz, J.B.S., Styczynski, MP-W., and Fukumasu, H., 2019. Identification of a metabolomic signature associated with feed efficiency in beef cattle. *BMC Genomics* 20:1 20, 1–10.
- Noziere, P., Sauvant, D., and Delaby, L. 2018. INRA feeding system for ruminants (pp. 640-p). Wageningen Academic Publishers.
- National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine. 2016. Nutrient requirements of beef cattle.
- Obled, C., Papet, I., and Breuillé, D. 2002. Metabolic bases of amino acid requirements in acute diseases. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 5(2), 189-197.
- OCDE, F. (2017). CARNE Situación del mercado. Oede Fao Perspectivas Agrícolas, 1-15.
- O'Connell, K. L., and Stults, J. T. 1997. Identification of mouse liver proteins on two-dimensional electrophoresis gels by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of in situ enzymatic digests. *Electrophoresis*, 18(3-4), 349-359.

- Oddy, V. H., Gooden, J. M., and Annison, E. F., 1984. Partitioning of nutrients in Merino ewes. I. Contribution of skeletal muscle, the pregnant uterus and the lactating mammary gland to total energy expenditure. *Australian Journal of Biological Sciences*, 37(5-6), 375-388.
- Oddy, V. H., Herd, R. M., McDonagh, M. B., Woodgate, R., Quinn, C. A., and Zirkler, K. 1998. Effect of divergent selection for yearling growth rate on protein metabolism in hind-limb muscle and whole body of Angus cattle. *Livestock Production Science*, 56(3), 225-231.
- Oddy, V.H., and Richardson, E.C., 2004. Biological basis for variation in residual feed intake in beef cattle. 1. Review of potential mechanisms. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 44, 423–430.
- Oddy, V.H., Speck, P.A., Warren, H.M., and Wynn, P.C., 1995. Protein metabolism in lambs from lines divergently selected for weaning weight. *The Journal of Agricultural Science* 124, 129–137.
- Odessey, R., Khairallah, E. A., and Goldberg, A. L. 1974. Origin and possible significance of alanine production by skeletal muscle. *Journal of Biological Chemistry*, 249(23), 7623-7629.
- Or-Rashid, M. M., Odongo, N. E., and McBride, B. W. 2007. Fatty acid composition of ruminal bacteria and protozoa, with emphasis on conjugated linoleic acid, vaccenic acid, and odd-chain and branched-chain fatty acids. *Journal of animal science*, 85(5), 1228-1234.
- Ortigue-Marty, I., Cantalapiedra-Hijar, G., Vernet, J., and Nozière, P., 2017. De l'énergie de la ration à l'utilisation des nutriments chez les ruminants : quel rôle pour les tissus splanchniques ? *Cahiers de Nutrition et de Dietétique* 52, 45–53.
- Ortigue, I., and Doreau, M., 1995. Responses of the splanchnic tissues of ruminants to changes in intake: absorption of digestion end products, tissue mass, metabolic activity and implications to whole animal energy metabolism * I. *Annales Zootechnie* 44, 321–346.
- Oltjen, J. W., Bywater, A. C., Baldwin, R. L., and Garrett, W. N. 1986. Development of a dynamic model of beef cattle growth and composition. *Journal of animal science*, 62(1), 86-97.
- Ouellet, D. R., Demers, M., Zuur, G., Lobley, G. E., Seoane, J. R., Nolan, J. V., and Lapierre, H. 2002. Effect of dietary fiber on endogenous nitrogen flows in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 85(11), 3013-3025.
- Parsons, I. L., Johnson, J. R., Kayser, W. C., Tedeschi, L. O., and Carstens, G. E. 2020. Characterization of feeding behavior traits in steers with divergent residual feed intake consuming a high-concentrate diet. *Journal of Animal Science*, 98(7), skaa189.
- Parsons, C. T., Dafoe, J. M., Wyffels, S. A., DelCurto, T., and Boss, D. L. 2021. The Influence of Residual Feed Intake and Cow Age on Beef Cattle Performance, Supplement Intake, Resource Use, and Grazing Behavior on Winter Mixed-Grass Rangelands. *Animals*, 11(6), 1518.
- Pasiakos, S. M., and McClung, J. P. 2011. Supplemental dietary leucine and the skeletal muscle anabolic response to essential amino acids. *Nutrition reviews*, 69(9), 550-557.
- Pengpeng, W., and Tan, Z. 2013. Ammonia assimilation in rumen bacteria: a review. *Animal biotechnology*, 24(2), 107-128.
- Peyraud, J. L., and MacLeod, M. 2020. Future of EU Livestock—How to Contribute to a Sustainable Agricultural Sector. Final Report. Directorate-General for Agriculture and Rural Development (European Commission): Brussels, Belgium, 82.

- Pope, P. B., Smith, W., Denman, S. E., Tringe, S. G., Barry, K., Hugenholtz, P., and Morrison, M. 2011. Isolation of Succinivibrionaceae implicated in low methane emissions from Tammur wallabies. *Science*, 333(6042), 646-648.
- Poppi, D. P., and McLennan, S. R. 1995. Protein and energy utilization by ruminants at pasture. *Journal of animal science*, 73(1), 278-290.
- Prior, R.L., 1981. Influence of Diet on Amino Acid Absorption in Beef Cattle and Sheep¹. *British journal of nutrition* 23, 2212–2222.
- Rakhshandeh, A., Dekkers, J. C., Kerr, B. J., Weber, T. E., English, J., and Gabler, N. K. 2012. Effect of immune system stimulation and divergent selection for residual feed intake on digestive capacity of the small intestine in growing pigs. *Journal of animal Science*, 90(suppl_4), 233-235.
- Raggio, G., Lobley, G. E., Berthiaume, R., Pellerin, D., Allard, G., Dubreuil, P., and Lapierre, H. 2007. Effect of protein supply on hepatic synthesis of plasma and constitutive proteins in lactating dairy cows. *Journal of dairy science*, 90(1), 352-359.
- Rauw, W.M., 2012. Feed efficiency and animal robustness. In *Feed Efficiency in the Beef Industry* (ed. Rodney A. Hill), pp. 105–122.
- Rauw, W., Kanis, E., Noordhuizen-Stassen, E., and Grommers, F., 1998. Undesirable side effects of selection for high production efficiency in farm animals: a review. *Livestock Production Science* 56, 15–33.
- Rechcigl, M. 1971. Intracellular protein turnover and the roles of synthesis and degradation in regulation of enzyme levels. In *Enzyme synthesis and degradation in mammalian systems* (pp. 236-310). Karger Publishers.
- Reeds, P. J., and Lobley, G. E. 1980. Protein synthesis: are there real species differences?. *Proceedings of the Nutrition Society*, 39(1), 43-52.
- Reeds, P.J., and Fuller, M.F., 1983. Nutrient intake and protein turnover. *Proceedings of the Nutrition Society* 42, 463–471.
- Reeds, P.J., Fuller, M.F., Cadenhead, A., Lobley, G.E., and McDonald, J.D., 1981. Effects of changes in the intakes of protein and non-protein energy on whole-body protein turnover in growing pigs. *British journal of nutrition* 45, 539–546.
- Remond, D., Meschy, F., and Boivin, R. 1996. Metabolites, water and mineral exchanges across the rumen wall: mechanisms and regulation. In *Annales de zootechnie* (Vol. 45, No. 2, pp. 97-119).
- Renand, G., and Krauss, D., 2002. Genetic relationship between fattening and slaughter traits in pure bred Charolais young bulls. In *Proceedings of the 7th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production*, pp. 0–4. Montpellier, France.
- Renand, G., Picard, B., Touraille, C., Berge, P., and Lepetit, J., 2001. Relationships between muscle characteristics and meat quality traits of young Charolais bulls. *Meat Science* 59, 49–60.
- Rennie, M. J. 1985. Muscle protein turnover and the wasting due to injury and disease. *British Medical Bulletin*, 41(3), 257-264.
- Reynolds, C. K., Huntington, G. B., Tyrrell, H. F., and Reynolds, P. J. 1988. Net portal-drained visceral and hepatic metabolism of glucose, L-lactate, and nitrogenous compounds in lactating Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, 71(7), 1803-1812.

- Reynolds, C. K., Tyrrell, H. F., and Reynolds, P. J. 1991. Effects of diet forage-to-concentrate ratio and intake on energy metabolism in growing beef heifers: whole body energy and nitrogen balance and visceral heat production. *The Journal of nutrition*, 121(7), 994-1003.
- Reynolds, C. K. 1995. Quantitative aspects of liver metabolism in ruminants. *Ruminant physiology: digestion, metabolism, growth and reproduction*.
- Reynolds, C.K., 2006. Splanchnic Metabolism of Amino Acids in Ruminants. In *Ruminant Physiology. Digestion, metabolism and impact of nutrition on gene expression, immunology and stress.*, pp. 225–248. Academic Publishers, The Netherlands, Wageningen.
- Richards, M.P., and Proszkowiec-Weglarz, M., 2007. Mechanisms Regulating Feed Intake, Energy Expenditure, and Body Weight in Poultry. *Poultry Science* 86, 1478–1490.
- Richardson, E. C., Herd, R. M., Arthur, P. F., Wright, J., Xu, G., Dibley, K., and Oddy, V. H. 1996. Possible physiological indicators for net feed conversion efficiency in beef cattle. In *Proceedings-Australian Society Of Animal Production (Vol. 21, pp. 103-106)*. AUSTRALIAN SOCIETY OF ANIMAL PRODUCTION.
- Richardson, E. C., Herd, R. M., Oddy, V. H., Thompson, J. M., Archer, J. A., and Arthur, P. F. 2001. Body composition and implications for heat production of Angus steer progeny of parents selected for and against residual feed intake. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 41(7), 1065-1072.
- Richardson, E.C., Herd, B.R.M., Archer, J.A., and Arthur, P.F., 2004. Metabolic differences in Angus steers divergently selected for residual feed intake. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 44, 441–452.
- Rivera-Ferre, M.G., Aguilera, J.F., and Nieto, R., 2006. Differences in whole-body protein turnover between Iberian and Landrace pigs fed adequate or lysine-deficient diets. *Journal of Animal Science* 84, 3346–3355.
- Robelin, J., Geay, Y., and Béranger, C. 1975. Estimation de la composition chimique des carcasses de jeunes bovins mâles a partir de la proportion de dépôts adipeux d'un morceau monocostal prélevé au niveau de la 11e côte. In *Annales de zootechnie (Vol. 24, No. 2, pp. 323-326)*.
- Robelin, J., Geay, Y., Jailler, R., and Cuyllé, G. 1975. ESTIMATION DE LA COMPOSITION DES CARCASSES DE JEUNES BOVINS A PARTIR DE LA COMPOSITION D'UN MORCEAU MONOCOSTAL PRÉLEVÉ AU NIVEAU DE LA 11e CÔTE. I.--COMPOSITION ANATOMIQUE DE LA CARCASSE. In *Annales de Zootechnie (Vol. 24, No. 3, pp. 391-402)*.
- Roberts, R. 2005. Lysosomal cysteine proteases: structure, function and inhibition of cathepsins. *Drug News Perspect*, 18(10), 605-614.
- Russell, J. B., O'connor, J. D., Fox, D. G., Van Soest, P. J., and Sniffen, C. J. 1992. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: I. Ruminant fermentation. *Journal of animal science*, 70(11), 3551-3561.
- Ruvinsky, I., and Meyuhas, O., 2006. Ribosomal protein S6 phosphorylation: from protein synthesis to cell size. *Trends in Biochemical Sciences* 31, 342–348.
- Ryan, K.E., Glister, C., Lonergan, P., Martin, F., Knight, P.G., and Evans, A.C., 2008. Functional significance of the signal transduction pathways Akt and Erk in ovarian follicles: in vitro and in vivo studies in cattle and sheep. *Journal of Ovarian Research* 1, 1–13.

