



HAL
open science

Les acides gras libres, de potentiels indicateurs précoces du risque de développer des perturbations/maladies postpartum chez la vache laitière ?

Lisa Grell

► To cite this version:

Lisa Grell. Les acides gras libres, de potentiels indicateurs précoces du risque de développer des perturbations/maladies postpartum chez la vache laitière ?. Agronomie. 2022. dumas-04337874

HAL Id: dumas-04337874

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-04337874v1>

Submitted on 12 Dec 2023

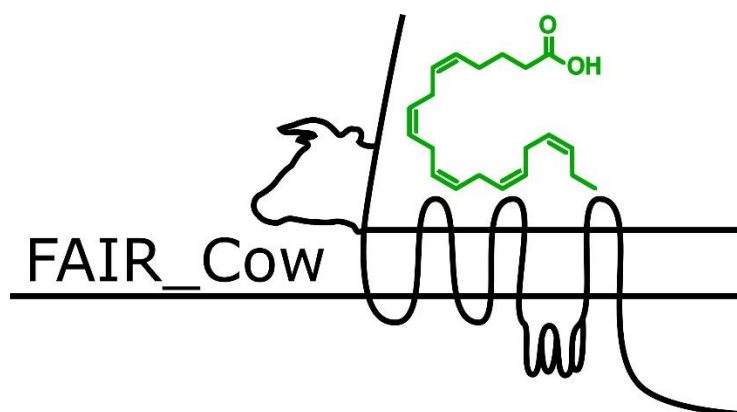
HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

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.

Mémoire de fin d'études

Présenté pour l'obtention du Diplôme d'Ingénieur Agronome
Option : Systèmes d'élevage

**Les acides gras libres, de potentiels indicateurs précoces du
risque de développer des perturbations/maladies
postpartum chez la vache laitière ?**



Par Lisa GRELL

Année de soutenance : 2022

Organisme d'accueil :

INRAE Centre Clermont Auvergne Rhône Alpes – UMR Herbivore

Mémoire de fin d'études

**Présenté pour l'obtention du Diplôme d'Ingénieur Agronome
Option : Systèmes d'élevage**

**Les acides gras libres, de potentiels indicateurs précoces du
risque de développer des perturbations/maladies *postpartum*
chez la vache laitière ?**

Par Lisa GRELL

Année de soutenance : 2022

**Mémoire préparé sous la direction
de : Philippe HASSOUN
Présenté le : 12/10/2022**

**Organismes d'accueil :
INRAE Centre Clermont Auvergne
Rhône Alpes – UMR Herbivore**

Devant le jury :

Jean-Baptiste MENASSOL
Rapporteur école
(L'institut Agro Montpellier)

Philippe HASSOUN
Enseignant référent
(INRAE)

Eliel GONZALEZ-GARCIA
Rapporteur principal
(INRAE)

Maître de stage :

Guillaume DURAND

Résumé

La période de transition chez la vache laitière est une étape clé dans le cycle de l'animal qui doit s'adapter à d'importants changements nutritionnels, métaboliques et immunitaires. Des perturbations métaboliques ou des maladies peuvent survenir notamment au début de la lactation où le déficit énergétique est le plus important. Pour éviter que ces troubles viennent impacter les performances de l'animal, il faudrait déterminer des indicateurs suffisamment précoces pour pouvoir repérer les animaux qui doivent bénéficier d'une attention particulière. Les acides gras non estérifiés (AGNE), étant des molécules déjà indicatrices de troubles et des molécules actives dans la régulation de différentes fonctions métaboliques, sont des bons candidats. Pendant la période de tarissement, leurs compositions plasmatiques pourraient être des indicateurs de l'apparition de perturbations ou de maladies lors de la lactation suivante. L'objet de cette étude est donc de tester cette hypothèse. Des prélèvements de plasma sont réalisés sur la période de tarissement et sur le début de la lactation de vaches laitières de race Holstein (n = 19), Jersiaises (n = 11) et Normandes (n = 27) multipares. Trois stratégies d'alimentation sont appliquées : une complètement à l'herbe sans apport de concentré (C0), une avec apport de concentré pendant les 100 premiers jours de lactation (C1) et une avec apport de concentré pendant les 100 derniers jours de lactation (C3). Leurs compositions plasmatiques en AGNE au début du tarissement (6 semaines avant le vêlage) sont analysées par chromatographie en phase gazeuse (GC – FID). Les effets de la race et de l'alimentation sur les profils en acides gras libres sont faibles, ils ne sont pas pris en compte dans la construction de nos groupes. Les animaux sont séparés en différentes classes en fonction de leur état métabolique et sanitaire : les animaux sains (n = 43), les animaux avec une maladie clinique (n = 7), les animaux en stress métabolique (n = 7). Nos résultats ne permettent pas d'identifier d'AGNE de manière individuelle ou combinée comme des indicateurs précoces associés à une maladie ou un stress. La précocité du point analysé et les différents facteurs de variations de l'expérimentation peuvent impacter nos résultats. Des analyses complémentaires en cours ou à venir dans le cadre du projet permettront de tester ces nouvelles hypothèses.

Mots clés

Acides gras non estérifiés, vache laitière, période de transition, adaptation, perturbations métaboliques, maladies *postpartum*

Abstract

Title: Free fatty acids, potential early indicators of the risk of developing *postpartum* disorders / diseases in dairy cows?

The transition period in dairy cows is a key stage in the animal's cycle as it must adapt to important nutritional, metabolic and immune changes. Metabolic disorders or diseases can occur, especially at the beginning of lactation when the energy deficit is the most important. To prevent these disturbances from impacting the animal's performance, indicators should be determined early enough to identify animals that need special attention. Non-esterified fatty acids (NEFA), being molecules that are already indicators of disorders and active in the regulation of different metabolic functions, are good candidates. During the dry period, their plasma compositions could be indicators of the appearance of disorders or diseases during the following lactation. The purpose of this study is to test this hypothesis. Plasma samples were taken during the dry period and early lactation from multiparous Holstein (n = 19), Jersey (n = 11) and Normande (n = 27) dairy cows. Three feeding strategies were applied: a complete grass diet without concentrate (C0), a diet with concentrate during the first 100 days of lactation (C1) and a diet with concentrate during the last 100 days of lactation (C3). Their plasma NEFA compositions at the beginning of dry-off (6 weeks before calving) were analysed by gas chromatography (GC – FID). Diet and breed effects on NEFA profiles are minor and are not considered in the construction of our groups. Animals are separated into different classes according to their metabolic and health status: healthy animals (n = 43), animals with clinical disease (n = 7), animals under metabolic stress (n = 7). Our results do not allow us to identify NEFA individually or in combination as early indicators associated with disease or stress. The earliness of the analysed point and the different factors of variation in the experiment may impact our results. Further analyses underway in the project will test these new hypotheses.

Key words

Free fatty acids, dairy cow, transition period, adaptation, metabolic disorders, *postpartum* diseases

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier tout particulièrement Guillaume Durand mon maître de stage pour m'avoir offert l'opportunité de travailler avec lui. Je lui suis reconnaissante pour son accueil, le temps passé ensemble, le partage de ses connaissances et son encadrement. Il a toujours su se montrer disponible, bienveillant et à l'écoute tout au long de ce stage. Je le remercie pour sa bonne humeur permanente et la bonne ambiance qu'il crée tous les jours au labo. C'était un plaisir de partager la dernière étape de mes études à ses côtés. Je lui souhaite plein de réussites dans la suite de ses recherches et de son projet ANR.

Je remercie l'ensemble de l'équipe Biomarqueurs pour leur chaleureux accueil au sein de l'UMR H. Un grand merci à Sylvain Emery pour son accompagnement sur la partie expérimentale, ses explications techniques sur les dosages des acides gras et son aide dans leur réalisation. Merci également à Martine Tourret pour ses analyses de métabolites. J'ai apprécié travailler à vos côtés. Je remercie aussi Carole Delavaud et José Pires pour les conseils et les connaissances qu'ils m'ont apporté au cours de ce stage.

Je tiens à remercier également l'équipe du bâtiment Margaux à Bordeaux Science Agro pour leur chaleureux accueil au début et à la fin de mon stage. Un grand merci à Alexandre Conanec pour son aide et son accompagnement sur l'analyse statistique de mes résultats.

Je remercie mon tuteur enseignant, Philippe Hassoun pour son encadrement, ses relectures et sa disponibilité pendant ces 6 mois de stage de fin d'études. Merci à l'équipe pédagogique de la spécialité Systèmes d'élevage (SYSTEL) et à l'ensemble de l'équipe enseignante de l'Institut Agro Montpellier pour ces 4 années d'études riches en apprentissages et expériences.

Je tiens à remercier mes amis qui étaient en stage dans les différents sites INRAE autour de Clermont-Ferrand pour tous les bons moments passés ensemble, avec une pensée particulière pour Tiphaine et Zoé qui ont éclairé mon séjour Auvergnat. Je remercie également Charline qui m'apporte son soutien, ses avis et corrections, et son amitié même depuis l'autre bout du monde.

Enfin, je tiens bien évidemment à remercier mes parents pour leur soutien, leur compréhension et leur amour permanent qui m'accompagnent au quotidien. Leurs nombreuses relectures et conseils sur mes différents travaux m'ont été très précieux tout au long de mes études.

Sigles et acronymes

AGNE (ou NEFA en anglais) = Acide gras non estérifié (Non esterified fatty acid)

ANOVA = Analyse de la variance (Analysis of variance)

AST = Aspartate aminotransférase

ATP = Adénosine triphosphate

BHB = Béta hydroxybutyrate

CPG (ou GC en anglais) = Chromatographie en phase gazeuse (Gas chromatography)

DAC = Distributeur automatique de concentré

EDTA = Ethylène diamine tétra acétique

EMAG = Ester méthylique d'acide gras

FAIR_Cow =

FSH = Hormone folliculostimulante

GC FID = Chromatographie en phase gazeuse avec détecteur à ionisation de flamme

INRAE = Institut nationale de la recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement

LASSO = Least Absolute Shrinkage and Selection Operator

LDH = Lactase déshydrogénase

LH = Hormone lutéinisante

NADH = Nicotinamide adénine dinucléotide

NEC = Note d'état corporelle

NI = Non identifié

IDH = L-iditol déshydrogénase

CCS (ou SCC en anglais) = Comptage des cellules somatiques (Somatic cell count)

SPE = Séparation

TB = Taux butyreux

TP = Taux protéique

VLDL = Very low density lipoprotein

Table des figures

Figure 1 : Schéma simplifié des différentes voies métaboliques impliquées dans la réponse au déficit glycémique après la parturition (Source personnelle)	14
Figure 2 : Schéma récapitulatif des enjeux de la période de transition (source personnelle)	18
Figure 3 : Répartition des coûts d'une rétention placentaire chez la vache laitière, adaptée d'après l'étude de Mahnani et al., (2021)	21
Figure 4 : Dynamique des concentrations plasmatiques des AGNE et du BHB chez la vache laitière en stress métabolique avant la ration du matin, adapté d'après les données de Pires et al. (2013).....	22
Figure 5 : Calendrier d'alimentation des vaches laitières dans le cadre de l'étude de FAIR_Cow	27
Figure 6 : Extrait de chromatogramme avec identification des acides gras dans la zone des C18 trans et cis pour la vache n°7504 au point de prélèvement S-6.....	30
Figure 7 : Comparaison des courbes de lactation entre la moyenne des Normandes de l'expérimentation et la vache N°9073 présentant une anomalie en semaine 6 et 7 de lactation	32
Figure 8 : Dynamique des métabolites plasmatiques des différentes classes de notre échantillon à S-2, J10 et J20 (test statistique : Anova à 2 facteurs avec mesures répétées, résultats non significatifs sauf pour le BHB entre SAIN et STRESS à J10, * : p-value < 0.05)	35
Figure 9 : Heatmap des proportions relatives de chaque AGNE en fonction des classes.....	39
Figure 10 : Heatmap des concentrations relatives des AGNE en fonction des classes	41
Figure 11 : Sortie du logiciel R sur la régression Group-Lasso pour le modèle expliquant la variable "PROBLEME" sans validation croisée (à gauche) et avec validation croisée (à droite)	43
Figure 12 : Ratio C18 : 1n-9 / C22 : 1n-9 entre les animaux sains et ceux ayant un BHB > 1,2 mM au point de prélèvement S-6 avant vêlage	45

