

Modélisation de l'impact de la macroalgue *Asparagopsis taxiformis* sur la fermentation microbienne du rumen

MUÑOZ-TAMAYO R. (1), CHAGAS J.C. (2), RAMIN M. (2), KRIZSAN S.J. (2)

(1) Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, UMR Modélisation Systémique Appliquée aux Ruminants, 75005, Paris, France.

(2) Department of Agricultural Research for Northern Sweden, Swedish University of Agricultural Sciences (SLU), Skogsmarksgränd, 90183 Umeå, Sweden.

RESUME

La macroalgue rouge *Asparagopsis taxiformis* est un puissant additif naturel pour réduire la production de méthane des bovins. *A. taxiformis* contient plusieurs composés antiméthanogènes dont le bromoforme qu'inhibe directement la méthanogenèse. L'activité antimicrobienne d'*A. taxiformis* affecte également d'autres groupes microbiens du microbiote ruminal, ce qui entraîne des changements dans le profil de fermentation qui à leur tour peuvent avoir des effets négatifs sur la santé et la productivité des animaux. Les effets positifs et négatifs d'*A. taxiformis* sur le microbiote ruminal dépendent de sa dose. Ces effets s'expriment de façon dynamique. Il est donc essentiel de caractériser la réponse dynamique de la fermentation microbienne du rumen pour identifier les conditions optimales d'utilisation d'*A. taxiformis* comme additif alimentaire pour la réduction du méthane. L'objectif de ce travail était de modéliser l'effet de la supplémentation d'*A. taxiformis* sur la fermentation microbienne du rumen *in vitro*. Nous avons adapté un modèle mathématique publié de fermentation du rumen pour prendre en compte l'effet d'*A. taxiformis* sur la fermentation ruminale. Les paramètres du modèle ont été estimés par calibration à l'aide de données expérimentales issues d'une étude *in vitro* évaluant l'impact d'*A. taxiformis* sur la fermentation et la production de méthane. Notre modèle a capturé de façon adéquate l'effet d'*A. taxiformis* sur le profil dynamique des acides gras volatils et du méthane. Des améliorations du modèle sont en cours. Ces résultats montrent le potentiel de notre modèle comme outil de prédiction de la fermentation microbienne du rumen. Nous travaillons sur des extensions de modèle pour prendre en compte des conditions *in vivo*. Nous espérons que nos développements en modélisation puissent être utiles pour la conception des stratégies d'alimentation pour la réduction du méthane en maximisant la productivité et santé des animaux.

Modelling the impact of the macroalgae *Asparagopsis taxiformis* on rumen microbial fermentation

MUÑOZ-TAMAYO R. (1), CHAGAS J.C. (2), RAMIN M. (2), KRIZSAN S.J. (2)

(1) Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, UMR Modélisation Systémique Appliquée aux Ruminants, 75005, Paris, France.

SUMMARY

The red macroalgae *Asparagopsis taxiformis* is a potent natural supplement for reducing methane production from cattle. *A. taxiformis* contains several antimethanogenic compounds including bromoform that inhibits directly methanogenesis. The antimicrobial activity of *A. taxiformis* impacts as well other microbial groups of the rumen microbiota producing changes in the fermentation profile that may have detrimental effects on animal health and productivity. The positive and adverse effects of *A. taxiformis* on the rumen microbiota are dose-dependent and operate in a dynamic fashion. It is therefore key to characterize the dynamic response of the rumen microbial fermentation for identifying optimal conditions on the use of *A. taxiformis* as a dietary supplement for methane mitigation. Accordingly, the objective of this work was to model the effect of *A. taxiformis* supplementation on the rumen microbial fermentation under *in vitro* conditions. We adapted a published mathematical model of rumen microbial fermentation to account for *A. taxiformis* supplementation. Model parameters were estimated by calibration using experimental data from a published *in vitro* study assessing the dose-response impact of *A. taxiformis* on rumen fermentation. Our model captured adequately the effect of *A. taxiformis* on the dynamic profile of volatile fatty acids and methane. Work for model improving is ongoing. These results indicated the potential of our model as prediction tool of the rumen microbial fermentation. We are working on model extensions to account for *in vivo* conditions. We expect our model developments can be useful to help the design of nutritional strategies for methane mitigation that maximize health and animal productivity.