- Sans, P., and Combris, P. 2016. Corrigendum to " World meat consumption patterns: An overview of the last fifty years (1961-2011)"[Meat Science, Vol. 109 (2015), 106-111]. Meat science, 114, 154.
- Santos, I. R., Cook, P. L., Rogers, L., Weys, J. D., and Eyre, B. D. 2012. The "salt wedge pump": Convection-driven pore-water exchange as a source of dissolved organic and inorganic carbon and nitrogen to an estuary. *Limnology and Oceanography*, 57(5), 1415-1426.
- Sève, B., and Ponter, A. A. 1997. Nutrient-hormone signals regulating muscle protein turnover in pigs. *Proceedings of the Nutrition Society*, 56(2), 565-580.
- Sauvant, D., and Nozière, P. 2016. Quantification of the main digestive processes in ruminants: the equations involved in the renewed energy and protein feed evaluation systems. *animal*, 10(5), 755-770.
- Schroeder, G. F., and Titgemeyer, E. C. 2008. Interaction between protein and energy supply on protein utilization in growing cattle: a review. *Livestock science*, 114(1), 1-10.
- Schoenheimer, R. 1942. The dynamic state of body constituents. *The Dynamic State of Body Constituents*, (3).
- Shafer, G.L., 2011. Insulin sensitivity in tropically adapted cattle with divergent residual feed intake. Texas A&M University, Columbia.
- Simpson, J. R., and Conrad, J. H. 1993. Intensification of cattle production systems in Central America: Why and when. *Journal of Dairy science*, 76(6), 1744-1752.
- Sinnett-Smith, P.A., Dumelow, N.W., and Buttery, P.J., 1983. Effects of trenbolone acetate and zeranol on protein metabolism in male castrate and female lambs. *British Journal of Nutrition* 50, 225–234.
- Smith, J., Pearce, B. D., and Wolfe, M. S. 2012. A European perspective for developing modern multi-functional agroforestry systems for sustainable intensification. *Renewable Agriculture and Food Systems*, 27(4), 323-332.
- Smith, G. I., Yoshino, J., Stromsdorfer, K. L., Klein, S. J., Magkos, F., Reeds, D. N., and Mittendorfer, B. 2015. Protein ingestion induces muscle insulin resistance independent of leucine-mediated mTOR activation. *Diabetes*, 64(5), 1555-1563.
- Souba, W. W., and Pacitti, A. J. 1992. How amino acids get into cells: mechanisms, models, menus, and mediators. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 16(6), 569-578.
- Spek, J.W., Dijkstra, J., Van Duinkerken, G., and Bannink, A., 2013. A review of factors influencing milk urea concentration and its relationship with urinary urea excretion in lactating dairy cattle. *Journal of Agricultural Science* 151, 407–423.
- Stallcup, O.T., Davis, G.V., and Shields, L., 1975. Influence of Dry Matter and Nitrogen Intakes on Fecal Nitrogen Losses in Cattle. *Journal of Dairy Science* 58, 1301–1307.
- Steinfeld, H., and Wassenaar, T. 2007. The role of livestock production in carbon and nitrogen cycles. *Annu. Rev. Environ. Resour.*, 32, 271-294.
- Stern, M. D., Varga, G. A., Clark, J. H., Firkins, J. L., Huber, J. T., and Palmquist, D. L. 1994. Evaluation of chemical and physical properties of feeds that affect protein metabolism in the rumen. *Journal of Dairy Science*, 77(9), 2762-2786.

- Storm, E., and Ørskov, E. R. 1983. The nutritive value of rumen micro-organisms in ruminants: 1. Large-scale isolation and chemical composition of rumen micro-organisms. *British Journal of Nutrition*, 50(2), 463-470.
- Storm, E., and Orskov, E. R. 1984. The nutritive value of rumen micro-organisms in ruminants. 4. The limiting amino acids of microbial protein in growing sheep determined by a new approach. *The British Journal of Nutrition*, 52(3), 613-620.
- Suryawan, A., and Davis, T. A., 2014. Regulation of protein degradation pathways by amino acids and insulin in skeletal muscle of neonatal pigs. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 5(1), 1-11.
- Swanson, E.W., 1977. Factors for Computing Requirements of Protein for Maintenance of Cattle. *Journal of Dairy Science* 60, 1583–1593.
- Symonds, H. W., Mather, D. L., and Collis, K. A. 1981. The maximum capacity of the liver of the adult dairy cow to metabolize ammonia. *British Journal of Nutrition*, 46(3), 481-486.
- Tagari, H., and Bergman, E. N. 1978. Intestinal disappearance and portal blood appearance of amino acids in sheep. *The Journal of nutrition*, 108(5), 790-803.
- Tagari, H., Webb Jr, K., Theurer, B., Huber, T., DeYoung, D., Cuneo, P., and Santos, F. 2008. Mammary uptake, portal-drained visceral flux, and hepatic metabolism of free and peptide-bound amino acids in cows fed steam-flaked or dry-rolled sorghum grain diets. *Journal of dairy science*, 91(2), 679-697.
- Tamminga, S. 1979. Protein degradation in the forestomachs of ruminants. *Journal of Animal Science*, 49(6), 1615-1630.
- Tamminga, S., 1992. Nutrition Management of Dairy Cows as a Contribution to Pollution Control. *Journal of Dairy Science* 75, 345–357.
- Tamminga, S. 1996. A review on environmental impacts of nutritional strategies in ruminants. *Journal of Animal Science*, 74(12), 3112-3124.
- Tan, Z., and Murphy, M. R. 2004. Ammonia production, ammonia absorption, and urea recycling in ruminants. A review. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 13(3), 389-404.
- Tauqir, N. A. 2016. Absorption and transportation of amino acids in animals: A review. *Journal of Environmental and Agricultural Sciences*, 9, 96-109.
- Taussat, S., 2020. Étude du déterminisme génétique de l'efficacité alimentaire en bovins allaitants en vue d'une prise en compte dans les évaluations génomiques bovines. université Paris-Saclay, Paris.
- Taussat, S., Saintilan, R., Krauss, D., Maupetit, D., Fouilloux, M.N., and Renand, G., 2019. Relationship between feed efficiency and slaughter traits of french charolais bulls. *Journal of Animal Science* 97, 2308–2319.
- Tavares, M.R., Pavan, I.C.B., Amaral, C.L., Meneguello, L., Luchessi, A.D., and Simabuco, F.M., 2015. The S6K protein family in health and disease. *Life Sciences* 131, 1–10.
- Taylor, st C.S., and Murray, J.I., 1991. Effect of feeding level, breed and milking potential on body tissues and organs of mature, non-lactating cows. *Journal of Animal Science* 53, 27–38.
- Teleni, E. 1993. Catabolism and synthesis of amino acids in skeletal muscle: their significance in monogastric mammals and ruminants. *Australian Journal of Agricultural Research*, 44(3), 443-461.

- Tillman, A. D., and Sidhu, K. S. 1969. Nitrogen metabolism in ruminants: Rate of ruminal ammonia production and nitrogen utilization by ruminants—A review. *Journal of Animal Science*, 28(5), 689-697.
- Tomko Jr, R. J., and Hochstrasser, M. 2013. Molecular architecture and assembly of the eukaryotic proteasome. *Annual review of biochemistry*, 82, 415-445.
- Tolkamp, B., Wall, E., Roehe, R., Newbold, J., and Zaralis, K. 2010. Review of nutrient efficiency in different breeds of farm livestock. Report to DEFRA (IF0183).
- Thomson, D.M., 2018. The Role of AMPK in the Regulation of Skeletal Muscle Size, Hypertrophy, and Regeneration. *International Journal of Molecular Sciences* 19, 3125.
- Tufan, T., Arslan, C., Önk, K., Sari, M., and Tilki, M., 2016. Effects of feeding by hay, grass silage and corn silage on growth performance, rumen fluid and blood serum parameters in beef cattle. *Revue Méd. Vét*, 167, 99-105.
- Tullo, E., Finzi, A., and Guarino, M., 2019. Review: Environmental impact of livestock farming and Precision Livestock Farming as a mitigation strategy. *Science of The Total Environment* 650, 2751–2760.
- Vaintrub, M. O., Levit, H., Chincarini, M., Fusaro, I., Giammarco, M., and Vignola, G. 2021. Precision livestock farming, automats and new technologies: possible applications in extensive dairy sheep farming. *Animal*, 15(3), 100143.
- Vallimont, J. E., Dechow, C. D., Daubert, J. M., Dekleva, M. W., Blum, J. W., Barlieb, C. M., and Baumrucker, C. R. 2011. Heritability of gross feed efficiency and associations with yield, intake, residual intake, body weight, and body condition score in 11 commercial Pennsylvania tie stalls. *Journal of dairy science*, 94(4), 2108-2113.
- Van Bruchem, J., Voight, J., Lammers-Wienhoven, T. S. W., Schönhusen, U., Ketelaars, J. H., and Tamminga, S. 1997. Secretion and reabsorption of endogenous protein along the small intestine of sheep: estimates derived from 15N dilution of plasma non-protein-N. *British Journal of Nutrition*, 77(2), 273-286.
- Vandehaar, M. J., Yousif, G., Sharma, B. K., Herdt, T. H., Emery, R. S., Allen, M. S., and Liesman, J. S. 1999. Effect of energy and protein density of prepartum diets on fat and protein metabolism of dairy cattle in the periparturient period. *Journal of Dairy Science*, 82(6), 1282-1295.
- Verité, and Peyraud, 1989. Protein: the PDI system. In *Ruminant nutrition: recommended allowances and feed tables* (ed. Jarrige), pp. 33–47. John Libbey Eurotext, Paris.
- Vernon, B.G., and Buttery, P.J., 1978. The effect of trenbolone acetate with time on the various responses of protein synthesis of the rat. *British Journal of Nutrition* 40, 563–572.
- Veysset, P., Lherm, M., Boussemart, J. P., and Natier, P. 2019. Generation and distribution of productivity gains in beef cattle farming: Who are the winners and losers between 1980 and 2015?. *animal*, 13(5), 1063-1073.
- Visscher, P. M., Hill, W. G., and Wray, N. R. 2008. Heritability in the genomics era—concepts and misconceptions. *Nature reviews genetics*, 9(4), 255-266.
- Vopálenský, J., Suchý, P., Straková, E., Šimek, F., Macháček, M., and Herzig, I. 2017. Amino acid levels in muscle tissue of eight meat cattle breeds. *Czech Journal of Animal Science*, 62(8), 339-346.