Table des tableaux

Tableau 1 : Incidence moyenne des maladies postpartum dans 205 fermes laitières du Pays de la Loire (d'après les données de l'étude de (Fourichon et al., 2001)).....	19
Tableau 2 : Perte de production laitière en fonction des différents troubles observés sur la période de début de lactation (5 à 60 jours), d'après les données de l'étude (Nikkhah et al., 2021)	19
Tableau 3 : Pertes économiques en fonction des différents troubles observés sur la période de début de lactation (5 à 60 jours), d'après les données de l'étude (Nikkhah et al., 2021)	21
Tableau 4 : Répartition de l'échantillon en fonction de la race et de la conduite d'alimentation.....	27
Tableau 5 : Méthodes et références des dosages des métabolites des échantillons de FAIR_Cow ...	28
Tableau 6 : Répartition des animaux de notre échantillon dans les différentes classes en fonction de la race et du régime.....	33
Tableau 7 : Profil des AGNE majoritaires des animaux sains de notre échantillon à S-6 avant vêlage (les AGNE en proportion inférieure à 0,03% n'ont pas été représentés)	36
Tableau 8 : Comparaison de la composition des profils en AGNE en fonction de l'effet race (premier tableau), de l'effet régime (deuxième tableau) et de l'effet parité (troisième tableau) en proportion relative dans l'échantillon	37

Table des matières

RESUME	3
ABSTRACT.....	4
REMERCIEMENTS.....	5
SIGLES ET ACRONYMES.....	6
TABLE DES FIGURES	7
TABLE DES TABLEAUX.....	7
TABLE DES MATIERES.....	8
INTRODUCTION	11
PARTIE 1 : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	12
1. La période de <i>peripartum</i> est une étape critique chez la vache laitière.....	12
1.1. Le changement entre différents états physiologiques engendre des perturbations métaboliques.....	12
1.1.1. Le déficit énergétique apparait en fin de gestation et est aggravé en début de lactation	12
1.1.2. Des variations de la calcémie	12
1.1.3. Une immunodépression associée à la parturition.....	12
1.2. La transition entre la gestation et la lactation nécessite la coordination de réponses métaboliques adaptées	13
1.2.1. La mobilisation des réserves lipidiques est une adaptation métabolique au déficit énergétique	13
1.2.2. Le maintien d'une calcémie autour de valeurs stables est un enjeu au peripartum.....	14
1.3. Le développement de troubles et de maladies métaboliques ou infectieuses consécutifs aux troubles du <i>peripartum</i> est le résultat d'une mauvaise adaptation	15
1.3.1. La cétose est causée par un déficit énergétique trop marqué et par la présence de corps cétoniques dans le foie.....	15
1.3.2. La fièvre de lait résulte des contrastes importants du métabolisme du calcium	15
1.3.3. Les rétentions placentaires ont des origines calciques et immunitaires.....	15
1.3.4. Le déplacement de la caillette à gauche est causé par la conjonction de troubles du peripartum	16
1.3.5. Les maladies infectieuses principales : la mammites et la métrite.....	16
1.3.6. L'apparition d'une maladie postpartum va accroître le risque d'en développer d'autres.	17
2. Les troubles métaboliques ont des impacts majeurs sur la filière laitière	18
2.1. L'animal est impacté au niveau de sa santé et de sa production	18
2.1.1. L'occurrence des maladies postpartum chez la vache laitière	18
2.1.2. Impacts des maladies et des troubles métaboliques sur la production laitière	19
2.1.3. Impacts des maladies et des troubles métaboliques sur les performances de reproduction	20

2.2.	L'exploitation est impactée d'un point de vue économique	20
2.2.1.	Des pertes économiques causées par une diminution de la production laitière	20
2.2.2.	Les maladies engendrent des dépenses supplémentaires	21
3.	Les indicateurs impliqués dans les perturbations métaboliques	22
3.1.	Des molécules permettant de constater des perturbations métaboliques.....	22
3.1.1.	Les AGNE et le BHB sont des indicateurs du trouble et des maladies	22
3.1.2.	Les AGNE permettent d'annoncer des perturbations dès le parturum.....	23
3.2.	Certains AGNE seraient-ils des indicateurs précoces de l'apparition de troubles et maladies métaboliques ?.....	23
3.2.1.	Les AGNE sont impliqués dans de nombreuses voies de régulation du métabolisme ...	23
3.2.2.	La présence de certains AGNE est associée au risque de développer des maladies postpartum	24
4.	Conclusion	25
PARTIE 2 : ETUDE EXPERIMENTALE.....		26
5.	Matériels et méthodes	26
5.1.	Origine des animaux et des échantillons : l'expérimentation Tripl'XL	26
5.1.1.	Présentation du projet et de de ses objectifs principaux	26
5.1.2.	Conduite générale du troupeau	26
5.1.3.	La ration de base et les différentes stratégies de complémentation	26
5.1.4.	Description de l'échantillon : race et conduite alimentaire	27
5.1.5.	Prélèvements sanguins	27
5.1.6.	Données zootechniques disponibles	28
5.2.	Dosage des métabolites plasmatiques des animaux de l'échantillon	28
5.3.	Dosage de la composition des profils des AGNE plasmatiques	29
5.3.1.	Extraction des lipides du plasma basée sur la méthode de Folch adaptée (1957)	29
5.3.2.	Séparation des classes de lipides par extraction en phase solide (SPE)	29
5.3.3.	Méthylation des AGNE	29
5.3.4.	Chromatographie en phase gazeuse (CPG)	29
5.4.	Méthode d'analyse des résultats	30
5.4.1.	Analyse et corrections des chromatogrammes	30
5.4.2.	Analyses statistiques	31
6.	Résultats	31
6.1.	Détermination des classes de nos animaux.....	31
6.1.1.	Classe « MALADE »	31
6.1.2.	Classe « STRESS ».....	31
6.1.3.	Classes « SAIN » et « NI »	33
6.2.	Comparaison et analyse descriptive de notre échantillon	33
6.2.1.	Répartition des individus dans les différentes classes	33
6.2.2.	Comparaison des métabolites de nos différentes classes	34
6.2.3.	Composition en AGNE majoritaires de notre échantillon	35
6.3.	Impact de la race, du régime et de la parité sur les AGNE identifiés.....	36
6.4.	Recherche d'un AGNE indicateur précoce d'apparition d'une perturbation ou d'une maladie	38
6.4.1.	Variation inter-individuelle de la proportion relative de chaque AGNE par classe	38
6.4.2.	Variation inter-individuelle de la concentration relative de chaque AGNE par classe.....	40
6.5.	Recherche d'une combinaison d'AGNE qui indiquerait précocement l'apparition d'une perturbation ou d'une maladie	42
6.5.1.	Le modèle de régression logistique LASSO.....	42
6.5.2.	Application du modèle à nos données.....	42

7. Discussions et perspectives	44
8. Conclusion	46
BIBLIOGRAPHIE	47
ANNEXES	51

Introduction

J'ai réalisé mon stage de fin d'études à l'INRAE sur le site de Theix dans le centre Clermont Auvergne Rhône-Alpes au sein de l'équipe Biomarqueurs dans l'UMR Herbivores. Les travaux de recherche de cette équipe portent sur l'identification des mécanismes métaboliques et physiologiques qui contrôlent la plasticité des tissus déterminant les productions, l'efficacité et les réponses adaptatives des ruminants, et au développement d'outils de phénotypage des caractères de production et de qualité des produits. Mon maître de stage est Guillaume Durand, maître de conférences à Bordeaux Sciences Agro et chercheur associé INRAE. Le stage de 6 mois s'effectue dans le cadre du démarrage du projet ANR de Guillaume Durand, **FAIR_Cow** (Free fatty Acids receptors : Integrators of physiological status of daiRy COWs). La thématique sera ensuite poursuivie par une thèse pour une fin de projet en 2025.

Chez la vache laitière, la **période de transition** entre la fin de la gestation et le début de la lactation, aussi appelé le *peripartum*, est l'étape la plus critique du cycle de l'animal. Dans le cadre du projet FAIR_Cow, la période étudiée démarre au tarissement (environ 3 mois avant le vêlage) et se termine à la 14^{ème} semaine de lactation. La transition est une étape clé avec d'importantes modifications nutritionnelles, métaboliques, et immunitaires. Les animaux doivent s'adapter à des variations de rations, de demandes énergétiques et des changements physiologiques. Cette période est propice au **développement de troubles métaboliques et aux maladies**. Les risques sont d'autant plus importants que le potentiel de production laitière est élevé et que l'âge de l'animal est avancé. Mais il apparaît que des animaux de même âge, de même potentiel génétique et conduits de la même façon développent des sensibilités différentes aux maladies. Les réponses métaboliques des animaux sont le résultat de l'intégration de l'ensemble des facteurs de perturbations. Les molécules clés qui régulent ces réponses métaboliques sont encore peu connues, l'objectif serait donc de mieux les identifier. Parmi les molécules sécrétées au cours du *peripartum*, les **acides gras non estérifiés (AGNE)** sont intéressants car leur composition et leur quantité varient en fonction d'un certain nombre de critères comme la ration, le statut énergétique, le microbiote du rumen... Au cours des 20 dernières années, différentes études ont pu mettre en évidence le rôle de régulation des AGNE dans le métabolisme cellulaire. L'hypothèse du projet est que la composition plasmatique en AGNE va orienter l'animal vers **une adaptation ou une perturbation métabolique**. Ces AGNE pourraient être des indicateurs précoces du risque de développer des maladies *postpartum*.

L'objet de la synthèse est de faire le point sur le sujet du stage et les enjeux qui lui sont associés. Dans un premier temps, la période de transition, étape clé chez la vache laitière, est accompagnée de perturbations métaboliques pouvant être suivies de différents troubles et affections qui seront présentés. Dans un second temps, il apparaît que ces maladies ont un impact sur l'animal que ce soit au niveau de sa santé, de son bien-être et de ses performances de reproduction. Elles impactent également l'exploitation avec une baisse de la production laitière et des pertes économiques.

Partie 1 : Synthèse bibliographique

1. La période de *peripartum* est une étape critique chez la vache laitière

1.1. Le changement entre différents états physiologiques engendre des perturbations métaboliques

1.1.1. *Le déficit énergétique apparaît en fin de gestation et est aggravé en début de lactation*

La transition entre deux états physiologiques est associée à une variation des besoins de l'animal. Lors de la gestation, les demandes en énergie, protéines et minéraux augmentent considérablement à partir du 3^{ème} mois avant le vêlage. Le développement du fœtus et l'augmentation de l'activité des glandes mammaires pour la production de colostrum entraînent des besoins supplémentaires (Goff et Horst, 1997). En fin de gestation, les demandes protéiques et énergétiques d'une vache laitière sont respectivement 80% et 30% supérieures à celles d'une vache à l'entretien (tarie non gestante). Au début de la lactation, les besoins nutritionnels sont également 5 à 11 fois supérieurs à la période d'entretien selon le niveau de production de lait (Church, 1993). La satisfaction de la demande nutritionnelle à cette période est limitée par la capacité d'ingestion. En effet, à la fin de la gestation, l'utérus occupe une proportion de plus en plus importante de la cavité abdominale. Le volume du rumen se retrouve réduit d'environ un tiers (Goff et Horst, 1997). Juste après le vêlage, la capacité d'ingestion est réduite de 30 à 50% par rapport au moment du tarissement (Salat, 2005). En réponse à l'évolution des besoins, la prise alimentaire augmente de manière progressive. Il y a donc un écart entre la demande énergétique et la consommation réelle : le pic de production a lieu 6 à 8 semaines après le vêlage alors que le pic d'ingestion a lieu 12 à 15 semaines après (Church, 1993). Ce décalage entraîne un **déficit énergétique** qui oblige l'animal à mobiliser ses réserves corporelles ce qui se traduit par une augmentation des AGNE plasmatiques issus de cette mobilisation.