INTRODUCTION

La macroalgue rouge *Asparagopsis taxiformis* est un puissant additif naturel pour réduire la production de méthane des ruminants (Machado *et al.*, 2014; Roque *et al.*, 2019). Des études rapportant une réduction du méthane entérique entre 40 et 98 % (selon la dose) chez des bovins sans effets négatifs sur l'ingestion, l'efficacité alimentaire et le fonctionnement du rumen (Kinley *et al.*, 2020). La réduction de la production de méthane par l'addition de *A. taxiformis* se traduit par une

augmentation de l'hydrogène fermentaire érécté par l'animal. Le pouvoir anti-méthanogène d'*A. taxiformis* résulte de l'action de ses multiples métabolites secondaires ayant des activités antimicrobiennes dont le bromoforme (Machado *et al.*, 2016b). Après une augmentation de la concentration de bromoforme dans le rumen en raison de son ajout dans le repas, la concentration de bromoforme diminue en raison de sa participation aux réactions chimiques et au transit ruminal. En plus de l'effet direct sur la méthanogenèse, la supplémentation d'*A. taxiformis* a un impact sur le profil de fermentation. Les

changements de fermentation peuvent avoir des effets néfastes sur la santé et la productivité des animaux. Les effets positifs et négatifs d'*A. taxiformis* sur le microbiote ruminal dépendent de la dose (Machado *et al.*, 2016a) et fonctionnent de manière dynamique. Il est donc essentiel de caractériser la réponse dynamique de la fermentation microbienne du rumen pour identifier les conditions optimales d'utilisation de *A. taxiformis* comme supplément alimentaire pour la réduction du méthane entérique chez les ruminants. Le développement de modèles mathématiques dynamiques fournit des outils précieux pour l'évaluation des stratégies d'alimentation et de réduction du méthane (Ellis *et al.*, 2012). L'objectif de ce travail était de modéliser l'effet de la supplémentation d'*A. taxiformis* sur la dynamique de la fermentation microbienne du rumen dans des conditions *in vitro*.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. DONNEES EXPERIMENTALES IN VITRO

Les paramètres du modèle associés aux cinétiques de conversion microbienne et à la distribution du flux d'utilisation du substrat ont été estimés par calibration à l'aide de données expérimentales issues d'une étude *in vitro* évaluant l'impact d'*A. taxiformis* sur la fermentation et la production de méthane (Chagas *et al.*, 2019). Dans cette étude, la fermentation *in vitro* a été réalisée avec un inoculum de rumen provenant de deux vaches pie rouge de Suède en lactation pendant une période d'incubation de 48 h. Les vaches recevaient un régime à base de fléole des prés, d'orge et de tourteau de colza dans un rapport de 545:363:92 g/kg de matière sèche (MS) et une composition de 94,4 % de matière organique, 16 % de protéines brutes et 38,7 % de fibres insolubles au détergent neutre (NDF). *A. taxiformis* a été supplémenté à six niveaux de traitement (0, 0,06, 0,13, 0,25, 0,5 et 1,0 % de la matière organique du régime alimentaire). La teneur en bromoforme d'*A. taxiformis* était de 6,84 mg / g MS. La fermentation *in vitro* a été effectuée dans un système entièrement automatisé qui permet un enregistrement continu de la production de gaz (Ramin et Huhtanen, 2012). La production de méthane a été mesurée à 0, 2, 4, 8, 24, 36 et 48 h. Les acides gras volatils (AGV) ont été mesurés à 0, 8, 24 et 48 h. Pour la calibration du modèle (estimation des paramètres), nous n'avons considéré que les données jusqu'à 24 h, car la fermentation microbienne s'est arrêtée à ce moment.