- Volpi, E., Lucidi, P., Cruciani, G., Monacchia, F., Reboldi, G., Brunetti, P., and De Feo, P. 1996. Contribution of amino acids and insulin to protein anabolism during meal absorption. *Diabetes*, 45(9), 1245-1252.
- Waghorn, G. C., and Baldwin, R. L. 1984. Model of metabolite flux within mammary gland of the lactating cow. *Journal of Dairy Science*, 67(3), 531-544.
- Waldo, D.R., 1973. Extent and Partition of Cereal Grain Starch Digestion in Ruminants. *Journal of Animal Science* 37, 1062–1074.
- Waldo, D.R., 1986. Effect of Forage Quality on Intake and Forage-Concentrate Interactions. *Journal of Dairy Science* 69, 617–631.
- Walsh, K., O’Kiely, P., Moloney, A.P., and Boland, T.M., 2008. Intake, performance and carcass characteristics of beef cattle offered diets based on whole-crop wheat or forage maize relative to grass silage or ad libitum concentrates. *Livestock Science* 116, 223–236.
- Wang, Z., Colazo, M.G., Basarab, J.A., Goonewardene, L.A., Ambrose, D.J., Marques, E., Plastow, G., Miller, S.P., and Moore, S.S., 2012. Impact of selection for residual feed intake on breeding soundness and reproductive performance of bulls on pasture-based multisire mating. *Journal of Animal Science* 90, 2963–2969.
- Waterlow, J.C., 1970. Total protein turnover in animals and man. *Nutrition reviews* 28, 115–118.
- Waterlow, J. C., Golden, M. H., and Garlick, P. J. 1978. Protein turnover in man measured with ¹⁵N: comparison of end products and dose regimes. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*, 235(2), E165.
- Waterlow, J.C., 2006a. Protein Turnover. CABI North American Office, Massachusetts.
- Waterlow, J.C., 2006b. The coordination of synthesis and breakdown. In *Protein turnover*, pp. 275–286. CABI.
- Watson, A. K., Nuttelman, B. L., Klopfenstein, T. J., Lomas, L. W., and Erickson, G. E. 2013. Impacts of a limit-feeding procedure on variation and accuracy of cattle weights. *Journal of Animal Science*, 91(11), 5507-5517.
- Wattiaux, M.A., and Reed, J.D., 1995. Fractionation of nitrogen isotopes by mixed ruminal bacteria. *Journal of Animal Science* 73, 257.
- Webb, L. A., Sadri, H., Schuh, K., Egert, S., Stehle, P., Meyer, I., and Sauerwein, H. 2020. Branched-chain amino acids: Abundance of their transporters and metabolizing enzymes in adipose tissue, skeletal muscle, and liver of dairy cows at high or normal body condition. *Journal of Dairy Science*, 103(3), 2847-2863.
- Welle, S., Burgess, K., and Mehta, S., 2009. Stimulation of skeletal muscle myofibrillar protein synthesis, p70 S6 kinase phosphorylation, and ribosomal protein S6 phosphorylation by inhibition of myostatin in mature mice. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* 296, 567–572.
- Wells, J. E., and Russell, J. B. 1996. Why do many ruminal bacteria die and lyse so quickly?. *Journal of dairy science*, 79(8), 1487-1495.

- White, H. M. 2020. ADSA Foundation Scholar Award: Influencing hepatic metabolism: Can nutrient partitioning be modulated to optimize metabolic health in the transition dairy cow?. *Journal of dairy science*, 103(8), 6741-6750.
- Windmueller, H. G., and Spaeth, A. E. 1980. Respiratory fuels and nitrogen metabolism in vivo in small intestine of fed rats. Quantitative importance of glutamine, glutamate, and aspartate. *The Journal of biological chemistry*, 255(1), 107-112.
- Winsor, C. P. 1932. The Gompertz curve as a growth curve. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 18(1), 1.
- Xie, Y., Wu, Z., Wang, D., and Liu, J., 2019. Nitrogen partitioning and microbial protein synthesis in lactating dairy cows with different phenotypic residual feed intake. *Journal of Animal Science and Biotechnology* 10, 54.
- Zerjal, T., Härtle, S., Gourichon, D., Guillory, V., Bruneau, N., Laloë, D., Pinard-van der Laan, M-H., Trapp, S., Bed'hom, B., and Quéré, P., 2021. Assessment of trade-offs between feed efficiency, growth-related traits, and immune activity in experimental lines of layer chickens. *Genetics Selection Evolution* 2021 53:1 53, 1–17.
- Zhang, C. N., Li, X. F., Xu, W. N., Zhang, D. D., Lu, K. L., Wang, L. N., and Liu, W. B. 2015. Combined effects of dietary fructooligosaccharide and *Bacillus licheniformis* on growth performance, body composition, intestinal enzymes activities and gut histology of triangular bream (*Megalobrama terminalis*). *Aquaculture nutrition*, 21(5), 755-766.
- Zhang, S., Chu, L., Qiao, S., Mao, X., and Zeng, X., 2016. Effects of dietary leucine supplementation in low crude protein diets on performance, nitrogen balance, whole-body protein turnover, carcass characteristics and meat quality of finishing pigs. *Animal Science Journal* 87, 911–920.
- Zhang, J., Shi, H., Li, S., Cao, Z., Yang, H., and Wang, Y., 2019. Integrative hepatic metabolomics and proteomics reveal insights into the mechanism of different feed efficiency with high or low dietary forage levels in Holstein heifers. *Journal of Proteomics* 194, 1–13.
- Zorzi, K., Bonilha, S.F.M., Queiroz, A.C., Branco, R.H., Sobrinho, T.L., and Duarte, M.S., 2013. Meat quality of young Nellore bulls with low and high residual feed intake. *Meat Science* 93, 593–5.
- Zhou, M., Hernandez-Sanabria, E., and Guan, L. L. 2010. Characterization of variation in rumen methanogenic communities under different dietary and host feed efficiency conditions, as determined by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis analysis. *Applied and environmental microbiology*, 76(12), 3776-3786.
- Zuidhof, M. J., Schneider, B. L., Carney, V. L., Korver, D. R., and Robinson, F. E. 2014. Growth, efficiency, and yield of commercial broilers from 1957, 1978, and 2005. *Poultry science*, 93(12), 2970-2982.

Annexes

Annexe 1 : Une approche intra-cellulaire pour étudier le métabolisme protéique.

Protein metabolism at intra-cellular level could explain efficiency in bulls selected by residual feed intake fed two contrasting diets

Guarnido-Lopez, P., Ortigues-Marty, I., David, J., Polakof, S., Cantalapiedra-Hijar, G.

Manuscript en préparation.

Introduction

In order to face current economic and environmental impact of livestock increase as result of a generalized augmentation of meat demand, feed efficiency need to be improved (Makkar and Beever, 2012). In beef cattle, where animals present a particular lower efficiency of feed transformation into animal products (Mottet et al., 2017), Residual feed intake (RFI) has been categorized as the preferred feed efficiency criteria because of its moderate heritability (0.3-0.6) and its non-correlation with body weight and gain. However, genetic selection for RFI has been related to co-selection for undesirable characters as lower immunity or reproductive performances (Wang et al., 2012; Zerjal et al., 2021). In addition, selection by RFI present environmental interactions with the type of diet used, showing changes in RFI ranking when shifting across different diets of different composition (Coyle et al., 2016; Asher et al., 2018; Lahart et al., 2020). As RFI has been presented as a multi-trait related character, several undesirable effects of genetic selection by this trait could be explained exploring biological mechanisms underlying RFI. Among biological determinants of RFI, protein metabolism has been proposed as a major one because of its relation with productive and non-productive functions and its association with energy expenditure (Richardson and Herd, 2004; Cantalapiedra-Hijar et al., 2018). Main protein metabolism mechanisms associated to feed efficiency are protein turnover, as the continual synthesis and degradation of body proteins (Lobley, 2003) and the hepatic catabolism (Lapierre et al., 2006). Some previous studies show differences in protein metabolism across extreme RFI cattle (McDonaugh et al., 2001; Oddy and Richardson, 2004; Elolimy et al., 2019; Guarnido-Lopez et al., 2022). However, in the case of RFI, whose animals have been chosen because of their different intake at similar body performances, it may result complicated to study these mechanisms in RFI independently of the feeding level effect, highly influencing both the protein turnover and the hepatic catabolism (McNurlan and Garlick, 1989; Boisclair et al., 1994; Lobley, 1998; Waterlow, 2006a). Therefore, it could be difficult to determine if genetic selection by RFI is just conducted by differences in DMI and appetite between extremes as suggested by (Lines et al., 2014) or if there are mechanisms associated to RFI genotype regardless the feeding level. In addition, these mechanisms could somehow explain the association between feed efficiency and some of the above-mentioned undesirable effects of RFI selection (Rauw et al., 1998; Rauw, 2012).

Therefore, the objective of this study was to evaluate protein metabolism of extreme RFI individuals fed contrasting diets isolating the effect of RFI genotype from the feeding level by standardizing animals at similar level of ingestion

Material and methods

The protocol of this study was approved by the Ethics Committee of the Auvergne-Rhône-Alpes region and the French Ministry of Higher Education, Research and Innovation (Authorization number: APAFIS #16194-2016101016361277 v6 delivered on 14Th January 2019). This experiment was conducted at INRAE, Centre Auvergne-Rhône-Alpes, France.