1.1.2. *Des variations de la calcémie*

Au cours des cycles de reproduction de la vache laitière, la calcémie, c'est-à-dire la concentration en calcium dans le sang, fluctue en fonction des apports et des besoins. En période de tarissement, les besoins calciques sont modérés et satisfaits par la ration. Après le vêlage, la production de colostrum et de lait augmente les besoins qui sont quasiment doublés (Salat, 2005). La plupart des animaux sont alors en hypocalcémie, c'est-à-dire en **déficit de calcium**. Au cours de la lactation, les apports suffisent à nouveau à satisfaire les besoins et la calcémie se stabilise à l'équilibre.

1.1.3. *Une immunodépression associée à la parturition*

Le système immunitaire des bovins se décompose en deux types d'immunité. L'une est innée avec des mécanismes de défense non spécifiques à un antigène. Elle est basée sur différents composants comme la barrière physique de la peau, les leucocytes (dont les macrophages et les neutrophiles), des cellules non immunitaires (cellules épithéliales et endothéliales), et d'autres médiateurs et facteurs physiologiques. L'autre est une immunité acquise, elle est déclenchée si la réponse innée est insuffisante, elle est spécifique d'un antigène et a une fonction mémoire qui permettra une réponse plus rapide et efficace en cas de nouvelle exposition à l'antigène (Sordillo et al., 2009).

Après la parturition, les animaux font face à une **immunodépression** liée à des perturbations hormonales (forte concentration d'œstrogène et augmentation de la cortisolémie). Le *postpartum* est également associé à un état inflammatoire (Roche et al., 2018). L'inflammation, réaction de l'immunité innée, est un ensemble de réponses pour éliminer l'invasion d'agents pathogènes et pour initier un processus de cicatrisation. Lorsque le système inflammatoire échoue, les pathogènes peuvent se propager dans l'organisme et établir la maladie (Sordillo et al., 2009). La forte demande en vitamines pour la production du colostrum provoque une diminution en vitamine A et E de l'ordre de 40% qui accroît l'immunodépression (Salat, 2005). Le déficit énergétique, la cétose, l'hypocalcémie et les autres carences associées à cette période fragilisent également les défenses immunitaires de l'animal. Le nombre de cellules immunitaires dans le sang diminue, les capacités phagocytaires et chimiotactiques sont réduites (Roche et al., 2018).

Suite aux perturbations du *peripartum* qui sont composées d'un déficit énergétique, d'une hypocalcémie et d'une immunodépression, des réponses métaboliques sont mises en place par l'organisme pour assurer la réalisation des fonctions prioritaires.

1.2. La transition entre la gestation et la lactation nécessite la coordination de réponses métaboliques adaptées

1.2.1. *La mobilisation des réserves lipidiques est une adaptation métabolique au déficit énergétique*

Le glucose est un nutriment primordial chez la vache laitière. Il est à la fois une source d'énergie pour les cellules (par le biais de la glycolyse et du cycle de Krebs), et un précurseur pour la synthèse de lactose qui est composé d'une molécule de galactose et de glucose, pour la synthèse du glycérol et des matières grasses du lait et pour la synthèse des triglycérides. Environ 85% du glucose disponible est capté par les glandes mammaires pour la production et la sécrétion du lait (Sordillo et al., 2009). Lorsque les quantités de glucose dans le sang sont insuffisantes, l'organisme rentre dans un état d'hypoglycémie avec une diminution du niveau d'insuline. Dans un premier temps, il y a une mobilisation des réserves de glycogène par la glycogénolyse pour compenser la faible glycémie. Si cette réponse est insuffisante, les réserves lipidiques sont alors mobilisées par la lipolyse du tissu adipeux et par la néoglucogénèse qui est une des voies métaboliques majeures pour la production de glucose quand les apports extérieurs sont insuffisants (Sordillo et Raphael, 2013). Les triglycérides issus de cette mobilisation sont alors hydrolysés en **acides gras non estérifiés** (AGNE). Les AGNE sont exportés hors des adipocytes par une protéine de transport (FABP) dans l'espace extracellulaire puis ils sont transportés dans le sang le plus souvent à l'aide de l'albumine (Adewuyi et al., 2005). Les AGNE peuvent être intégrés dans les cellules de différents tissus. Si une partie est captée par la mamelle pour la production laitière, l'autre est captée par le foie dont le rôle principal est de réguler l'approvisionnement en glucose de l'organisme. Une fois dans le cytosol de la cellule hépatique, les acides gras sont activés en acyl-CoA et entrent dans la mitochondrie par une protéine de transport. Ils subissent ensuite une bêta-oxydation et sont transformés en acétyl-CoA qui peuvent alors suivre deux voies majoritaires : le cycle de Krebs suivi de la néoglucogénèse (voir *Figure 1, la voie 1*) ou la cétogénèse (voir *Figure 1, la voie 2*). Quand les quantités d'acétyl-CoA sont modérées, il y a incorporation dans le cycle de Krebs, production d'oxaloacétate et production de cofacteurs (ATP et NADH). Chez les ruminants, l'oxaloacétate et les cofacteurs sont majoritairement utilisés dans la néoglucogénèse qui va conduire à la production de glucose et à rétablir la glycémie.

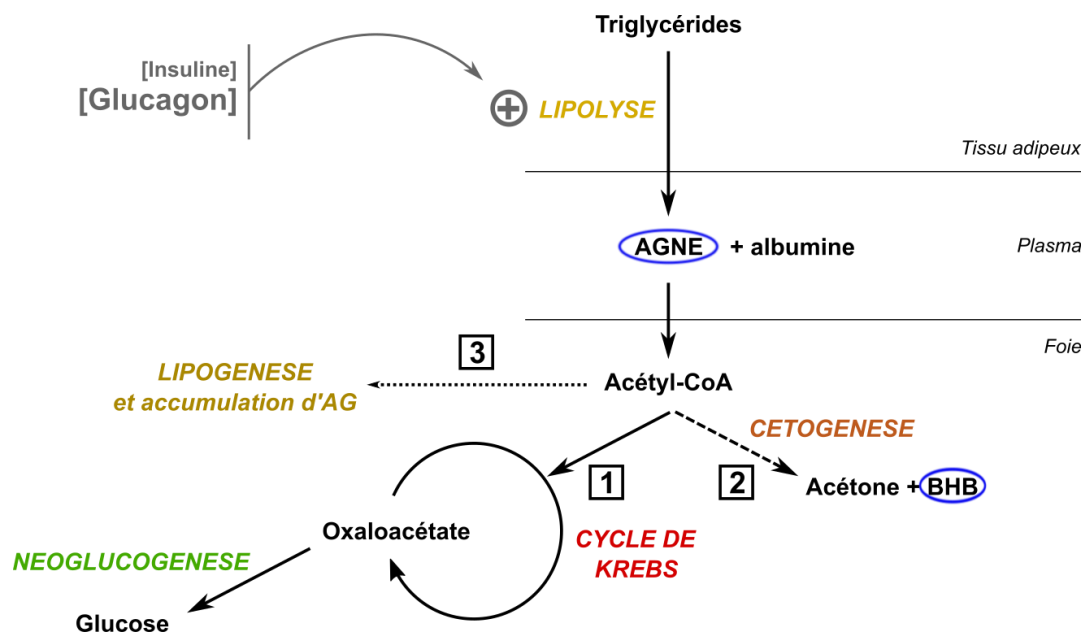


Figure 1 : Schéma simplifié des différentes voies métaboliques impliquées dans la réponse au déficit glycémique après la parturition (Source personnelle)

La mobilisation des réserves en début de lactation chez la vache laitière est de l'ordre de 30 à 60 kg de tissu adipeux (Salat, 2005). Cette mobilisation est repérable par une augmentation de la concentration plasmatique des AGNE.

1.2.2. Le maintien d'une calcémie autour de valeurs stables est un enjeu au peripartum

Lors du vêlage, l'écart entre la demande et les apports en calcium est trop important, des mécanismes de régulation vont se mettre en place au bout de quelques jours avec notamment une mobilisation osseuse. Au cours de la lactation, les apports nutritionnels dépassent les besoins et l'excédent est utilisé pour reconstituer les réserves osseuses. A la fin de la lactation, les besoins étant réduits, le métabolisme du calcium passe dans un état dormant et la calcémie est contrôlée par une régulation homéostatique avec des signaux hormonaux principalement composé de la parathormone et du calcitriol (Martín-Tereso et Martens, 2014). Lorsque l'animal n'arrive pas à compenser l'écart entre la demande et les apports, il y a un risque de développer des troubles. Quand la calcémie passe sous le seuil de 2mM (unité millimolaire, 1mM = 1 mmol/l), l'animal est dans un état d'hypocalcémie subclinique, en dessous de 1,4 mM, il s'agit de l'état clinique (Martín-Tereso et Martens, 2014). Si l'hypocalcémie est trop importante ou si elle perdure dans le temps après le vêlage, les animaux peuvent développer des troubles dans leurs fonctions nerveuses et musculaire avec l'apparition de maladies comme la fièvre de lait (Goff et Horst, 1997).

La période de transition est ainsi caractérisée par différents changements d'états physiologiques. L'animal s'adapte à ces perturbations par plusieurs réponses métaboliques pour un retour à un état d'homéostasie. Parfois ces réponses s'avèrent insuffisantes face à la perturbation engendrée et des troubles et des maladies métaboliques peuvent apparaître.

1.3. Le développement de troubles et de maladies métaboliques ou infectieuses consécutifs aux troubles du *peripartum* est le résultat d'une mauvaise adaptation

1.3.1. La cétose est causée par un déficit énergétique trop marqué et par la présence de corps cétoniques dans le foie

Lors du déficit énergétique *postpartum*, si les AGNE arrivent en trop grande quantité dans le foie ou si la néoglucogenèse est fortement induite par de faibles concentrations en glucose, le cycle de Krebs se retrouve saturé à cause d'une quantité insuffisante d'oxaloacétate. L'acétyl-CoA dans le foie est en quantité importante et s'oriente vers la voie métabolique de la cétogenèse (voir *Figure 1, la voie 2*). Il y a alors production et accumulation de corps cétoniques comme l'acétone et le béta-hydroxybutyrate (BHB) dans le sang (Rémésy et al., 1986). La néoglucogenèse est arrêtée et l'animal est en hypoglycémie et dans un état de cétose. La cétose est primaire si elle est causée par le déficit énergétique *postpartum*. On parle de cétose secondaire si elle apparaît suite à une pathologie qui a engendré un déficit énergétique. Cela concerne un tiers des cas de cétose. Cette maladie est caractérisée par un manque d'appétit et d'énergie, une production laitière réduite et une perte de poids (Church, 1993). Les vaches grasses sont les animaux les plus à risques : elles ont une mobilisation de leurs réserves lipidiques plus précoce et intense que les autres et une capacité hépatique d'oxydation des acides gras plus réduite (Goff et Horst, 1997; Pires et al., 2013).