1.2. MODELISATION MATHÉMATIQUE

Nous avons adapté le modèle mathématique de fermentation du rumen (Muñoz-Tamayo *et al.*, 2016) pour prendre en compte l'effet d'*A. taxiformis* sur la fermentation ruminale. Dans le modèle, le microbiote du rumen est représenté par trois groupes microbiens fonctionnels, à savoir les utilisateurs de sucres, les utilisateurs d'acides aminés et les utilisateurs d'hydrogène (méthanogènes). La Figure 1 montre une représentation schématique du modèle mathématique.

Le modèle comporte 18 variables d'état (compartiments sur la Figure 1). Le modèle est décrit par des équations différentielles ordinaires de la forme suivante :

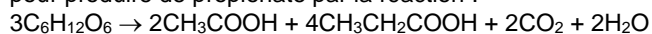
$$\frac{d\xi}{dt} = S \cdot \rho(\xi, \mathbf{p}) - \mathbf{g}(\xi, \mathbf{p})$$

Où ξ est le vecteur des variables d'état (métabolites), $\rho(\cdot)$ est une fonction vectorielle avec les taux cinétiques d'hydrolyse et d'utilisation du substrat (glucose, acides aminés, hydrogène). Les taux d'hydrolyse sont décrits par une cinétique de premier ordre. Les taux d'utilisation du substrat sont décrits par la cinétique de Monod. S est la matrice de stoechiométrie contenant les facteurs de rendement ($Y_{i,j}$) de chaque métabolite (i) pour chaque réaction (j), $\mathbf{g}(\cdot)$ est une fonction vectorielle avec les équations représentant les phénomènes de transport (transfert liquide-gaz), et \mathbf{p} est le vecteur des paramètres du modèle.

Dans notre modèle, l'impact d'*A. taxiformis* sur la fermentation et la production de méthane a été attribué au taux maximal d'utilisation de l'hydrogène pour la méthanogenèse (k_{m,H_2} , mol/(mol h)) et aux paramètres associées à la distribution des flux dans le métabolisme de glucose pour la production des AGVs (λ_1, λ_2). Le paramètre λ_1 désigne la fraction molaire de glucose utilisée pour produire de l'acétate par la réaction :



Le paramètre λ_2 désigne la fraction molaire de glucose utilisée pour produire de propionate par la réaction :



La stoechiométrie de la production d'AGV à partir d'acides aminés a été fixée constante comme dans la première version du modèle (Muñoz-Tamayo *et al.*, 2016).