Animals, dietary management and experimental design

Tissues and plasma metabolites from 32 extreme RFI Charolais bulls were analyzed in two consecutive years (n=16 in year 2019 and n=16 in year 2020). Half of animals were fed a high-starch diet based on corn silage and the other half were fed a high-fiber diet based on grass silage. Both diets were formulated with a forage to concentrate ratio close to 60:40, where the concentrate of the corn-based diet contained 60% wheat grains and 40% soybean meal while that from the grass-based diet had 20% wheat grains, 15% soybean meal and 65% beet pulp. Animals belonged to an experiment detailed in Guarnido-Lopez et al., (submitted), where the extreme RFI individuals were chosen through an initial 84 d feed efficiency test and then, they were evaluated for protein turnover and NUE during a total of 112 days. During this period, we also recorded feed efficiency and oxygen consumption through a Greenfeed ®. Half of animals were fed a high-energy diet based on corn silage and the other half were fed a high-fiber diet based on grass silage. Both diets were formulated with a forage to concentrate ratio close to 60:40, where the concentrate of the corn-based diet had contained 60% wheat grains and 40% soybean meal (60% and 40% respectively) while that from the grass-based diet had 20% wheat grains, 15% soybean meal and 65% beet pulp (20%, 15% and 65% respectively). After At the end of the study of protein metabolism, extreme RFI animals were slaughtered at the same fattening duration (196 d), averaging 698 ± 63 kg BW and 485 ± 42 day old.

In order to remove the DMI variation among extremes RFI, we conducted aanimals were starved over 12-14h starvation period the day before being sending sent animals to the abattoir, and but received 3 hours before the slaughter, we gave to animals manually a fixed amount (2.5kg) of their respective concentrates (high-energy vs high-fiber; Table 1) distributed manually by using a bucketto each animal. We choseThe 3 hours hour interval between this last meal and slaughter was chosen because it is, on average, it has been observed to be the higher postprandial moment in ruminants regardingtime for the highest plasma glucose and insulin levels (Jenny and Polan, 1975; Evans et al., 1975). Animals were slaughtered sequentially during over a whole month each year (in June 2019 and June 2020), four animals been slaughtered per week oin the same day (Tuesdays) but with approximately one hour of separation between them. Therefore, in order toTo avoid animals having unlimited access to feed and feed them 3 hours before the slaughter, we keep animalsthey were individually separated during the 12h previous to the abattoir.

Measurements and sampling

Plasma and tissues sampling

Blood samples were collected from each extreme RFI animal just in the moment of the slaughter by neck venipuncture into a 9 ml EDTA tube (BD vacutainer, Plymouth, UK) and centrifuged at $2500 \times g$ during 10 min at room temperature to obtain separate the plasma, after that was subsequently storage stored at -20°C . Plasma was then analyzed for metabolites (glucose, urea and Beta-OH) and hormones (insulin and IGF-1) concentrations.

We At slaughter, we also sampled tissues fresh tissues from animals. For protein turnover and enzymatic activity, we sampled the Longissimus Dorsi muscle (Longissimus Dorsi) and the liver of animals during the slaughter. Just after extracting a piece of the tissue immediately after sampling, the samples, were cut it in small squares (<1g) and put them frozen in liquid nitrogen (-80° C) to keep samples freeze and stored at -80?? °C until the analysis.

Laboratory analyses

Feed, experimental diet characteristics and N balance

Dietary As detailed in Guarnido et al., (submitted)xxx , dietary samples from concentrates were analyzed for DM, organic matter (OM), N, NDF, ADF and starch. Dry matter and OM concentrations were determined by oven-drying (60°C and 72h) and subsequent incineration in a muffle furnace at 550°C (NF V 18-101), respectively. Nitrogen concentrations were analyzed by the Dumas method (Ebeling, 1968) in the Elementar Rapid N Cube ®. Solid samples, once dried, were introduced in capsules of 200 mg and liquid samples (urines) were introduced by pipetting 300 µl in each capsule. CP was considered to be N x 6.25. The enzymatic CP degradability was obtained after 1h of in vitro incubation (ED1) according to Aufrere et al., (1989; 1991). Neutral detergent fiber (NDF) and acid detergent fiber (ADF) were analyzed according to Van Soest et al., (1991). Before starch analysis, we used a neutral detergent solution to remove proteins, starch, tannins and cellular rest (NDF) and an acid detergent solution to remove the hemicellulose (ADF). Starch was analyzed by spectrophotometry after enzymatic analysis (α -amylase) on feed samples (Faisant et al., 1995). In vitro DM and OM digestibility of silages and individual ingredients was determined according to Aufrère et al., (2007). Then, feed values of individual ingredients were calculated using Prevalim® according INRA (2018). Feed values of concentrates were estimated from chemical compositions of ingredients.

Plasma metabolites and hormones

For plasmatic glucose, Betabeta-OH and urea, analyses were conducted for each plasma sample (1.5 ml) through aby gas spectrophotometry with an automated analyzer (Arene 20XT, Thermo Scientific, Vaanta, Finland). In the case of urea, analyses were conducted in double and in simple for glucose and Beta-OH. The accuracy profile (NF V03-110: 2010) of the automated analyzer for the concentration of these 3 metabolites concentrations ranging between 0.05 and 0.90 g/L yielded an average accuracy of 101% and a coefficient of variation for replicates averaging 8%. Plasma insulin and IGF-1 were determined by radioimmunoassay (RIA) using commercial kits (Bouty Techno Genetics, Milan, Italy), validated for bovine sera.

Western Blot analysis

The relative abundance of proteins involved in protein synthesis and protein degradation of liver and muscle were detected using immunoblotting. Frozen samples were homogeinized on ice in 2 ml lysis buffer (150 mM Nacl, 10 mM Tris, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA, pH 7.4, 100 mM Sodium Floride, 4 mM Sodium pyrophosphate, 2 mM Sodium Orthovanadate, 1% Triton X-100, Protease inhibitor cocktail to 1% V/V before using (Merck Sigma, P8340 Saint Quentin Fallavier). The solution obtained was centrifuged at 10000 g for 15 min at 4 °C. Protein concentration was determined using a BCA protein assay kit (Thermo Pierce Biotechnology, IL, USA) according to the protocol of the manufacturer with BSA as a standard. Proteins were then denaturated in a 1X Laemmli solution (+ β -mercaptoethanol) at 95 °C during 5 min, and separated onto polyacrylamide gels (Biorad, Mini-Protean TGX stain-Free gels, 4-20%, 4568095, Mityry-Mory). Equal amounts of protein (20 µg per lane) were loaded onto gels set on a Mini-Protean tetra electrophoretic system (Bio-Rad) and run in a

1X buffer (Running buffer 10X, Tris-Base, Glycine and SDS) for 2 h at 80 V at ambient temperature and 70 V until the blue reached the bottom of the gel. After migration, separated proteins were transferred into polyvinylidene fluoride membranes (Biorad, Trans-Blot Turbo, transfer kit, LF PVDF, 1704275). After washing in a PBS-Tween 1X solution, membranes were blocked for 1 h at room temperature in blocking solution, BSA 5% PBS-Tween 0.1%.

For protein synthesis we analyzed the Akt and S6 pathway in the muscle and the liver. Antibodies utilized for Akt pathway were Akt (pan, rabbit ab #4691, Cell Signaling, Ozyme, France) and pAkt (Serine473, rabbit Ab #4060, Cell Signaling, Ozyme, France). Antibodies utilized for S6 pathway were S6 (S6 ribosomal protein #2217 Cell Signaling, Ozyme, France) and pS6 (Serine 235/236, rabbit Ab #2211, Cell Signaling, Ozyme, France). Membranes were incubated overnight at 4 °C and protein bands were visualized by Infrared Fluorescence using the Odyssey Imaging System (LI-COR Inc. Biotechnology, Lincoln, NE, USA) and quantified by Odyssey infrared imaging system software (Application software, version 1.2). For protein degradation we analyzed the ubiquitine (UBA1, Ab180125, Abcam rabbit Ab) and autophagy (LC3b, L7543 sigma-Aldrich) pathway in the muscle. Membranes were incubated overnight at 4 °C and protein bands were visualized by using a G:Box enhanced chemiluminescence (ECL plus; GE Healthcare, Orsay, France). Finally, we normalized results according to the total protein values.

Enzymatic activity

We were interested in measuring the enzymatic activity of two main transaminases of the liver; Aspartate aspartate alanine-transferase (ALAT) and Aspartate aspartate amino-transferase (AST). For enzyme activities, liver samples were homogenized with ice-cold buffer (10w :v ; 50 mM Tris, pH 7.4, 250 mM sucrose, 1 mM EDTA, 1mM Sodium orthovanadate, 5mM Sodium pyrophosphate, 50 mM NaF, 1 mM EGTA, 1% V/V Triton X100, 1% V/V Protease Inhibitor Cocktail). The homogenate was centrifuged for 20 min at 10000g (except for a homogenate aliquot for the glucose-6-phosphatase, G6 Pase, assay centrifuged at 100000g) and the supernatant used immediately for enzyme assays. Analyses were conducted through spectrophotometry using a microplate reader (Infinite® 200 PRO NanoQuant, Tecan, Grödig, Austria) as described in Polakof et al., (2008) but adapted for cattle.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed in R (RStudio Core Team, version 1.1.463, 2018). To test the effects of the diet, the RFI group and their interaction on all post-mortem analyzed variables, a general linear model was run that included the year, the nature of the diet, the RFI group, and their interactions as fixed effects (Year, Diet, RFI, Year x Diet, Year x RFI and Diet x RFI);

$$Y = \mu + a_i + D_i + E_i + a_i \times D_i + a_i \times E_i + D_i \times E_i$$

where Y is the dependent variable, μ is the overall mean; a_i is the effect of the year (2019-2020), D_i is the categorical effect of the type of diet used, E_i is the categorical effect of RFI as efficient or non-efficient, $a_i \times D_i$ is the interaction between the effect of the year and the diet, $a_i \times E_i$ is the interaction between the effect of the year and the RFI group and $D_i \times E_i$ is the interaction between the diet and the RFI effect. The triple interaction was also tested but as it was non-significant in all variables, we did not include it in the model.

Mean values are reported as least square means with pooled SEM values. Some interaction terms were significant, but to simplify the presentation of results in tables, only the diet, RFI effects and their interaction (Diet x RFI) are shown. When the Diet x RFI interaction was significant, the means for the different RFI groups were compared using Tukey's significant difference multiple comparison. Effects were declared significant when $P \leq 0.05$, and a trend was considered when $0.05 < P < 0.10$. In addition,

Western blot results were also tested for the effect of the gel, without showing a significant contribution ($P > 0.10$) in the model.