La cétose peut être suivie d'une **stéatose hépatique**. Le foie a une capacité limitée à oxyder les AGNE en corps cétoniques, les acides gras en excès sont réestérifiés sous forme de triglycérides et s'accumulent dans les hépatocytes (voir *Figure 1, la voie 3*). Les lipoprotéines (VLDL, Very Low Density Lipoproteins) exportent ensuite les triglycérides vers d'autres tissus. Mais chez les ruminants, les hépatocytes ont une production de VLDL réduite ce qui provoque une accumulation de graisses dans le foie et altère le fonctionnement des cellules hépatiques, on parle alors de la maladie du foie gras (Reece et al., 2015).

1.3.2. La fièvre de lait résulte des contrastes importants du métabolisme du calcium

La fièvre de lait n'est pas causée par un déficit nutritionnel en calcium mais par une vitesse d'adaptation insuffisante du métabolisme calcique (Martín-Tereso et Martens, 2014). Son origine provient de contrastes hormonaux trop marqués entre les différents stades physiologiques qui ne permettent pas à l'organisme de mobiliser du calcium rapidement et d'une alcalose métabolique qui est un trouble acido-basique inactivant les récepteurs osseux de la parathormone (Salat, 2005). La fièvre de lait peut apparaître dans les deux jours suivant le vêlage. Les symptômes sont une perte d'appétit et d'énergie, des problèmes de coordination pour se déplacer, et différents degrés de paralysie qui peuvent laisser des séquelles variables à l'animal. La fièvre de lait est repérable à partir d'indicateurs sanguins : les concentrations en calcium et en phosphate diminuent. Des taux d'AGNE importants sont également repérables chez les vaches atteintes en raison d'une perte d'appétence et d'autres changements métaboliques. Les risques de développer la fièvre de lait sont accrus avec l'âge, la production laitière élevée, ou encore une fièvre de lait antérieure (Church, 1993).

1.3.3. Les rétentions placentaires ont des origines calciques et immunitaires

La rétention placentaire est une complication anatomique du *postpartum*. En temps normal, la membrane fœtale est expulsée dans les 8 heures suivant le vêlage. Si au bout de 24 heures, la délivrance n'a pas eu lieu, la rétention placentaire est diagnostiquée (Mahnani et al., 2021). Cette maladie est souvent associée à des maladies métaboliques comme l'hypocalcémie et la

fièvre de lait qui limitent les contractions de l'utérus nécessaires à l'expulsion du placenta (Goff et Horst, 1997). Le déficit immunitaire pourrait également participer à l'augmentation des risques de développer cette maladie (Salat, 2005). Les animaux âgés et associés à une forte production laitière sont les plus touchés. Les rétentions placentaires augmentent les risques de développer des métrites (Gröhn et Rajala-Schultz, 2000).

1.3.4. Le déplacement de la caillette à gauche est causé par la conjonction de troubles du peripartum

Suite à la parturition, le fœtus expulsé laisse un espace vide dans la cavité abdominale. Le rumen peut progressivement récupérer son volume initial. Il arrive que lors du déplacement du rumen, la caillette glisse vers le côté gauche de la vache. Ce glissement est souvent associé à une atonie abomasale, c'est-à-dire à une dilatation de la caillette suite à une accumulation de gaz produits dans la caillette, habituellement expulsés par les contractions du rumen (Goff et Horst, 1997). Le déplacement de la caillette est souvent associé à une baisse de l'appétit qui provoque un remplissage incomplet du rumen et un espace disponible pour le glissement. Cet état est accentué en cas de déficit énergétique, de cétose, de fièvre de lait ou d'autres maladies métaboliques. L'hypocalcémie et l'hypoglycémie causent une diminution de la motricité et des contractions du rumen. Enfin, une mauvaise adaptation alimentaire provoque une augmentation de la production de gaz dans la caillette (Van Winden et al., 2003). Cette affection peut impacter la production laitière de l'animal, son état corporel et nécessiter dans certains cas une chirurgie pour la soigner.

1.3.5. Les maladies infectieuses principales : la mammite et la métrite

Les maladies infectieuses ont une incidence maximale lors du *peripartum* en raison de l'immunodépression et des différents troubles associés à cette période. Elles peuvent être associées directement au vêlage ou au début de la lactation.

La mammite est une réaction inflammatoire de la glande mammaire. Elle peut être définie selon différents critères : le stade de lactation, le statut clinique ou subclinique, sa récurrence, si elle est causée par un agent infectieux ou non infectieux (G. Andres Contreras et Rodríguez, 2011). Cette maladie est la plus susceptible de se développer lors du premier mois de lactation et est causée par une infection ayant eu lieu soit lors de la période sèche, soit autour de la parturition. En effet, lors du tarissement, un bouchon de kératine se met en place dans le canal du trayon pour empêcher l'entrée des bactéries. L'origine de l'infection peut provenir en amont avec le délai de formation du bouchon qui laisse un passage aux bactéries ou en aval la semaine précédant le vêlage lors de la destruction de ce bouchon de kératine. L'immunodépression associée à la parturition va alors permettre le développement des bactéries et le déclenchement de la mammite (Goff et Horst, 1997). Au niveau de la glande mammaire, les symptômes sont une hyperhémie, une augmentation de la taille et des douleurs associées. L'animal peut également avoir de la fièvre. La mammite peut altérer la composition et la production du lait. Cette maladie est repérable par la quantification des cellules somatiques du lait (SCC) lors des contrôles laitiers. Une mammite subclinique est définie par une quantité de cellules supérieure à 200 000 cellules/ml de lait (G. Andres Contreras et Rodríguez, 2011). En France, d'après l'accord interprofessionnel national, le contrôle laitier exclu le lait de tank ayant des concentrations moyennes trimestrielles au-dessus de 400 000 cellules/ml de lait.

La métrite est une maladie infectieuse qui apparaît au *postpartum* suite à une perméabilité des barrières utérines associée au vêlage et à une déficience du système immunitaire. Elle est définie selon différents critères : zone de l'infection (endomètre, myomètre, couche séreuse, structures annexes), intervalle de temps de développement de l'infection *postpartum*, le stade clinique et les différents symptômes. Lors du vêlage, le col de l'utérus qui constituait une barrière contre les agents pathogènes, s'ouvre et provoque une infection puis une inflammation utérine. L'involution utérine qui consiste à la réduction du volume de l'utérus *postpartum* est un processus qui permet d'éliminer les tissus et exsudats dans lesquels les bactéries se développent. L'immunodépression associée au *postpartum* favorise le développement d'infections. Les bactéries anaérobies sont souvent la cause principale d'infections persistantes (au-delà de 21 jours après le vêlage) (Pantaleo et al., 2014). Cette maladie va impacter la production laitière et peut diminuer la fertilité de l'animal.

1.3.6. *L'apparition d'une maladie postpartum va accroître le risque d'en développer d'autres*

Les troubles et les maladies du *postpartum* sont liés les uns aux autres. Le risque d'en voir apparaître un autre est multiplié lorsqu'une maladie est déclarée. Ainsi, la cétose augmente le déficit énergétique, la perte de poids, affaiblit le système immunitaire et favorise l'apparition de mammites (Salat, 2005). La fièvre de lait augmente l'occurrence du risque de développer une cétose d'un facteur de 8,9, d'un déplacement de la caillette de 3,4, ou encore d'une mammite de 8,1 (Salat, 2005). La rétention placentaire augmente le risque de développer des métrites de 2,5 (Gröhn et Rajala-Schultz, 2000). Les facteurs de risque principaux identifiés des maladies du *postpartum* sont une forte production laitière et l'âge de l'individu. Des indicateurs métaboliques ou observables permettent d'identifier les différentes maladies lorsqu'elles sont déclarées. Des taux d'AGNE et de BHB anormalement élevés indiquent la présence d'un trouble métabolique qui peut être suivi d'une maladie du *postpartum*.

La période de *peripartum* est un moment clé et critique entre la gestation et le début de la lactation. La transition entre les deux états physiologiques provoque de nombreuses perturbations dans l'organisme. Si les réponses métaboliques sont insuffisantes ou inadaptées, on a une mauvaise adaptation de l'animal et des troubles, voir des maladies métaboliques ou infectieuses apparaissent (*voir Figure 2*). Des impacts négatifs peuvent apparaître que ce soit sur l'animal ou à l'échelle du troupeau et de l'exploitation. Ils peuvent également intervenir sur une période de temps variable.

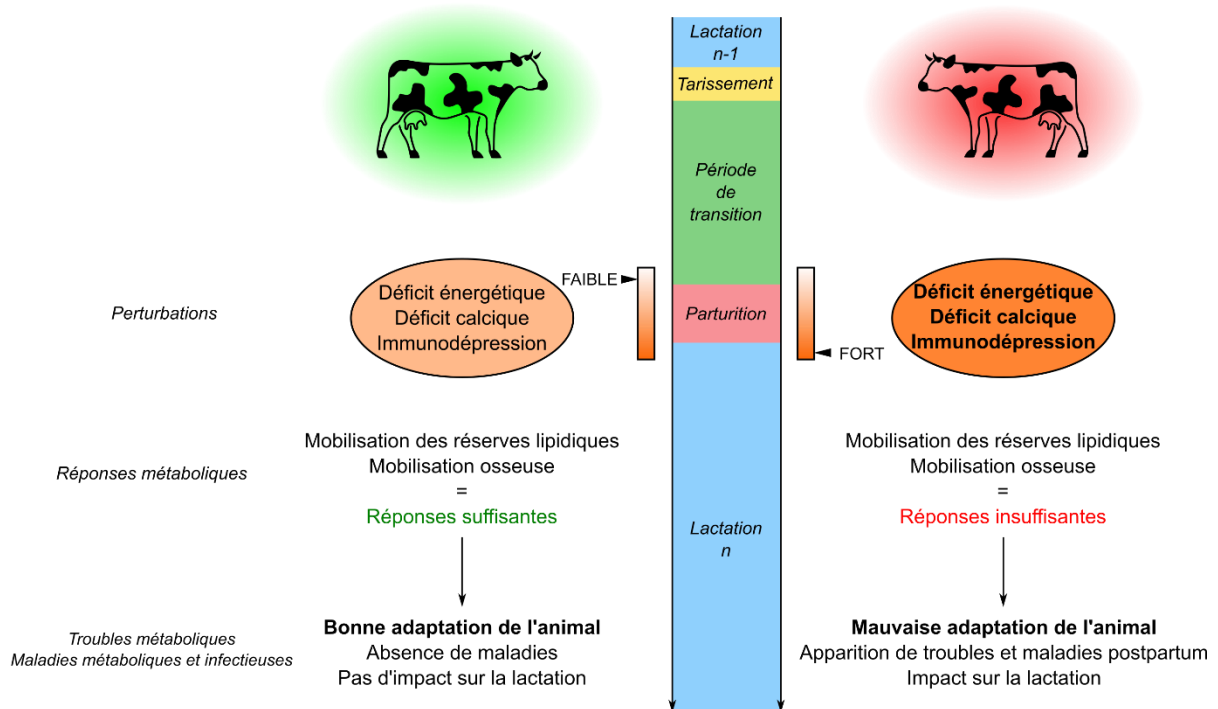


Figure 2 : Schéma récapitulatif des enjeux de la période de transition (source personnelle)

2. Les troubles métaboliques ont des impacts majeurs sur la filière laitière

2.1. L'animal est impacté au niveau de sa santé et de sa production

2.1.1. L'occurrence des maladies postpartum chez la vache laitière

Les maladies *postpartum* ont des fréquences d'apparition qui peuvent être variables en fonction des races, des modes de conduites, de l'âge des individus ou du rang de lactation. La mammite est la pathologie la plus fréquente dans les troupeaux. En France, une étude de l'INRA a recensé en premier les mammites (26,5% des troubles sanitaires identifiés), suivi des panaris (15,4%), de rétentions placentaires (6,1%) et des métrites (5,1%) (Faye et al., 1994).