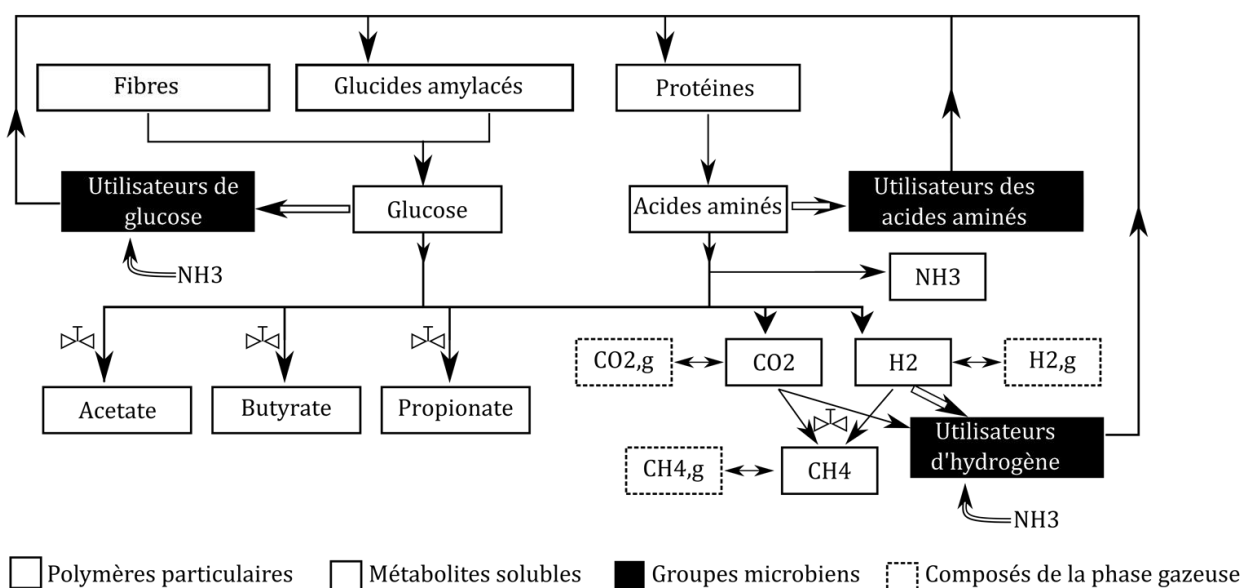


Figure 1 Représentation du modèle de fermentation du rumen (adapté de (Muñoz-Tamayo *et al.*, 2016)). L'hydrolyse des glucides (fibres et non-fibres) et des protéines libère respectivement des sucres et des acides aminés solubles qui sont ensuite utilisés par le microbiote. L'utilisation du substrat est dirigée vers la formation de produits (flèches simples) et la croissance microbienne (flèches doubles). Chaque substrat est utilisé par un seul groupe fonctionnel microbien. Le symbole ⋈ indique les effets d'*A. taxiformis* sur la fermentation du rumen. *A. taxiformis* inhibe la production de méthane et impacte la distribution des flux pour la production d'AGV.

Il est déduit que la fraction molaire λ_3 pour la production de butyrate est $\lambda_3 = 1 - (\lambda_1 + \lambda_2)$. Les paramètres λ_k ont été assumés comme spécifiques pour chaque dose d'*A. taxiformis*. Le taux maximal d'utilisation de l'hydrogène k_{m,H_2} a été paramétré comme une fonction linéaire par morceaux de la concentration initiale de bromoforme dans le milieu. L'estimation des paramètres a été effectuée avec la boîte à outils IDEAS Matlab (Muñoz-Tamayo *et al.*, 2009)(disponible en accès libre au <http://genome.jouy.inra.fr/logiciels/IDEAS>).

2. RESULTATS

2.1. PERFORMANCE DU MODÈLE

La Figure 2 compare les données dynamiques des variables de fermentation pour les niveaux d'*A. taxiformis* à 0,06 % et 0,5 % avec les variables prédites par le modèle. Dans l'ensemble, le modèle est capable de capturer la dynamique de la production de AGV et de méthane. La Figure 3 présente la comparaison de toutes les observations avec les prévisions du modèle, et le Tableau 1 montre les indicateurs statistiques de la performance du modèle.

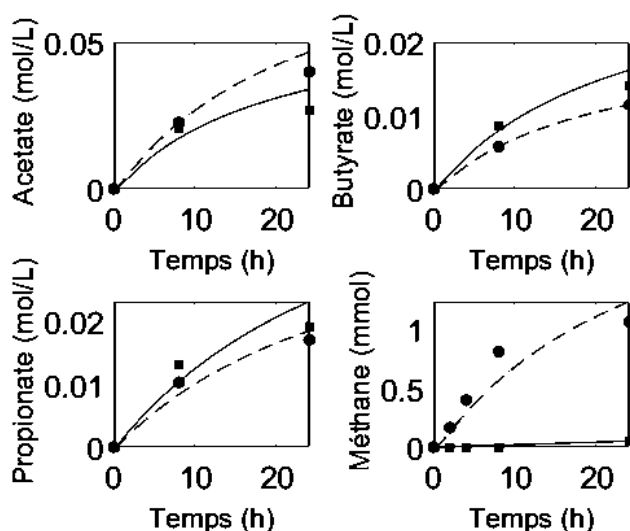


Figure 2 Exemple de calibration du modèle. Les données expérimentales des variables de fermentation pour les niveaux d'*A. taxiformis* à 0,06 % (●) and 0,5 % (■) sont comparées aux réponses prédites par le modèle en lignes pointillées (niveau 0,06 %) et en lignes pleines (niveau 0,5 % niveau).