Results

Performances of extreme RFI animals during the feed efficiency test (84d) allowing us to rank extreme animals are detailed in Guarnido-Lopez et al., (2022). In this work, we decided to show performances and oxygen consumption obtained between the end fin of the feed efficiency test (84d) and the slaughter (19612d) during the study of protein metabolism for a total of 112d (Table 2). Efficient RFI animals showed lower DMI (-4.5%; $P = 0.04$) and a trend for a lower oxygen consumption (-3.7%; $P = 0.08$) than inefficient ones regardless the diet. In addition, Eextreme animals showed an average RFI difference of 0.67 kg/d without differences in body weight or ADG ($P > 0.47$).

Postprandial plasma metabolites and hormone concentrations of extreme RFI animals fed contrasting diets

Results of postprandial plasma metabolites and hormones of concentrations plasma from extreme RFI animals is are shown in table 3. Efficient RFI animals showed higher Beta-OH concentrations (+28.6%; $P = 0.01$) than non-efficient ones. Only when fed with high-energy diets, efficient animals showed higher insulinemia values (+35.2%, Diet \times RFI interaction; $P = 0.03$) and a trend, for a higher plasmatic glucoseemia concentration (+16.7%, Diet \times RFI interaction; $P = 0.10$) than non-efficient ones. Regarding the diet effect, animals fed high-starchenergy diets showed higher insulin (+21%, $P = 0.05$) and lower glucose to insulin ratio (-35.3%, $P = 0.01$) than animals fed high-fiber diets.

Muscle protein turnover metabolism

Results of protein turnover metabolism of in skeletal muscle from extreme RFI animals are shown in table 4. Efficient RFI individuals showed a minor lower (-34.6%, $P = 0.01$) potential expression of ubiquitin pathway (protein degradation) than non-efficient animals. In addition, efficient RFI individuals showed a trend for a smaller Akt (-24.4%, $P = 0.10$) and S6 (-26.8%, $P = 0.07$) total protein expression than non-efficient, with however non-significant differences in phosphorylated Akt or S6 protein ($P > 0.17$). As consequence, efficient RFI individuals presented a trend for a higher (+30.2%, $P = 0.08$) expression of pS6 to S6 ratio (protein synthesis) regardless the diet.

Liver protein synthesis and enzymatic activity

Results of both liver protein synthesis and hepatic activity of transaminases Aspartate aminotransferase (ASAT) and Alanine-aminotransferase (ALAT) are shown in table 5. Efficient RFI animals showed lower hepatic ALAT activity (-14.2%, $P = 0.06$) than non-efficient individuals. Then, RFI effect did not show significant differences in pProtein synthesis was not significantly different across RFI extremes, however, only when fed high-energy diets, efficient RFI individuals fed high-energy diets showed a higher expression of p-Akt (+19.1%, Diet \times RFI interaction; $P = 0.04$) and its pAkt to Akt ratio (+23.3%, Diet \times RFI interaction; $P = 0.07$) than inefficient ones fed the same diet.

Relationships between plasma metabolites, muscle protein metabolism and hepatic activity of hepatic transaminases of in extreme RFI animals

Relationships between relevant variables measured in this work are shown in table 6 for animals fed high-fiber diets and in table 7 for animals fed high-energy diets. Plasmatic insulin concentration was positively correlated with the expression of p-Akt to Akt ratio (averaging $r=0.55$; $P<0.05$) both in high-energy and in high-energy diets. Only in the case of animals fed high-energy diets, did we observed a positive correlation between the the hepatic transaminase activity of ALAT in the liver and the expression of the protein degradation (UBA1) in the muscle ($r=0.68$; $P=0.001$). Also in high-energy diets, we observed negative correlations between the ALAT activity and the expression of pAkt to Akt ratio in the muscle ($r=0.57$; $P=0.001$) and between the expression of protein synthesis (pS6/S6) and protein degradation in the muscle ($r= -0.49$; $P=0.05$). In the case of high-fiber diets, we observed a negative correlation between the plasmatic Betabeta-OH concentration and the pAkt to Akt ratio ($r= -0.48$, $P=0.05$).

Tables

Table 1: Dietary characteristics of concentrates given to extreme RFI animals 3h before the slaughter

	High-fiber diet	High-starch diet
Ingredient composition (kg from a total of 2.5kg)		
Wheat grain	0.50	1.48
Beet pulp	1.62	-
Soybean meal	0.37	0.99
Bicarbonate	-	0.20
Minerals and vitamin mix*	0.10	0.10
Chemical composition (g/kg of DM)		
OM	876 ± 0.00	876 ± 0.00
Crude protein	167 ± 0.38	289 ± 1.41
NDF	311 ± 1.31	130 ± 3.15
ADF	160 ± 1.10	52.9 ± 0.21
Starch	131 ± 0.69	374 ± 0.21
Starch/NDF (g/g)	0.42 ± 0.00	2.96 ± 0.87
In vitro enzymatic digestibility¹ (%)		
DM	92.1 ± 0.39	94.9 ± 2.12
OM	92.9 ± 0.33	95.2 ± 1.20
Feed Values²		
Net Energy (Mcal/kg)	2.00 ± 0.00	2.22 ± 0.01
MP (g/kg of DM)	11.8 ± 0.27	15.3 ± 0.86
MP/Net energy (g/Mcal) ³	5.89 ± 0.02	6.89 ± 0.11
RPB (g/kg of DM) ⁴	-3.87 ± 1.80	84.1 ± 4.95

* Minerals and vitamin mix: 5 % P, 25 % Ca, 8 % Mg, 0.2 % Na, vitamin A (210 mg/kg), vitamin D3 (3.75 mg/kg), vitamin E (2730 mg/kg) and vitamin B1 (4.5 mg/kg).

¹ Estimated from enzymatic digestion with pepsine-cellulase (Aufrère, 1982)

² Feed values were estimated from chemical composition and proportion of ingredients by taking into account digestive interactions (INRA, 2018).

³ Metabolizable to Net energy ratio. Recommended values are between 53 and 48 for body weights of 400 and 700 kg, respectively, in fattening Charolais bulls (INRA, 2018).

⁴ Rumen protein balance, representing nitrogen intake minus non-ammonia nitrogen at the duodenum (INRA, 2018).

Table 2: Animal performances of extreme RFI bulls fed two contrasting diets

	High-fiber diet		High-starch diet		SEM	P-Value			
	RFI -	RFI +	RFI -	RFI +		Diet	RFI	Diet x RFI	
	n=	8	8	8	8				
<i>Animal performances*</i>									
Initial body weight (kg)		540	512	560	561	9.8	0.07	0.47	0.43
Final body weight (kg)		676	657	696	696	10.1	0.08	0.56	0.56
DMI (kg/d)		8.82	9.11	9.63	10.1	0.234	0.001	0.04	0.49
ADG (kg/d)		1.15	1.23	1.22	1.17	0.106	0.91	0.89	0.53
RFI (kg/d)		-0.31	0.24	-0.44	0.35	0.156	0.81	<0.001	0.31
O ₂ consumption (g/kg BW/d)		10.01	10.44	10.24	10.53	0.194	0.41	0.08	0.71

*Animal performances were analyzed in the period of protein turnover evaluation during (112d), between the end of the first feed efficiency test (day 84) and the slaughter (day 196).

Table 3: Postprandial metabolites and hormones at the slaughter of extreme RFI bulls fed two contrasting diets

Diets	High-fiber diet		High-starch diet		SEM	P-Value			
	RFI-	RFI+	RFI-	RFI+		Diet	RFI	Diet x RFI	
RFI	n=	8	8	8	8				
Metabolites									
Glucose (g/L)		0.61a	0.65a	0.66a	0.55b	0.039	0.52	0.43	0.10
BetaOH (mmol/L)		0.31	0.25	0.32	0.26	0.022	0.48	0.01	0.76
Urea (g/L)		0.17	0.16	0.19	0.18	0.014	0.13	0.43	0.93
Hormones									
IGF-1 (ng/mL)		334	301	363	354	31.9	0.18	0.57	0.77
Insulin (μ U/mL)		11.0b	17.5b	25.6a	16.6b	3.09	0.05	0.58	0.03
Glucose to insulin ratio		0.55	0.48	0.32	0.35	0.013	0.01	0.75	0.43

^{a,b,c} Averages with different letters on the same row are significantly different ($P < 0.05$)

Table 4: Western blot results (protein synthesis and degradation) of muscle tissue (*longissimus Dorsi*) from extreme RFI bulls fed two contrasting diets

Diets	High-fiber diet		High-starch diet		SEM	P-Value			
	RFI-	RFI+	RFI-	RFI+		Diet	RFI	Diet x RFI	
	n=	8	8	8	8				
<i>Protein synthesis</i>									
AKT1		1.02	1.11	0.84	1.00	0.060	0.06	0.10	0.71
p-AKT1		0.95	1.20	0.87	0.96	0.095	0.19	0.17	0.51
p-AKT1:AKT1		0.94	1.06	1.02	0.96	0.081	0.86	0.76	0.26
S6k		0.81	1.03	0.87	1.35	0.205	0.31	0.07	0.50
p-S6k		0.79	0.89	1.14	1.25	0.233	0.14	0.67	0.98
p-S6k:S6k		1.18	1.01	1.48	0.88	0.187	0.67	0.08	0.31
<i>Protein degradation</i>									
LCE _b		1.03	1.00	0.98	1.02	0.061	0.83	0.91	0.62
UBA ₁		0.79	1.31	0.87	1.12	0.173	0.74	0.04	0.47

Table 5: Western blot results (protein synthesis) and enzymatic activity of transaminases in hepatic tissue from extreme RFI bulls fed two contrasting diets

Diets	High-fiber diet		High-starch diet		SEM	P-Value			
	RFI-	RFI+	RFI-	RFI+		Diet	RFI	Diet x RFI	
	n=	8	8	8	8				
<i>Protein synthesis</i>									
AKT1		0.96	1.02	0.99	1.03	0.039	0.60	0.24	0.77
p-AKT1		0.90 ^b	1.01 ^b	1.11 ^a	0.91 ^c	0.078	0.67	0.77	0.04
p-AKT1:AKT1		0.94 ^b	1.03 ^b	1.16 ^a	0.89 ^c	0.099	0.71	0.39	0.07
S6k		1.04	0.96	1.03	0.90	0.057	0.67	0.17	0.74
p-S6k		0.99	1.04	1.08	0.84	0.113	0.61	0.41	0.21
p-S6k:S6k		0.95	1.12	1.09	1.01	0.148	0.92	0.76	0.36
<i>Enzymatic activity (MU/mg prot)*</i>									
ASAT		1239	1275	1121	1447	164.5	0.89	0.15	0.39
ALAT		64.2	75.2	63.2	73.5	5.56	0.81	0.06	0.94

*Enzymatic activity was measured over thawed samples of liver from extreme RFI bulls.