D'après l'Insee, le taux d'incidence correspond au nombre de nouveaux cas d'une maladie sur une population cible. Au Canada, une étude rapporte un taux d'incidence des mammites de 23 cas pour 100 vaches sur une année avec des valeurs plus élevées dans les zones avec une plus grande proportion de stabulations entravées (Olde Riekerink et al., 2008). En Angleterre, une enquête auprès de fermes laitières avec des valeurs moyennes annuelles inférieures à 100 000 cellules/ml, a déterminé une incidence de 22,8 cas pour 100 vaches sur une année (Peeler et al., 2000).

En France, une étude (Fourichon et al., 2001) a décrit l'incidence des maladies *postpartum* dans 205 fermes laitières du Pays de la Loire dans les années 1995 à 1997 (voir *Tableau 1*). L'étude observe des incidences variables dans les troupeaux sans impact du système d'élevage (spécialisation, taille de l'unité, intensité de l'atelier). En revanche, il apparaît que les troupeaux de race Holstein développent plus de mammites cliniques que les autres.

Tableau 1 : Incidence moyenne des maladies postpartum dans 205 fermes laitières du Pays de la Loire (d'après les données de l'étude de (Fourichon et al., 2001))

Maladie	Incidence moyenne %	
Mammite clinique	44,1	Cas pour 100 vaches/an Nombre de cas divisé par la moyenne des vaches présentes mensuellement sur la période d'étude, standardisé à 1 an
Rétention du placenta	8,8	Cas pour 100 vélages
Métrite (aiguë et chronique)	7,0	
Fièvre de lait	5,6	
Cétose clinique	2,1	
Déplacement caillette	0,9	

2.1.2. Impacts des maladies et des troubles métaboliques sur la production laitière

Les troubles et les maladies *postpartum* perturbent le métabolisme des vaches, ce qui cause une diminution de leur production laitière. Une étude réalisée en Iran dans 17 grands troupeaux laitiers Holstein (voir *Tableau 2*), montre que les maladies qui causeraient les pertes les plus importantes les deux premiers mois de lactation sont le déplacement de la caillette et la cétose avec une perte respective de 12,4 kg/jour et 4,6 kg/jour pour des animaux avec une production journalière d'environ 37 kg (environ 34% et 12% de pertes). Si l'on s'intéresse aux mammites qui ont le taux d'incidence le plus élevé de manière générale dans les troupeaux, l'étude calcule des pertes laitières de 414 kg par vache sur 6 mois, ce qui correspond à une perte d'environ 6,4 % (Nikkhah et al., 2021). D'après une autre étude réalisée par l'INRA sur des Pies Noires et des Montbéliardes, les pertes de productions laitières causées par des troubles pathologiques apparaissant en début de lactation (le premier mois) sont plus importantes que celles apparaissant en milieu de lactation. Ainsi en début de lactation, les pertes sur les 14 premières semaines seraient de 209 kg par animal pour les mammites (12% de pertes) et de 64 kg pour les boiteries (4%) alors qu'en milieu de lactation, elles s'élèveraient au maximum à 56 kg (Coulon et al., 1989).

Tableau 2 : Perte de production laitière en fonction des différents troubles observés sur la période de début de lactation (5 à 60 jours), d'après les données de l'étude (Nikkhah et al., 2021)

Maladie	Perte PL (kg) en début de lactation sur 55 jours
Déplacement caillette	682
Cétose	253
Rétention du placenta	215
Métrite	110
Fourbure	39
Mammite	38

2.1.3. *Impacts des maladies et des troubles métaboliques sur les performances de reproduction*

Les vaches laitières peuvent développer un certain nombre de troubles métaboliques qui vont affecter les performances de reproduction. L'accroissement de la production laitière par animal est corrélé avec un plus grand risque de développer des troubles de la reproduction et donc une diminution de la fertilité des animaux.

Les maladies affectant la reproduction peuvent être de différentes natures : la rétention du placenta, les métrites, la dystocie (taux d'incidence de 2,1%), les chaleurs silencieuses (8,1%) ou des kystes de l'ovaires (7,3%). Toutes ses affections sont liées les unes aux autres et augmentent le risque d'en développer d'autres. Les animaux qui développent une rétention du placenta ont un taux de conception inférieur de 14% à ceux qui n'en ont pas (15% pour les métrites et 21% pour les kystes ovariens) (Gröhn et Rajala-Schultz, 2000). L'intervalle entre le vêlage et la fécondation suivante augmente avec la dystocie, la rétention du placenta, les métrites et les mammites pour les animaux qui développent ces affections (Maizon et al., 2004).

Les troubles métaboliques ont également un impact négatif sur la fertilité. Un déficit énergétique trop élevé, des concentrations plasmatiques élevées d'acides gras et de BHB vont affecter les fonctions de reproduction pré et post-ovulatoires car ils coïncident avec la période de réactivation des ovaires. Des effets marqués vont augmenter la durée de l'anœstrus en limitant la croissance des follicules et en stimulant ou inhibant la sécrétion de LH et de FSH (Roche et al., 2018).

Les troubles métaboliques et les maladies *postpartum* ont des incidences variables mais conséquentes à l'échelle de la carrière d'une vache laitière. L'impact sur l'animal est négatif à la fois pour sa santé et son bien-être, pour sa production laitière, et sur ses performances de reproduction. De plus, la corrélation de ses impacts va réduire la longévité de la carrière de l'animal. A l'échelle du troupeau, les affections vont également avoir des effets sur la gestion du système d'élevage et sur la pérennité économique de l'exploitation.

2.2. L'exploitation est impactée d'un point de vue économique

2.2.1. *Des pertes économiques causées par une diminution de la production laitière*

Une étude récente sur 17 grandes fermes laitières en Iran (Nikkhah et al., 2021), estime les pertes économiques dues à la réduction des rendements laitiers dans le cas de différentes maladies *postpartum*. Les coûts présentés dans l'étude prennent uniquement en compte les pertes de lait en fonction du prix du lait actuel ce qui représente seulement 20 à 35% des coûts causés par les maladies lors de la lactation (voir *Tableau 3*). Sur 6 mois de lactation, l'étude calcule l'impact d'une mammite ou d'une fourbure qui seraient équivalents à respectivement 60 € et 30 € par animal touché.

Tableau 3 : Pertes économiques en fonction des différents troubles observés sur la période de début de lactation (5 à 60 jours), d'après les données de l'étude (Nikkhah et al., 2021)

Maladie	Pertes économiques (€) en début de lactation sur 55 jours
Déplacement de la caillette	99
Cétose	37
Rétention du placenta	31
Mérite	16
Mammite	6

2.2.2. Les maladies engendrent des dépenses supplémentaires

Une étude basée sur les prix en 1995 en Angleterre (Kossaibati et Esslemont, 1997) estime des coûts totaux de l'ordre de 59 livres (70 €) pour un cas de fièvre de lait, de 218 livres (257 €) pour une mammite, de 83 livres (98 €) pour une rétention placentaire, et de 93 livres (110 €) pour une boiterie. Ces prix prennent en compte les coûts pour les traitements vétérinaires, pour le temps perdu par l'éleveur pour s'occuper de l'animal, pour la fertilité réduite, pour la perte de lait. D'autres facteurs sont également pris en compte comme les cas sévères voir fatales, l'association entre les maladies et la répétition de ces maladies pour un même animal dans une lactation.

Aujourd'hui, les pertes économiques sont bien plus élevées. Une étude plus récente (Mahnani et al., 2021) estime les coûts de la rétention placentaire autour de 333 € et 456 € par animal pour les primipares et les multipares respectivement. Plusieurs facteurs peuvent l'expliquer : la productivité par animal a quasiment été doublée ce qui a également augmenté l'incidence des maladies, le coût des aliments, des traitements vétérinaires et de la main d'œuvre a augmenté. La perte de lait ne correspond qu'à 38,5 et 28,5% des coûts totaux associés à cette maladie pour les primipares et les multipares (voir Figure 3).

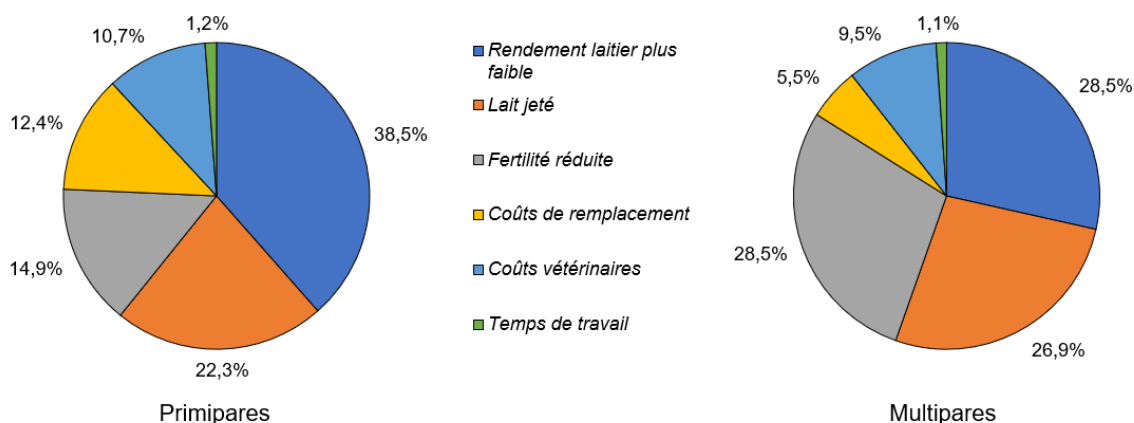


Figure 3 : Répartition des coûts d'une rétention placentaire chez la vache laitière, adaptée d'après l'étude de Mahnani et al., (2021)

Les troubles et maladies métaboliques ont donc un impact important à l'échelle de l'animal mais également à l'échelle de l'exploitation par des aspects de gestion et d'économie. Pour essayer de limiter leurs effets ou d'empêcher l'apparition de formes plus graves de maladies, il faut être capable de les identifier voir de les prédire par le biais de différents indicateurs.

3. Les indicateurs impliqués dans les perturbations métaboliques

3.1. Des molécules permettant de constater des perturbations métaboliques

3.1.1. Les AGNE et le BHB sont des indicateurs du trouble et des maladies

L'analyse des constituants biochimiques du sang reflète l'état nutritionnel de l'animal et permet de mettre en évidence des perturbations métaboliques. Plusieurs indicateurs sont suivis comme le glucose, l'insuline, les acides gras non-estérifiés (AGNE), le béta-hydroxybutyrate (BHB), l'urée et d'autres enzymes et protéines. Les AGNE et le BHB sont notamment reconnus comme deux indicateurs caractéristiques du trouble métabolique. En effet, les AGNE reflètent la mobilisation des réserves lipidiques suite au déficit énergétique causé par un manque de glucose dans le sang. A la fin de la lactation et pendant le tarissement, la concentration plasmatique moyenne d'AGNE est inférieure à 0,2 mM. Leur concentration augmente autour de la parturition, période associée à de forts besoins nutritionnels et une balance énergétique négative. Les valeurs d'AGNE plasmatiques atteignent un pic les dix premiers jours après le vêlage avec des concentrations supérieures à 0,75 mM. La concentration est presque multipliée par 4 entre la fin de la lactation et 10 jours après le vêlage (Contreras et Sordillo, 2011). Le degré de déficit énergétique est donc mesurable en fonction des niveaux de concentration en AGNE. Plus le déficit énergétique est important et plus le risque de développer des maladies métaboliques du *peripartum* est élevé. Le BHB est un corps cétonique produit lors de la cétogenèse dans le cadre du métabolisme des acides gras. Au *postpartum*, sa concentration augmente suite au déficit énergétique de la parturition. Lorsqu'elle dépasse 1,4 mM, on considère que l'animal est en état de cétose subclinique et dans un état clinique au-dessus de 2,6 mM (Puppel et Kuczyńska, 2016). Lors d'une perturbation énergétique, la concentration en AGNE augmentent rapidement dans le sang puis décline alors que l'élévation de la concentration en BHB est plus lente à apparaître (voir Figure 4).