	Acetate	Butyrate	Propionate	Methane
R ²	0,80	0,79	0,53	0,92
RMSE ^a	0,0043	0,0016	0,0027	0,1148
CCC ^b	0,92	0,90	0,85	0,96

^a Racine carrée de l'erreur quadratique moyenne

^b Coefficient de corrélation de concordance de Lin

Tableau 1 Indicateurs statistiques de la performance du modèle

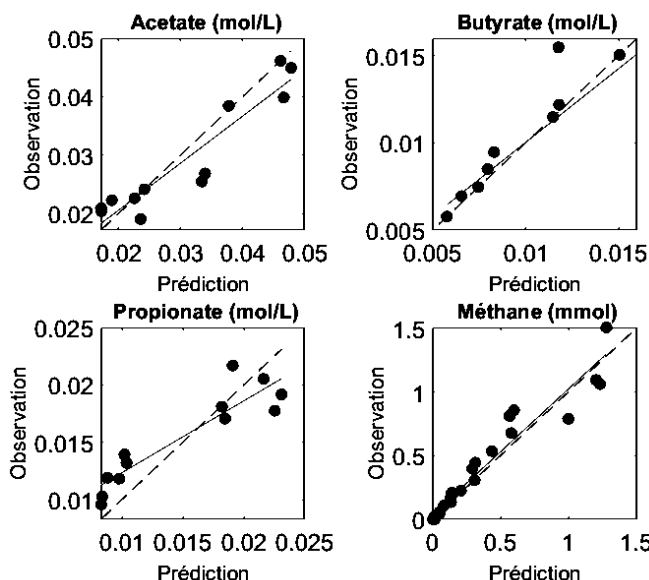


Figure 3 Les données expérimentales (●) pour de tous les traitements sont tracées en fonction des variables prédites par le modèle. Les lignes pleines sont les courbes linéaires ajustées. Les lignes pointillées sont les isoclines

2.2. PARAMÈTRES DU MODÈLE

Figure 4 montre les paramètres estimés du modèle associés à l'effet d'*A. taxiformis* sur la fermentation ruminale.

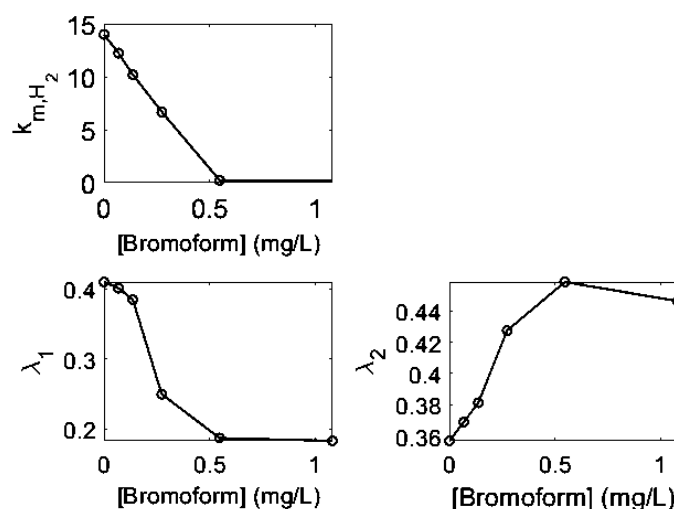


Figure 4 Paramètres estimés du modèle en fonction de la concentration initiale du bromoforme dans les différents traitements d'incorporation d'*A. taxiformis*. k_{m,H_2} : taux maximal d'utilisation de l'hydrogène pour la méthanogénèse, λ_1 : fraction molaire de glucose utilisée pour produire de l'acétate, λ_2 : fraction molaire de glucose utilisée pour produire de propionate