^{a,b,c} Averages with different letters on the same row are significantly different ($P < 0.05$)

Table 6: Pearson's correlations between plasma metabolites and muscle protein metabolism and hepatic activity of transaminases of extreme RFI animals fed high-fiber diets.

	ALAT	Insulin	Glucose	Beta-OH	pAkt/Akt	pS6/S6
Insulin	0.28 ^{NS}					
Glucose	0.28 ^{NS}	0.01 ^{NS}				
Beta-OH	0.30 ^{NS}	-0.32 ^{NS}	0.01 ^{NS}			
pAkt/Akt	0.28 ^{NS}	0.49**	0.05 ^{NS}	-0.48**		
pS6/S6	-0.13 ^{NS}	0.12 ^{NS}	0.39 ^{NS}	0.02 ^{NS}	0.23 ^{NS}	
UBA1	0.17 ^{NS}	-0.02 ^{NS}	0.43 ^{NS}	-0.07 ^{NS}	-0.36 ^{NS}	-0.13 ^{NS}

Table 7: Pearson's correlations between plasma metabolites and muscle protein metabolism and hepatic activity of transaminases of extreme RFI animals fed high-energy diets.

	ALAT	Insulin	Glucose	Beta-OH	pAkt/Akt	pS6/S6
Insulin	-0.44 ^t					
Glucose	-0.23 ^{NS}	-0.06 ^{NS}				
Beta-OH	0.09 ^{NS}	0.28 ^{NS}	0.39 ^t			
pAkt/Akt	-0.57***	0.66***	0.07 ^{NS}	0.09 ^{NS}		
pS6/S6	0.02 ^{NS}	0.12 ^{NS}	0.33 ^{NS}	0.17 ^{NS}	-0.05 ^{NS}	
UBA1	0.68***	-0.41 ^t	-0.19 ^{NS}	0.29 ^{NS}	0.37 ^{NS}	-0.49**

Annexe 2 : Poster présenté au congrès 3R 2020.

Quel lien entre variabilité individuelle de l'efficacité alimentaire et efficacité d'utilisation de l'azote chez le bovin en engraissement ?

GUARNIDO. P (1), ORTIGUES-MARTY. I (1), SALIS. L (1), NOZIERE. P (1), CANTALAPIEDRA-HIJAR. G (1)

¹INRA, UMRH Theix, France



CONCLUSION

Les animaux efficaces montrent une meilleure efficacité d'utilisation de l'azote lorsque la rétention d'azote est estimée sur une longue période (6 mois vs 10 jours), et ce quel que soit le régime alimentaire

Introduction

L'ingéré résiduel (RFI), un indice de sélection génétique de l'efficacité alimentaire, a été associé à une meilleure efficacité d'utilisation de l'azote (EUA; N dans les produits animaux/N ingéré) chez la vache laitière (Liu et VanderHaar et al., 2020), mais pas chez le bovin en engraissement (Carmona et al., 2020). La méthode de mesure de la rétention d'azote (bilan d'azote sur une courte période, soumise à des erreurs de mesure élevées ; Hristov et al., 2020), utilisée pour calculer l'EUA, pourrait expliquer le manque de relation chez le bovin en engraissement.

Hypothèse

➤ Les bovins en engraissement efficaces selon RFI ont une plus forte rétention azotée, et cette relation peut être mise en évidence en mesurant la rétention azotée sur un temps long.

Objectif

Comparer deux méthodes de mesure pour tester la relation entre RFI et l'EUA chez des bovins à l'engrais, en utilisant deux régimes de nature différente pouvant impacter de façon différente la partition de l'azote.

Matériel & Méthodes

- 16 animaux extrêmes en RFI
- 2 régimes contrastés (ensilage d'herbe vs de maïs)
- Evaluation de leur EUA => $EUA = N \text{ retenu} / N \text{ ingéré}$, avec 2 méthodes différentes pour calculer la rétention d'azote

1) BILAN D'AZOTE (méthode de référence)

Stalle de digestibilité: 4j adaptation + 10j mesures

$N \text{ retenu} = N \text{ ingéré} - N \text{ fèces} - N \text{ urines}$

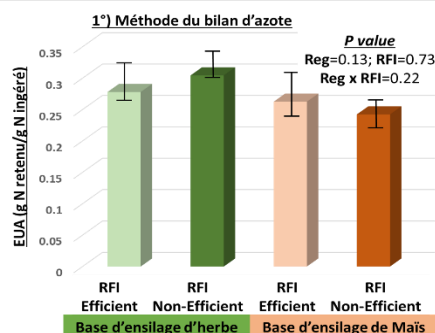


- ANOVA avec effets fixes du régime, groupe RFI et leur interaction

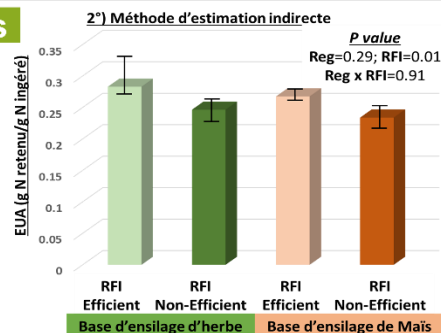
2) COMPOSITION CORPORELLE (méthode indirecte)

$N \text{ retenu} = \text{Quantité N finale} - \text{Quantité N initiale}$

- Quantité N finale (J196) estimée par dissection de la 6ème côte et des données de l'abattoir
- Quantité N initiale (J0) estimée à partir de la taille des adipocytes prélevés par biopsie sous-cutanée



Résultats



Pas de différences d'EUA entre extrêmes RFI due aux imprécisions de mesure (pas de corrélation entre le N ingéré et urinaire ; CV élevé)

Les animaux RFI efficaces ont une EUA plus élevée (+15%) quel que soit le régime, en lien avec une moindre ingestion d'N (-15%; $P < 0.05$) mais une même rétention d'N ($P > 0.05$)

Références: Cantalapietra-Hijar et al., 2020. Br.J Nutr.doi.org/10.1017/S0007114520001154doi; Carmona et al., 2020. Anim.Feed.Sci.Tech. 263:114493; Castro-Bulle et al., 2007. J.Anim.Sci.85:928-936; Hristov et al., 2020.J.Dairy.Sci.102 :5811-5852; Inra., 2018. Alimentation des ruminants. Quae; Liu, E et VanderHaar, 2020. J.Dairy.Sci.103 :3177-3190.

Étude réalisée avec le soutien financier de Apisgene.



INRA Site de Theix
63122 SAINT-GENÈS-CHAMPANELLE
Pablo.Guarnido-Lopez@inrae.fr



Annexe 3 : Poster présenté au congrès EAAP 2021

Beef cattle with superior feed conversion efficiency present higher whole-body protein turnover

GUARNIDO, P.¹, SALIS, L.¹, FAURE, P.², CHANTELAUZE, C.¹, ORTIGUES-MARTY, I.¹, CANTALAPIEDRA-HIJAR, G.¹

¹INRAE, UMRH Theix, France; ²INRAE, UE Herbipôle, France

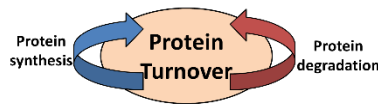


CONCLUSION

Beef animals with higher feed conversion efficiency presented higher whole-body protein degradation, which was related to higher energy expenditure because of energy cost of protein turnover

Introduction

There is a need to improve feed efficiency (FE) in livestock because of environmental and economic issues. Feed conversion efficiency (FCE) is the classic efficiency trait utilized to phenotype efficiency in beef cattle, however, it has been associated to higher body weight in dams (Archer et al., 1999). That is why it is necessary to know biological mechanisms underlying feed efficiency. Among mechanisms related to FE, protein turnover may explain the 37% of the entire FE variation (Herd et al., 2004), because of its huge influence in energy expenditure (Lobley, 2003).



Hypothesis

It is expected that protein turnover may spare dietary energy for growth, contributing to explain variations of feed efficiency in cattle

Objective

To study protein degradation rates of extreme RFI animals fed two contrasting diets and evaluate its influence in energy expenditure

Material & Methods

- 32 young Charolais bulls (\approx 543kg BW and 377 days of age) evaluated for feed conversion efficiency (FCE)
- 2 energy-contrasting diets based on corn (1.66 Mcal/kg DM) and on grass (1.51 Mcal/kg DM) silage
- Energy expenditure was accessed through the oxygen consumption, measured with Greenfeed®
- Protein turnover was evaluated through two different methods:



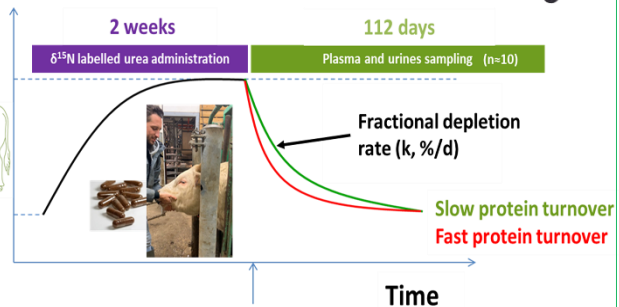
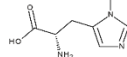
1) Isotopic N turnover in urines

As a validated proxy of the whole-body protein degradation (WBPD) (Cantalapiedra-Hijar et al., 2020)



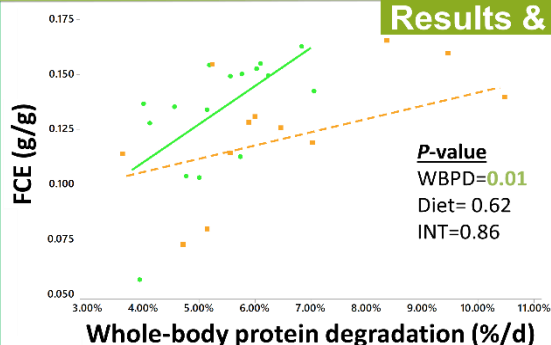
2) 3-Methyl-histidine to creatinine ratio

As a validated biomarker of the skeletal-muscle protein degradation (Harris and Milne., 1981)

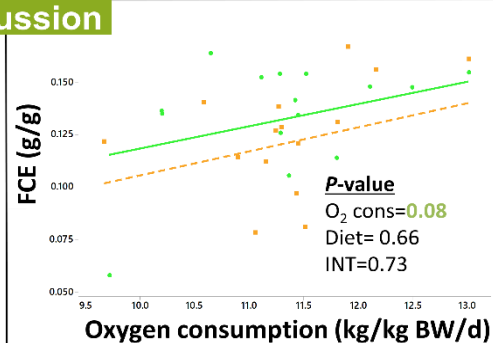


ANOVA analysis was used to evaluate effect of Diet, RFI class and their interaction (INT)

Results & discussion



Higher feed conversion efficiency was associated to higher WBPD, with however, non-significant relationships with the skeletal-muscle protein degradation ($r=0.03$; $P=0.98$), likely because WBPD also encompasses visceral organs turnover, which present higher turnover rates than skeletal-muscle.