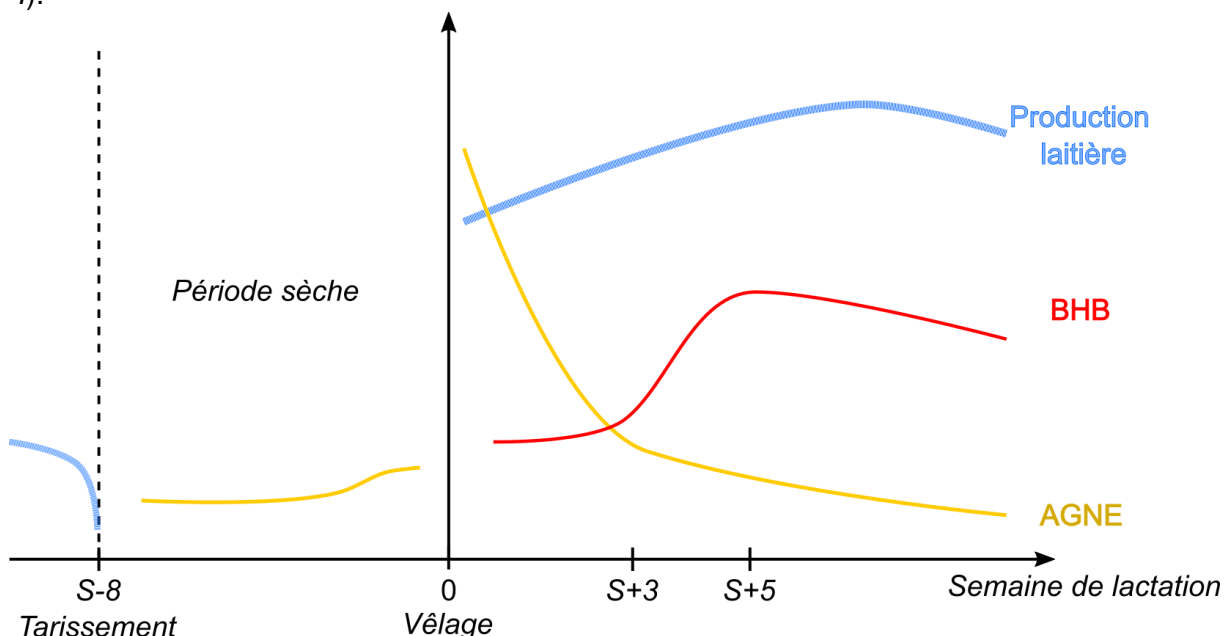


Figure 4 : Dynamique des concentrations plasmatiques des AGNE et du BHB chez la vache laitière en stress métabolique avant la ration du matin, adapté d'après les données de Pires et al. (2013)

Lorsque la concentration en AGNE reste élevée dans le sang, cela traduit une réponse métabolique insuffisante pour compenser la perturbation énergétique. Par exemple, les animaux atteints de cétose qui ont des taux d'AGNE élevés et de glucose faibles montrent une saturation du cycle de Krebs et un arrêt de la néoglucogenèse au profit de la cétogenèse. La plupart des maladies métaboliques soit sont causées ou aggravées par un déficit énergétique trop marqué, soit provoquent une perte d'appétence qui augmente le déficit énergétique. Dans tous les cas, les maladies *postpartum* sont associées à des taux d'AGNE et de BHB élevés dans le sang.

3.1.2. *Les AGNE permettent d'annoncer des perturbations dès le prepartum*

Chez la vache laitière, les AGNE et le BHB auraient également un caractère prédictif du risque de développer des maladies *postpartum*. Différents seuils de prédiction ont été déterminés. Au *prepartum* (entre 2 et 14 jours avant le vêlage), les animaux ayant des concentrations en AGNE supérieures à 0,3 mM ont un risque relatif de 1,8 de développer une des maladies métaboliques au *postpartum* (telles que la métrite, la cétose, la rétention du placenta et le déplacement de la caillette). Au *postpartum* (entre 3 et 14 jours après le vêlage), les animaux ayant des concentrations supérieures à 0,6 mM ont un risque relatif de 4,4 de développer une maladie. La prédiction au *peripartum* est moins fiable qu'au *postpartum*. Pour le BHB, le seuil fixé à 1 mM au *postpartum* est associé à un risque relatif de 4,4 de développer une maladie (Ospina et al., 2010). Une autre étude associe des concentrations en BHB supérieures à 1,0 et 1,4 mM respectivement la première et la deuxième semaine *postpartum* à une probabilité réduite de 20% d'avoir une première insémination réussie (Walsh et al., 2007).

Les AGNE totaux sont donc reconnus comme des indicateurs de troubles avérés mais également des indicateurs prédictifs de ces derniers quelques jours avant le vêlage. Aujourd'hui, il n'existe pas d'indicateur de prédiction qui apparaîtrait suffisamment en amont pour pouvoir limiter ou empêcher les troubles et maladies impactant le début de la lactation. La présence des AGNE en amont des troubles et maladies peut laisser supposer qu'ils interviennent dans la coordination des réponses métaboliques suite à une perturbation rencontrée.

3.2. Certains AGNE seraient-ils des indicateurs précoces de l'apparition de troubles et maladies métaboliques ?

3.2.1. *Les AGNE sont impliqués dans de nombreuses voies de régulation du métabolisme*

Les AGNE sont impliqués dans la régulation du métabolisme et du système immunitaire dans différents tissus et cellules à travers plusieurs mécanismes bien connus chez la vache laitière. Tout d'abord, ils peuvent influencer d'importantes fonctions cellulaires en s'incorporant dans la membrane de phospholipides, et en modulant leur fluidité et son action sur les protéines des radeaux lipidiques. Ensuite, ils sont également impliqués dans la régulation de l'expression de certains gènes en modulant les liaisons aux récepteurs, la signalisation intracellulaire et en activant des facteurs transcriptionnels. Certains AGNE peuvent agir sur les récepteurs PPAR (Peroxisome Proliferator Activated Receptors) qui sont des facteurs de transcription dans la région du promoteur de gènes impliqués dans la régulation du métabolisme des lipides, dans le système immunitaire et dans la reproduction (revue dans Bionaz et al., 2020). Les acides gras participent également à la réponse immunitaire et inflammatoire en étant pour certains des précurseurs de la biosynthèse des médiateurs

lipidiques comme l'acide arachidonique de la famille des oméga 6, et l'acide docosahexaénoïque (DHA) et l'acide eicosapentaénoïque (EPA) de la famille des oméga 3 par exemple (Sordillo et al., 2009). En fonction de la composition en AGNE du plasma et des membranes cellulaires, différentes réponses peuvent être déclenchées. Chez la vache laitière, lors du *peripartum*, le déficit énergétique mobilise les réserves lipidiques, faisant ainsi varier la composition plasmatique et membranaire en acides gras, notamment dans le tissu adipeux et le foie. On peut supposer que ces variations vont impacter la réponse inflammatoire face à des agents pathogènes lors de stress métaboliques.

Plus récemment, un nouveau mécanisme de régulation par les acides gras a été identifié. Les AGNE, en fonction de la taille de leur chaîne carbonée, peuvent agir sur un certain nombre de fonctions physiologiques en se liant à des récepteurs à 7 domaines transmembranaires appelés les FFAR (Free Fatty Acids Receptors). Chez l'humain, ils sont notamment impliqués dans la sécrétion d'insuline et d'hormones intestinales, dans la réaction anti-inflammatoire, dans l'adipogenèse, la lipolyse et la lipogenèse, dans les réponses du système immunitaire, et dans le contrôle de l'ingestion (Kimura et al., 2020). Des études récentes ont démontré que les FFAR étaient exprimés chez les bovins dans les tissus adipeux, le foie et les intestins (Aguinaga Casañas et al., 2017; Mielenz, 2017). De plus, il a été montré que certains AGNE spécifiques étaient impliqués dans des mécanismes de régulation des réponses immunitaires et des fonctions reproductives chez les bovins. Ainsi l'acide docosahexaénoïque, qui fait partie de la famille des oméga 3 est associé à une stimulation de la prolifération et de la stéroïdogenèse des cellules de la granulosa (Maillard et al., 2018). Cette molécule active également des mécanismes de réponses des neutrophiles (Olmo et al., 2019).

Les AGNE sont donc à la fois des indicateurs de troubles mais également des molécules bioactives qui peuvent réguler certaines voies métaboliques et immunitaires. La variation du profil en acides gras peut ainsi engendrer différentes réponses face à une même perturbation. En déterminant quels AGNE sont associés à une réponse métabolique insuffisante ou au contraire adaptée, il serait possible de prédire en amont si l'animal a un risque important ou non de développer des troubles ou des maladies *postpartum*.

3.2.2. La présence de certains AGNE est associée au risque de développer des maladies *postpartum*

Des études récentes montrent une corrélation entre certains acides gras et le risque de développer des troubles et maladies du *postpartum*. L'étude de Fiore et al., (2020), analyse la composition des différentes classes lipidiques dans le premier mois *postpartum* chez les animaux développant différents degrés de cétose et y associe une concentration significative de 8 AGNE dans leur sang (C14:1 ω 5, C18:2 ω 6, C18:3 ω 6, C18:3 ω 3, C20:1 ω 7, C20:2 ω 6, C20:3 ω 6, C22:0). Ces AGNE sont des indicateurs de différents seuils de cétose mais ils n'ont pas de valeur prédictive dans le temps. Une autre étude de Putman et al., (2022), s'est intéressée à cette caractéristique en dosant des oxylipides, appartenant à la famille des AGNE, tout au long de la période de transition (de 6 jours avant le tarissement à 14 jours après le vêlage). Ils ont ainsi pu associer une différence de concentrations entre 7 oxylipides sur la période de transition entre des animaux avec des potentiels génétiques et des conduites similaires qui vont développer ou non une maladie. Leurs concentrations plus élevées peuvent être associées soit à des animaux malades soit à des animaux sains. Les oxylipides impliqués sont la prostaglandine D₂, la prostaglandine D_{2 α} , le 9-HODE, le 9oxo-HODE, le 13 oxo-HODE, le 12-13 DIHOME, le 8 iso PGA 2.

Les AGNE pourraient donc être de potentiels indicateurs prédictifs au développement de troubles ou de maladies métaboliques. On pourrait avoir des AGNE associés à une réponse adaptée et des animaux sains ou associés à une réponse inadaptée et des animaux qui vont présenter un risque plus élevé de troubles.

4. Conclusion

Chez la vache laitière, la période de transition est une étape cruciale caractérisée par de nombreuses perturbations qui vont nécessiter une coordination de réponses métaboliques pour s'adapter. Lorsque ces réponses sont insuffisantes, l'animal risque de développer des troubles et des maladies *postpartum* qui vont avoir des effets négatifs sur le début de la lactation voir sur la reproduction suivante. Une mauvaise adaptation peut donc impacter l'animal, sa santé, son bien-être mais également impacter l'exploitation par une production laitière réduite et des pertes économiques. Pour limiter au mieux ces impacts, il est important de déterminer le plus tôt possible quels animaux seront les plus à risques pour pouvoir les accompagner en amont. Aujourd'hui il existe de nombreux indicateurs qui constatent les troubles ou les maladies mais assez peu d'études se sont intéressées au caractère prédictif de ces indicateurs. Les acides gras non-estérifiés sont des potentiels candidats car ce sont à la fois des indicateurs de troubles et des molécules bioactives qui peuvent réguler des fonctions métaboliques et immunitaires dans l'organisme.