3. DISCUSSION

Notre modèle a fourni une représentation adéquate de l'effet d'*A. taxiformis* sur la dynamique de la fermentation du rumen et la production de méthane. Cependant, des travaux supplémentaires sont nécessaires pour améliorer les performances du modèle, comme par exemple la représentation de la dynamique de propionate. Nous avons modélisé l'effet d'*A. taxiformis* en fonction de la concentration

initiale de bromoforme dans le milieu. Cependant, l'effet d'*A. taxiformis* sur l'inhibition de la méthanogenèse et la distribution des flux dans l'utilisation du glucose se produisent de manière dynamique. Alors, des équations dynamiques d'inhibition et de régulation devraient ensuite être davantage incorporées dans notre modèle. Par exemple, une des extensions du modèle concerne l'incorporation du contrôle de l'hydrogène sur la fermentation. En raison de la réduction de la production de méthane, l'hydrogène s'accumule et peut avoir un impact sur le profil de fermentation via la régulation du potentiel redox du couple NADH/NAD⁺. Des données dynamiques de la pression partielle d'hydrogène et de la concentration de bromoforme seront nécessaires pour valider ce modèle étendu. Étant donné que le modèle actuel a été calibré avec un petit nombre de données expérimentales, une validation avec des données indépendantes est requise.

CONCLUSION

Nous avons développé un modèle de fermentation ruminale qui intègre l'effet de l'addition de la macroalgue *A. taxiformis*. Nos résultats montrent le potentiel de notre modèle comme outil de prédiction de la fermentation microbienne du rumen. Nous travaillons sur des extensions de modèle pour prendre en compte des conditions *in vivo*. Nous espérons que nos développements en modélisation puissent être utiles pour la conception des stratégies d'alimentation pour la réduction du méthane en maximisant la productivité et la santé des animaux.

Les auteurs remercient le financement du projet FACCE ERA GAS 'RumenPredict' grant 16/RD/ERAGAS/1RUMENPREDICT-ROI2017 (<https://www.eragas.eu/en/eragas/Research-projects/RumenPredict.htm>). Rafael Muñoz-Tamayo remercie le financement du projet H2020-SFS-2018-1 project MASTER-818368 (<https://www.master-h2020.eu/>).

Chagas, J.C., Ramin, M., Krizsan, S.J. 2019. *Animals* 9,1120
Ellis, J.L., Dijkstra, J., France, J., Parsons, A.J., Edwards, G.R., Rasmussen, S., Kebreab, E., Bannink, A. 2012. *J Dairy Sci* 95, 272–285
Kinley, R.D., Martinez-Fernandez, G., Matthews, M.K., de Nys, R., Magnusson, M., Tomkins, N.W. 2020. *J Clean Prod* 259, 120836
Machado, L., Magnusson, M., Paul, N.A., De Nys, R., Tomkins, N. 2014. *PLoS One* 9, e85289
Machado, L., Magnusson, M., Paul, N.A., Kinley, R., de Nys, R., Tomkins, N. 2016a. *J Appl Phycol* 28, 1443–1452
Machado, L., Magnusson, M., Paul, N.A., Kinley, R., de Nys, R., Tomkins, N. 2016b. *J Appl Phycol* 28, 3117–3126
Muñoz-Tamayo, R., Laroche, B., Leclerc, M., Walter, E. 2009. *IFAC Proceedings* 42, 1271–1276
Muñoz-Tamayo, R., Giger-Reverdin, S., Sauvant, D. 2016. *Anim Feed Sci Technol* 220, 1–21
Ramin, M., Huhtanen, P. 2012. *Anim Feed Sci Technol* 174, 190–200
Roque, B.M., Brooke, C.G., Ladau, J., Polley, T., Marsh, L.J., Najafi, N., Pandey, P., Singh, L., Kinley, R., Salwen, J.K., Eloe-Fadrosh, E., Kebreab, E., Hess, M. 2019. *Animal Microbiome* 1,3.