As an energy consuming process, animals with higher FCE, and consequently, with higher gain ($r=0.89$; $P<0.001$) rates, presented higher protein turnover rates and consequently, higher energy expenditure.

Références: Cantalapiedra-Hijar et al., 2020. The Journal of Agricultural Science. 157:701-710; Herd et al., 2004. Australian Journal of Experimental Agriculture. 44. 423-430; Lobley, 2003. Canadian Journal of Animal Science. 83. 327-340; Harris and Milne., 1981. British Journal of Nutrition. 45. 411.

Study funded by ApisGene



INRA Site de Theix
63122 SAINT-GENÈS-CHAMPANELLE
Pablo.Guarnido-Lopez@inrae.fr



Annexe 4 : Résumé de la thèse présentée aux journées de l'école doctorale 2020.

Protein metabolism is associated to between-animal variation of feed efficiency in beef cattle in a diet-dependent manner



Encadrants: Gonzalo Cantalapiedra-Hijar et Isabelle Ortigues-Marty

Pablo Guarnido Lopez

Conclusion

Efficient RFI animals presented a greater nitrogen use efficiency than non-efficient ones and irrespective of the diet. However, protein turnover rate and body composition were associated to RFI in a diet-dependent manner: lower protein synthesis and degradation rates but higher carcass protein deposition were observed in efficient RFI animals fed corn but not grass-based diets

Introduction

There is a need to improve feed efficiency (FE) in livestock because of the increasing demand of protein resources and economic and environmental issues (Makkar and Beaver, 2013). Residual feed intake (RFI), is an index currently used in genetic selection to improve feed efficiency (Hill, 2012). However, some recent works have pointed out that genetic selection for efficient RFI individuals may be associated to lower robustness in cattle (Rauw et al., 2008). Therefore, it is necessary to understand the biological mechanisms underlying the between-animal variability of feed efficiency (Cantalapiedra-Hijar et al., 2018). In a previous study Guarnido et al. (2021) showed from a large experimental setup (n=600) that animals with superior feed efficiency protein were those with a greater ability to transform feed N into protein growth with however different responses according to the type of diet. In addition, protein metabolism and specifically the protein turnover may explain a high proportion of RFI variations (Richardson et al., 2004). Protein turnover is a huge energy consuming process encompassing the continual synthesis and degradation of body proteins needed to ensure maintenance functions (Waterlow, 2006) including immunity and adaptation. This is why protein turnover could be associated to both feed efficiency and robustness (Lobley et al., 2003 ; Mizushima and Klionsky, 2007) in an opposite way. We hypothesized that protein turnover, involved in adaptive animal responses, will be lower in efficient RFI cattle.

Objective

To study the associations between protein metabolism and feed efficiency in extreme RFI beef cattle

Material & Methods

Measurements were conducted in **32 extreme RFI animals selected** from 100 young Charolais bulls **fed two contrasting diets:**

1) Nitrogen use efficiency

Nitrogen balance and estimations from slaughterhouse composition (Hristov et al., 2020)

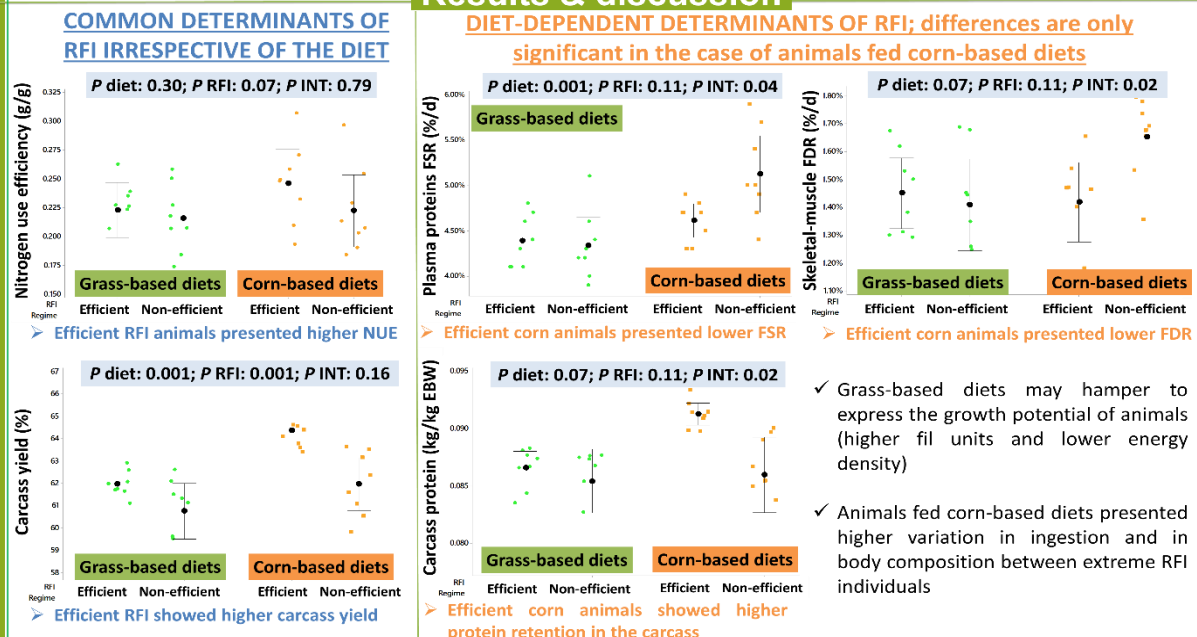
2) Body composition

Measured at the slaughter

3) Protein synthesis and degradation rates (protein turnover)

Isotopic N turnover method, a proxy of plasma protein synthesis rate (FSR) and whole-body protein degradation rate (FDR) (Cantalapiedra-Hijar et al., 2020) and the 3-Methyl-histidine as a biomarker of the skeletal-muscle degradation (FDR) (Harris and Milne, 1981)

Results & discussion



Study funded by ApisGene; Project Efficiency



INRA Site de Thaix
63122 SAINT-GENÈS-CHAMPANELLE
Pablo.Guarnido-Lopez@inrae.fr



Annexe 5 : Relations entre l'ensemble des variables analysés dans cette thèse

Le présent projet de thèse a étudié la relation entre le métabolisme protéique et l'IR à travers de plusieurs approches et en évaluant de nombreuses variables tant au niveau de l'animal entier que tissulaire et même cellulaire. Donc, pour rassembler tous les messages issus de ce travail j'ai décidé de faire une analyse en composantes principales (Figure 25) en incluant les deux régimes lorsque les analyses intra-régime ont donné des résultats similaires. Elle montre les relations entre variables d'EA, de turnover protéique, de composition corporelle et des phénomènes de régulation métabolique propres à l'individu (sans l'effet des quantités ingérées).

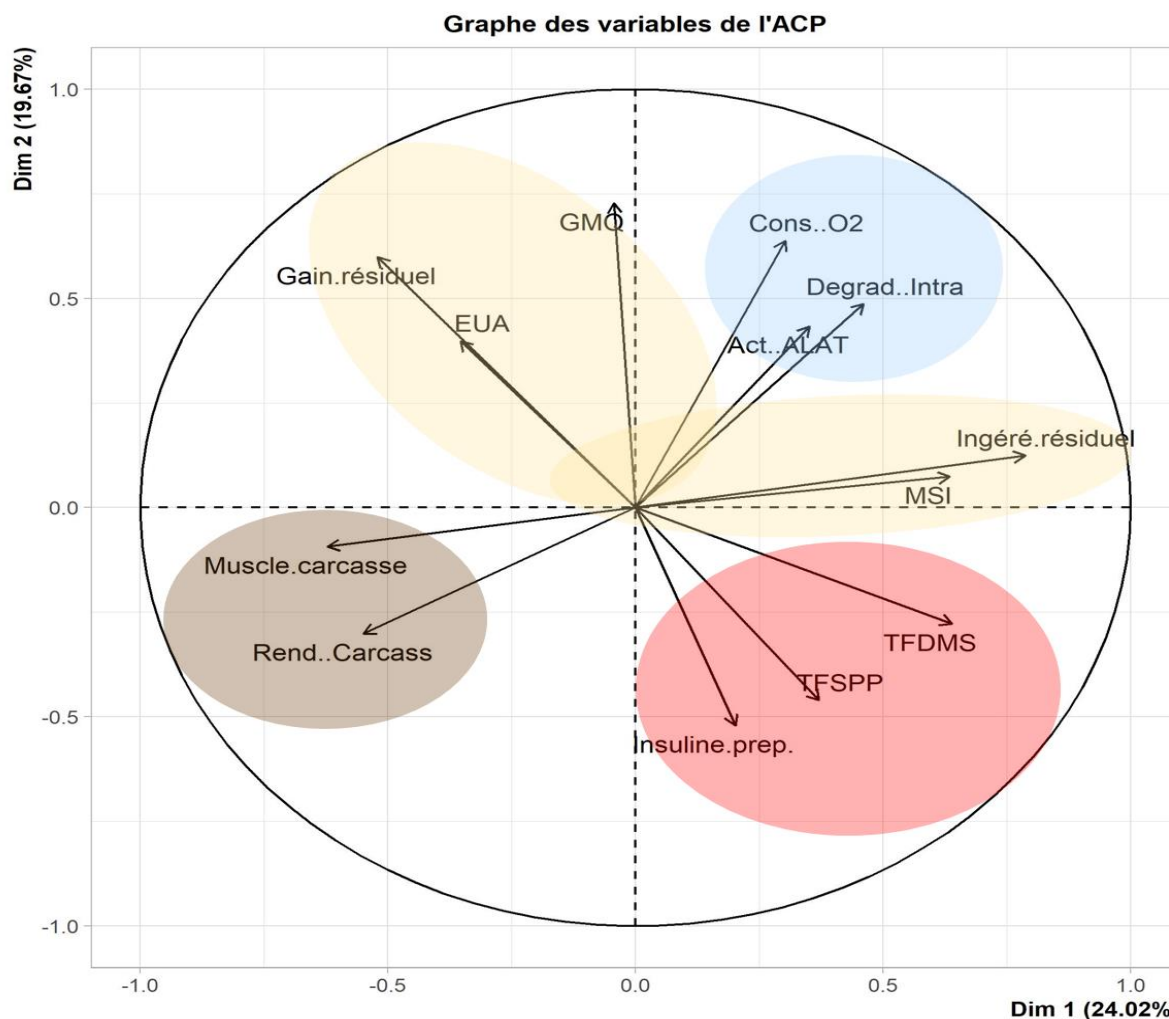


Figure 25 : Analyse en composantes principales (ACP) des variables analysées dans cette thèse pour évaluer la relation entre l'IR et le métabolisme protéique chez le bovin viande. Les variables en jaune représentent l'EA, en marron la composition corporelle, en rouge le turnover protéique et en bleu phénomènes de régulation métabolique propres à l'individu indépendamment des quantités ingérées.