L'objet du stage est d'analyser les profils d'acides gras libres (ou AGNE) sur la période de transition, d'animaux soumis à des challenges nutritionnels qui vont avoir une réponse métabolique adaptée ou non. **On se demandera si parmi les acides gras libres plasmatiques, certains peuvent être des indicateurs précoces du risque de développer des troubles métaboliques ou maladies *postpartum*, chez la vache laitière en début de lactation.**

Pour répondre à cette question, une partie expérimentale est réalisée dans les laboratoires de l'équipe Biomarqueurs. Des comparaisons de profils d'AGNE associés à un état métabolique sain ou inadapté devraient permettre d'identifier si certains sont associés à une réponse d'adaptation et d'autres à une perturbation. Des analyses statistiques viendront compléter l'étude.

Partie 2 : Etude expérimentale

5. Matériels et méthodes

5.1. Origine des animaux et des échantillons : l'expérimentation Tripl'XL

5.1.1. *Présentation du projet et de de ses objectifs principaux*

Le projet Tripl'XL est une **expérimentation système sur 6 ans menée par l'INRAE au Haras du Pin en Normandie sur un troupeau laitier de 144 vaches dans un système pâturant**. Son objectif est d'évaluer l'influence de la race et de la répartition des apports nutritifs durant la lactation sur les variations des réserves corporelles et sur l'aptitude des vaches laitières à produire et se reproduire dans un système herbager. Trois races (Holstein, Jersiaise, Normande) couplées à 4 stratégies d'alimentation sont étudiées au cours du projet. Des mesures sur le troupeau (prélèvements sanguins, prélèvements de lait, poids vifs, NEC, kg MS ingérées) et des mesures sur le pâturage sont réalisées.

5.1.2. *Conduite générale du troupeau*

Les vaches laitières sont conduites en un seul troupeau tout au long de l'année avec une même ration de base que ce soit durant la lactation, le tarissement ou en stabulation, au pâturage. Certains animaux reçoivent un apport de concentré différent à un moment donné qui va correspondre à une stratégie de complémentation, affectée aux vaches tout au long de leur carrière. Les vêlages sont groupés sur 3 mois à partir de la fin janvier pour faire correspondre la lactation avec la saison de pâturage et la disponibilité en herbe. Le tarissement a lieu en automne-hiver avec une durée de lactation d'environ 44 semaines (308 jours).

5.1.3. *La ration de base et les différentes stratégies de complémentation*

La **ration de base** donnée à tous les animaux varie en fonction de la saison et de l'état physiologique des animaux qui peuvent avoir jusqu'à trois mois de décalage. Pendant la période hivernale (décembre – mars), les vaches en début de lactation ont une ration composée à 50% d'ensilage d'herbe et 50% de mi-fané-enrubanné. Celles en fin de lactation ont 100% d'ensilage d'herbe et les tarées ont un mélange de 65% d'ensilage d'herbe et 35% de foin. Pendant la saison de pâturage (avril – novembre), les animaux sont à l'herbe et peuvent être complétés en cas de besoin par de l'ensilage d'herbe ou du mi-fané/enrubanné.

L'expérimentation teste **plusieurs stratégies de complémentation** associées au système pâturant :

- C0 : absence d'apport de concentré tout au long de la carrière
- C1 : apport de concentré durant les 100 premiers jours de lactation (1^{er} tiers de lactation)
- C2 : apport de concentré entre les jours 100 et 200 de lactation (2^{ème} tiers de lactation)
- C3 : apport de concentré entre les jours 200 et 300 de lactation (3^{ème} tiers de lactation)

Chaque animal a une stratégie de complémentation qui lui est attribuée et qu'il conservera toute au long de sa carrière. Les quantités de concentré données varient entre les races pour tenir compte de leurs différences de besoins mais sont identiques entre les individus de même race. Les concentrés sont accessibles à tous les animaux en lactation grâce aux distributeurs

automatiques de concentrés (DAC). Les DAC sont programmés pour distribuer 4 kg bruts/jour aux Holstein et aux Normandes et 3 kg bruts / jour aux Jersiaises. La composition du concentré expérimental est détaillée en Annexe 1.

5.1.4. Description de l'échantillon : race et conduite alimentaire

Dans le cadre du stage, nous nous intéresserons à un échantillon d'animaux plus réduits. Les trois races sont suivies mais nous nous intéressons uniquement aux animaux multipares et suivant les régimes C0, C1 et C3 (voir Figure 5). Les animaux en C2 ont été exclus de notre échantillon car sur les points de prélèvements analysés, ils seraient similaires à la catégorie C0 (on ne s'intéresse pas à la période entre J100 et J200 sur laquelle ils sont complémentés). Les animaux qui ont eu des problèmes comme un tarissement précoce, une maladie, qui ont été réformés ou qui ne rentraient pas dans ces critères, ont été retirés de l'échantillon analysé au cours du stage. Au total, on obtient un échantillon de 57 animaux répartis comme dans le tableau suivant.

Tableau 4 : Répartition de l'échantillon en fonction de la race et de la conduite d'alimentation

		Régime			Total
		C0	C1	C3	
Race	Holstein	6	10	3	19
	Jersiaise	6	3	2	11
	Normande	11	9	7	27
Total		23	22	12	57

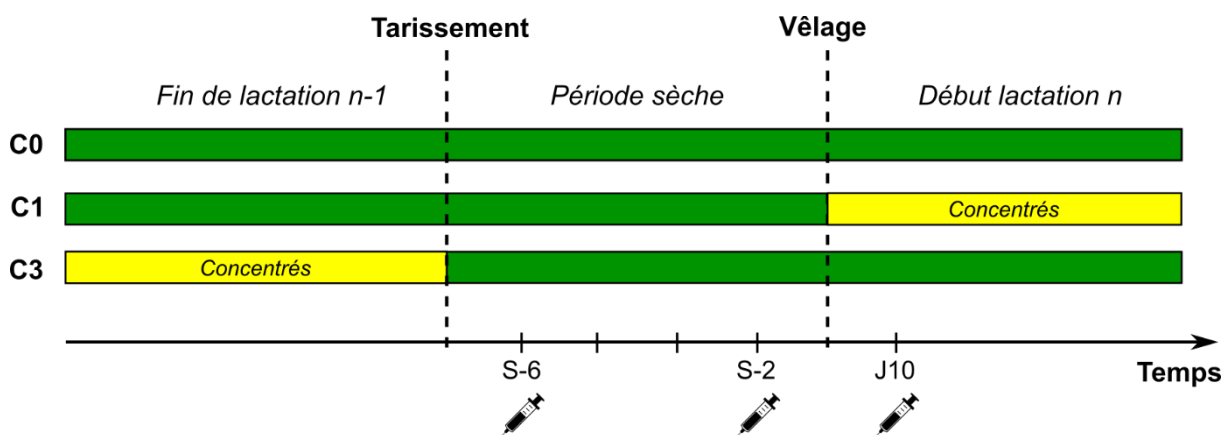


Figure 5 : Calendrier d'alimentation des vaches laitières dans le cadre de l'étude de FAIR_Cow

5.1.5. Prélèvements sanguins

Des prélèvements sanguins par prise de sang caudale sont effectués le matin avant la distribution de l'alimentation pendant le tarissement et le matin au retour de la traite avant la distribution également pendant la lactation. La périodicité des prélèvements est organisée ainsi : S-8, S-6, S-4, S-2 par rapport à la date de vêlage théorique et J10, J20, J40, J60, J100 par rapport à la date de vêlage réelle. En cas de décalage conséquent entre théorique et réel, les échantillons ont été reclassés sur la date réelle de vêlage. Chaque échantillon a été prélevé avec un intervalle de +/- 3 jours sur la date prévue. Les points qui vont être analysés dans le cadre de ce stage sont : tarissement + 2 semaines (équivalent de S-6), vêlage - 2 semaines

(S-2), 10 jours post-vêlage (J10) et 20 jours post-vêlage (J20) (Voir *Figure 5*). Les échantillons sont conservés sous forme de plasma à -20°C et -80°C en fonction des analyses prévues.

Pour chaque individu et à chaque point, trois prélèvements de 9 ml sont réalisés avec des tubes Vacutainers EDTA (anticoagulant) et immédiatement placés dans de la glace pillée dans une glacière réfrigérée avant d'être centrifugés (3000 tours/min, 15 minutes, 4°C) dans la demi-heure suivant le prélèvement. Le plasma recueilli est aliquoté dans différents tubes Eppendorf de 1,5 ml et stocké à -80°C. Les échantillons sont ensuite envoyés au centre INRAE de Theix dans de la carboglace à -80°C.

5.1.6. Données zootechniques disponibles

Les animaux font l'objet d'un suivi précis sur un certain nombre de critères zootechniques :

- La **note d'état corporel** (NEC, échelle de 0 à 5) est attribuée chaque première semaine du mois pour tous les animaux.
- La **production laitière** est suivie quotidiennement lors des deux traites du vêlage au tarissement. Les taux butyreux (TB), protéiques (TP), de lactose, d'urée, de BHB, d'acétone et les cellules du lait sont déterminés une fois par semaine.
- Les **événements sanitaires** et les traitements sont consignés dès leur réalisation,
- La **localisation** précise de l'animal dans la ferme (présence en bâtiment ou à l'herbe), chaque changement est consigné dans un calendrier.

5.2. Dosage des métabolites plasmatiques des animaux de l'échantillon

L'objectif est de déterminer des groupes distincts entre des animaux sains et des animaux perturbés métaboliquement ou malades. L'appareil utilisé pour le dosage est un automate Arena 20 XT. Il réalise des dosages colorimétriques par spectrophotométrie. Les métabolites plasmatiques dosés sont : les AGNE totaux, le BHB, la bilirubine, la créatinine, le glucose, et l'urée.

Tableau 5 : Méthodes et références des dosages des métabolites des échantillons de FAIR_Cow

Dosage	Référence	Méthode
AGNE totaux	Kit Wako NEFA HR (2) - SOBIODA SAS	Dosage colorimétrique par spectrophotométrie avec l'automate Arena 20 XT - Thermo Fisher Scientific
BHB	Kit Beta-Hydroxybutyrate - Thermo Fisher Diagnostics	
Bilirubine	Kit Bilirubin Total (NBD) - Thermo Fisher Diagnostics	
Créatinine	Kit Créatinine (Jaffé) - Thermo Fisher Diagnostics	
Glucose	Kit Glucose GOD-POD - Thermo Fisher Diagnostics	
Urée	Kit Urea - Thermo Fisher Diagnostics	

5.3. Dosage de la composition des profils des AGNE plasmatiques

5.3.1. *Extraction des lipides du plasma basée sur la méthode de Folch adaptée (1957)*

Cette première étape a pour objectif d'extraire les lipides totaux (Cholestérol, Triglycérides, Esters de Cholestérol, Phospholipides et Acides Gras Non Estérifiés) du plasma. Pour cela, le protocole d'extraction est basé sur la méthode de Folch modifiée (Folch et al., 1957). Pour un même échantillon, on prélève deux fois 500 µL de plasma que l'on place dans 2 tubes différents. On ajoute un mélange de deux solvants : chloroforme (apolaire) et méthanol (polaire) (2/1, v/v). La phase est ensuite lavée par une solution de NaCl H₂SO₄ (respectivement à une concentration de 17mM et 10µM) qui entraîne la séparation en deux phases distinctes. La phase supérieure (mélange de méthanol et de NaCl acide) contient les composés polaires alors que les lipides se trouvent dans la phase inférieure (chloroforme). On prélève alors la phase inférieure des deux tubes que l'on rassemble dans un autre. On obtient nos lipides totaux extraits du plasma en solution dans du chloroforme.

5.3.2. *Séparation des classes de lipides par extraction en phase solide (SPE)*

L'étape suivante permet de séparer les différentes classes de lipides et de récupérer uniquement celle des AGNE (Burdge et al., 2000). On utilise une cartouche SPE Aminopropyl NH₂ 500mg (*Chromabond*) sur une chambre à vide manifold cartouche SPE. La colonne SPE est conditionnée par du chloroforme suivi du dépôt de l'échantillon. La colonne subit différents lavages à base de chloroforme, puis un mélange de chloroforme/méthanol, puis de méthanol pour éluer les différentes classes de lipides sans intérêt. Enfin, en dernière étape on élue les AGNE avec un mélange de solvant spécifique (chloroforme/méthanol/acide acétique). L'élution est ensuite évaporée sous azote.