Abréviations : Act ALAT : activité de l'enzyme transaminase ALAT dans le foie, Cons O2 : consommation d'oxygène (par kg PV), Degrad intra : dégradation protéique intracellulaire (voie de l'ubiquitine), EUA : efficacité d'utilisation de l'azote, GMQ : gain moyen quotidien, Insuline prep : Concentration d'insuline dans le plasma au moment préprandial (alimentation à volonté), MSI : matière sèche ingérée, Rend carcasse : rendement de carcasse (%), Muscle carcasse : proportion du muscle dans la carcasse (%), TFDMS : taux fractionnel de dégradation protéique du muscle squelettique, TFSPP : taux fractionnel de synthèse des protéines du plasma.

Cette analyse permet de distinguer les variables associées à l'efficacité (IR, GR, EUA, MSI, GMQ), à la composition corporelle (rendement de carcasse et pourcentage de muscle dans la carcasse), aux phénomènes de régulation métabolique propres à l'individu (dé-corrélés de l'ingéré) de l'animal (dégradation intracellulaire et activité de l'enzyme catabolique ALAT) et au turnover protéique (taux fractionnel de synthèse des protéines plasmatiques et de dégradation des protéines du muscle squelettique et la concentration en insuline du plasma). Les résultats de cette analyse étant très similaires entre régimes, je présente les conclusions générales. La variable la plus importante de l'axe 1 était l'IR et elle était associée positivement d'une part à la MSI en premier puis au métabolisme protéique (TFDMS, dégradation intracellulaire, activité enzyme catabolique), et d'autre part à l'EUA, le gain résiduel et au dépôt de muscle dans la carcasse. L'analyse ACP renforce les conclusions sur les variables évaluées dans cette thèse, en montrant une cohérence entre les variables associées à l'EA, à la composition corporelle et aux performances. Cependant, il peut aussi être observé dans la Figure de l'ACP (cf les axes) qu'une partie dépend plutôt des phénomènes de régulation métabolique propres à l'individu, et donc, probablement associés au classement de l'IR.

Résumé : *Evaluation du métabolisme protéique comme déterminant des variations individuelles d'efficacité alimentaire chez le bovin en engraissement*

Le turnover protéique correspond au taux de synthèse et de dégradation protéique ne donnant pas lieu à un changement de masse protéique mais servant à renouveler les protéines corporelles, ce qui est vital pour l'entretien et la survie des animaux. Néanmoins, ce mécanisme impacte fortement les dépenses énergétiques de l'animal ainsi que l'utilisation métabolique de l'azote. Le turnover protéique a été suggéré comme étant un déterminant majeur des variations inter-individuelles de l'efficacité alimentaire (EA) chez le ruminant. Les animaux de rente les plus efficaces seront ceux qui adoptent une stratégie conduisant à un faible turnover protéique mais probablement en détriment de leur robustesse. Le travail de thèse vise à i) évaluer à l'échelle individuelle le lien existant entre le taux de transfert de l'azote alimentaire dans le gain [efficacité d'utilisation de l'azote (EUA): N retenu/N ingéré] et le classement des animaux selon différents indices d'EA, ii) étudier l'effet du classement de l'ingéré résiduel (IR) des animaux sur le métabolisme et le turnover protéique, la composition corporelle et les dépenses énergétiques et iii) analyser les mécanismes moléculaires mis en jeu dans les différences de turnover protéique observées. Cette étude a été réalisée chez des taurillons Charolais alimentés avec deux régimes d'engraissement contrastés (riche en amidon vs riche en fibre) au cours de deux études différentes. Dans la première, l'EUA a été évaluée à travers un biomarqueur plasmatique ($\delta^{15}\text{N}$) sur 600 jeunes bovins. Dans la deuxième étude l'IR a été évalué sur 100 jeunes bovins phénotypés avec les deux mêmes régimes contrastés après un premier test d'EA. Les 32 animaux les plus extrêmes (8 efficaces vs 8 inefficaces par régime) ont été sélectionnés pour réaliser des mesures de turnover protéique avec des méthodes de référence (excrétion urinaire de 3-méthyl-histidine) ou indirectes (turnover isotopique). La rétention d'azote a été mesurée chez les animaux extrêmes à partir des résultats de bilan d'azote réalisé en stalle de digestibilité (10 j) et à partir de la composition corporelle déterminée au début du test d'EA et à l'abattage. La dépense énergétique a été estimée d'après la consommation d'oxygène mesurée par Greenfeed® sur les animaux extrêmes. Enfin les tissus musculaires et hépatiques prélevés à l'abattoir ont été analysés par western-blot et analyses enzymatiques afin d'évaluer les voies moléculaires impliquées dans la synthèse et la dégradation protéique. Avec l'utilisation du $\delta^{15}\text{N}$ plasmatique, une corrélation négative a été démontrée entre l'EUA et les valeurs d'IR quel que soit le régime utilisé. Les animaux les moins efficaces selon l'IR semblent plus gaspiller l'azote alimentaire que les animaux les plus efficaces quel que soit le régime alimentaire utilisé. Ce lien a été ensuite confirmé avec un sous-dispositif d'animaux extrêmes sur l'IR lorsque la rétention azotée a été estimée à partir des données de composition corporelle, mais pas en revanche à partir du bilan d'azote. La plus grande EUA des animaux efficaces a été accompagnée d'une dépense énergétique plus faible, d'une taille du rumen plus petite et d'un rendement carcasse plus élevé avec une forte proportion de muscle dans la carcasse. Cependant, des tendances numériques observées avec les deux dispositifs expérimentaux suggèrent une plus forte relation entre l'EUA et l'IR chez des animaux nourris avec un régime riche en amidon comparé à un régime riche en fibre. Le turnover protéique pourrait être à l'origine de cette relation régime-dépendant entre l'IR et l'EUA. Ainsi, les animaux efficaces selon l'IR ont présenté un turnover protéique plus faible, en termes de dégradation protéique du muscle squelettique, que les animaux inefficaces mais seulement avec le régime riche en amidon. Une absorption de nutriments glucogéniques contrastée, mais aussi probablement plus rapide, entre les deux régimes semble être responsable d'une réponse insulinaire très différente, signal clé de l'état d'activation des voies moléculaires de la synthèse et dégradation protéique. Les résultats de cette thèse confirment l'hypothèse d'un métabolisme protéique ralenti mais plus efficace chez les animaux efficaces quant à leur ingéré résiduel lorsque les animaux sont alimentés avec des régimes riches en amidon.

Mots-clés : Efficacité alimentaire ; Variabilité individuelle ; Turnover protéique ; Bovin viande

Abstract: *Evaluation of protein metabolism as a determinant of individual variations in feed efficiency in fattening cattle*

Protein turnover is the rate of protein synthesis and degradation that does not result in a change in protein mass but serves to renew body proteins, which is vital for the maintenance and survival of animals. Nevertheless, this mechanism strongly impacts the energy expenditure of the animal as well as the metabolic use of nitrogen. Protein turnover has been suggested as a major determinant of inter-individual variation in feed efficiency (FE) in ruminants. The most efficient livestock will be those that adopt a strategy leading to low protein turnover but probably at the expense of their robustness. The aim of this study is to i) evaluate at the individual level the link between the rate of transfer of dietary N into gain [N use efficiency (NUE): retained N/intake N] and the ranking of animals according to different indices of FE, ii) study the effect of the ranking of residual feed intake (RFI) of animals on metabolism and protein turnover, body composition and energy expenditure and iii) analyze the molecular mechanisms involved in the observed differences in protein turnover. This study was carried out in Charolais bulls fed two contrasting fattening diets (high starch vs. high fiber) in two different studies. In the first study, protein efficiency was assessed through a plasma biomarker ($\delta^{15}\text{N}$) in 600 young cattle. In the second study FE was evaluated on 100 young cattle phenotyped with the same two contrasting diets after an initial FE test. The 32 most extreme animals (8 efficient vs 8 inefficient per diet) were selected to measure protein turnover using reference (urinary 3-methyl-histidine excretion) or indirect (isotope turnover) methods. Nitrogen retention was determined in extreme animals from nitrogen balance data performed in digestibility stall (10 d) and from body composition determined at the beginning of the EA test and at slaughter. The energy expenditure was estimated from the oxygen consumption measured by Greenfeed® on the extreme animals. Finally, muscle and liver tissues collected at slaughter were analyzed by western-blot and enzymatic analyses to evaluate the molecular pathways involved in protein synthesis and degradation. With the use of plasma $\delta^{15}\text{N}$, a negative correlation was demonstrated between NUE and RFI values regardless of the diet used. The least efficient animals by RFI appeared to waste more dietary N than the most efficient animals regardless of diet used. This link was then confirmed with a sub-set of extreme animals on RFI when nitrogen retention was estimated from body composition data, but not from nitrogen balance. The improved NUE of efficient animals was accompanied by lower energy expenditure, smaller rumen size and higher carcass yield with a higher proportion of muscle in the carcass. However, numerical trends observed with both experimental set-ups suggest a stronger relationship between NUE and RFI in animals fed a high starch diet compared to a high fiber diet. Protein turnover could be at the origin of this diet-dependent relationship between RFI and NUE. Thus, the RFI-efficient animals showed a lower protein turnover, in terms of skeletal muscle protein breakdown, than the inefficient animals but only on the high starch diet. A contrasted, but probably also faster, absorption of glucogenic nutrients between the two diets seems to be responsible for a very different insulin response, a key signal of the activation state of the molecular pathways of protein synthesis and degradation. The results of this thesis support the hypothesis that protein metabolism is slowed down but more efficient in animals that are efficient in their residual feed intake when fed starch-rich diets.

Key words: Feed efficiency; Individual variability; Protein turnover; Beef cattle