5.3.3. *Méthylation des AGNE*

L'étape de méthylation des AGNE permet de les rendre plus volatils en vue de les analyser par GC-FID (Chromatographie Gazeuse - Détecteur à Ionisation de Flamme). L'extrait est repris par du toluène, suivi d'une méthylation par le boron trifluoride méthanol (BF₃ MeOH). Cette phase est ensuite lavée avec l'ajout de bicarbonate de soude saturé et d'hexane. Les Esters Méthylque d'Acides Gras (EMAG), créés suite à la méthylation, se retrouvent dans la phase d'hexane que l'on récupère et évapore en vue de l'injection pour la chromatographie.

5.3.4. *Chromatographie en phase gazeuse (CPG)*

La chromatographie en phase gazeuse est une technique de séparation d'un mélange de molécules volatiles. La séparation des analytes se fait en fonction de la différence d'affinité pour la phase mobile et la phase stationnaire. Le chromatographe utilisé ici est un Clarus 590 GC-FID de chez PerkinElmer équipé par une colonne CP-Sil 88 (Agilent J&W) (phase stationnaire) et de l'hydrogène comme phase mobile. Pour chaque échantillon, la sortie obtenue est un chromatogramme, avec différents pics correspondant aux différents analytes (voir *Figure 6*). La durée entre l'injection et la sortie de colonne d'un analyte est son temps de rétention. Ce temps de rétention est caractéristique de l'analyte dans les mêmes conditions chromatographiques. Les échantillons extraits sont injectés dans le GC sous forme liquide, les différents composés sont volatilisés dans le système d'injection avant de rentrer dans la colonne.

Pour permettre d'identifier les différents AGNE, un mélange de standards (Supelco, F.A.M.E. Mix, C4-C24 référence 18919-1AMP) dont la composition en EMAG est connue, est injecté dans les mêmes conditions que les échantillons et nous permet de connaître le temps de rétention de chaque analyte.

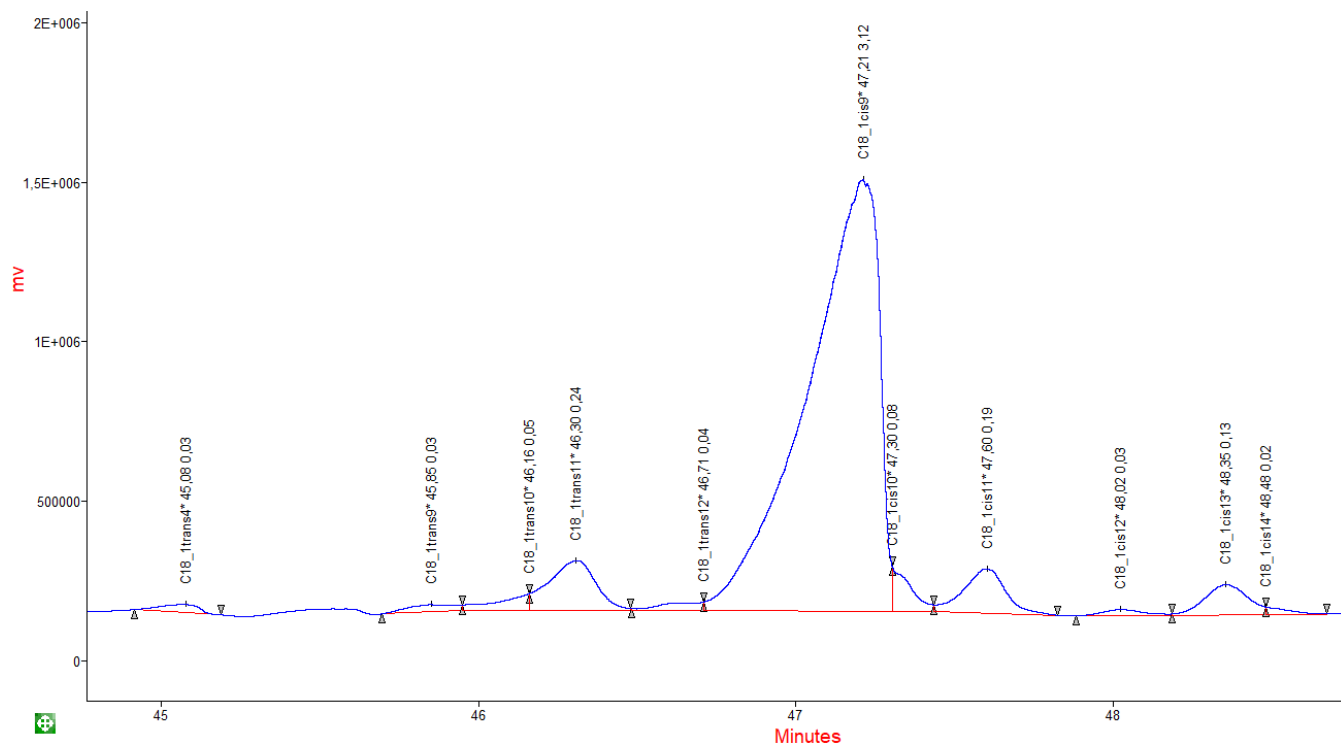


Figure 6 : Extrait de chromatogramme avec identification des acides gras dans la zone des C18 trans et cis pour la vache n°7504 au point de prélèvement S-6

5.4. Méthode d'analyse des résultats

5.4.1. Analyse et corrections des chromatogrammes

Pour analyser les sorties du GC, plusieurs étapes ont été réalisées. Une méthode d'annotation automatique basée sur des temps de rétention connus des principaux AGNE est appliquée sur chacun des chromatogrammes. Puis, chaque chromatogramme est repris pour corriger les erreurs du logiciel et pour repérer les pics différents du standard (voir Figure 6). Certains AGNE n'ont pas été identifiés dans les standards, ils ont été annotés NI + leur temps de rétention pour être sûre d'identifier les mêmes molécules entre chaque échantillon (exemple : NI55). A la fin de l'analyse, les temps de rétention pour chacun des AGNE identifiés sont comparés pour vérifier qu'il s'agit des mêmes molécules. L'aire sous la courbe permet d'avoir une quantité relative pour chaque acide gras. Pour s'affranchir des variations du rendement de l'extraction, on introduit dans chacun de nos échantillons, une quantité fixe et connue de C13, initialement absent. On divise les aires sous la courbe pour chaque AGNE par l'aire du C13 de l'échantillon, c'est ce qu'on appelle la correction du rendement de l'extraction. On obtient ainsi une sortie en rapport d'aire qui peut être comparée entre nos animaux. Les données sont également disponibles en pourcentage ce qui nous donne la proportion de chaque AGNE dans l'échantillon.

Au cours du stage, l'analyse des profils en AGNE s'est effectuée sur le point S-6, soit 2 semaines après le tarissement. Les autres points de prélèvement seront prochainement analysés dans le cadre du projet FAIR_Cow.

5.4.2. *Analyses statistiques*

Les analyses statistiques sont réalisées avec les logiciels R (version 4.2.0) et Rstudio. Plusieurs méthodes ont été utilisées pour analyser nos résultats. Des ANOVA à un facteur ont été utilisées pour comparer les valeurs moyennes des AGNE de différents groupes (race puis régime puis parité). Un test post-hoc, le test de Tukey, est ensuite réalisé pour comparer ces moyennes deux à deux. Des ANOVA à deux facteurs (facteur classe : SAIN / STRESS / MALADE / NI, facteur temps) avec mesures répétées ont été réalisées pour chaque métabolite dosé car nous avons des données pour chaque animal à S-2, J10 et J20. Des modèles de régression linéaire et logistique ont également été utilisés, ils seront explicités dans la suite du rapport. Les différences ont été considérées comme significatives pour une P-value < 0,05.

6. Résultats

6.1. Détermination des classes de nos animaux

6.1.1. *Classe « MALADE »*

Dans un premier temps, il est nécessaire de classer les animaux entre différents statuts. Le suivi sanitaire des animaux de l'expérimentation Tripl'XL présente comme maladies cliniques : 4 mammites, 2 fièvres de lait et 1 métrite. Les mammites se sont déclarées à 10, 38, 41 et 172 jours post-vêlage. Les deux fièvres de lait sont survenues dès le premier jour après le vêlage. La métrite a été détectée 58 jours après le vêlage.

Sur les 57 animaux de l'échantillon, 7 appartiennent donc à la catégorie « MALADE ».

6.1.2. *Classe « STRESS »*

L'identification des animaux de la catégorie « STRESS » est plus complexe car il s'agit d'animaux qui sont dans un état de stress métabolique sans signe clinique.

Les analyses des **métabolites plasmatiques** des animaux (à S-2 avant vêlage, à J10 et J20 post-vêlage) donnent des informations sur leur statut métabolique. Plusieurs seuils de concentration en BHB sont proposés dans la littérature scientifique pour identifier les animaux en état de cétose subclinique mais le lien entre une forte concentration de BHB et une baisse de la production laitière est controversé (Benedet et al., 2019). En effet, en appliquant un seuil de BHB > 1,2 mM (Ospina et al., 2010) sur au moins un de nos trois points de prélèvement, les animaux sélectionnés ne présentent pas forcément de perturbations ou baisse de leur production laitière. Or dans cette étude, nous nous intéressons aux animaux ayant un stress qui perturbe leurs performances et qui ont un impact pour l'exploitation. Pour éviter de classer des animaux dans un état de stress alors qu'ils n'ont pas de problème sur leurs performances, des critères autres que le seuil de BHB sont pris en compte. Le classement de nos animaux dépend donc de corrélations entre différents facteurs.

Les performances de l'animal sont suivies au travers de la quantité et de la composition de la production laitière. La **production laitière journalière** des 8 premières semaines de lactation, est analysée en prenant en compte les critères de race, de régime, du jour de lactation, de la parité de l'animal, de la NEC *prepartum* et de la semaine où la lactation a débuté. En effet, nos animaux ayant jusqu'à trois mois d'écart entre les vêlages, la disponibilité en herbe et sa composition sont variables entre les animaux en semaine commune de lactation (par exemple, la semaine 2 peut avoir lieu en février ou en mai en fonction du vêlage). On obtient le modèle de régression linéaire suivant :

$$\text{Production Laitière} = \text{Race} + \text{Régime} + \text{Jour de lactation} + \text{Parité} + \text{NEC prepartum} + \text{Semaine début lactation} + \mathcal{E} \text{ (résidu)}$$

Tous les effets du modèle étant significatifs (p-value <0,05), l'analyse des résidus (écarts entre la valeur observée et la valeur prédite par le modèle) nous permet d'identifier des variations indépendantes de ces quatre facteurs. Des résidus négatifs nous indiquent une baisse de la production laitière non expliquée par le modèle. Les animaux ayant systématiquement des résidus négatifs tout au long du début de la lactation sont écartés de la sélection pour éviter de prendre en compte les effets de potentiel génétique. Les animaux présentant une baisse supérieure ou égale à 5 litres par rapport à la prédiction théorique du modèle linéaire sur au moins 3 jours consécutifs sont sélectionnés dans la catégorie « STRESS ». Au niveau du modèle, cela correspond à moins de 15% des résidus les plus négatifs. Cette analyse est complétée par la comparaison des courbes de lactation de ces animaux par rapport à la courbe moyenne des autres animaux de la même race de l'échantillon (sans maladie clinique). Les détails et les scripts sur le modèle se trouvent en Annexe 2. Un exemple présentant la courbe de lactation de l'animal N°9073 est illustré (voir *Figure 7*) avec une forte baisse de la production en semaine 6 et 7.

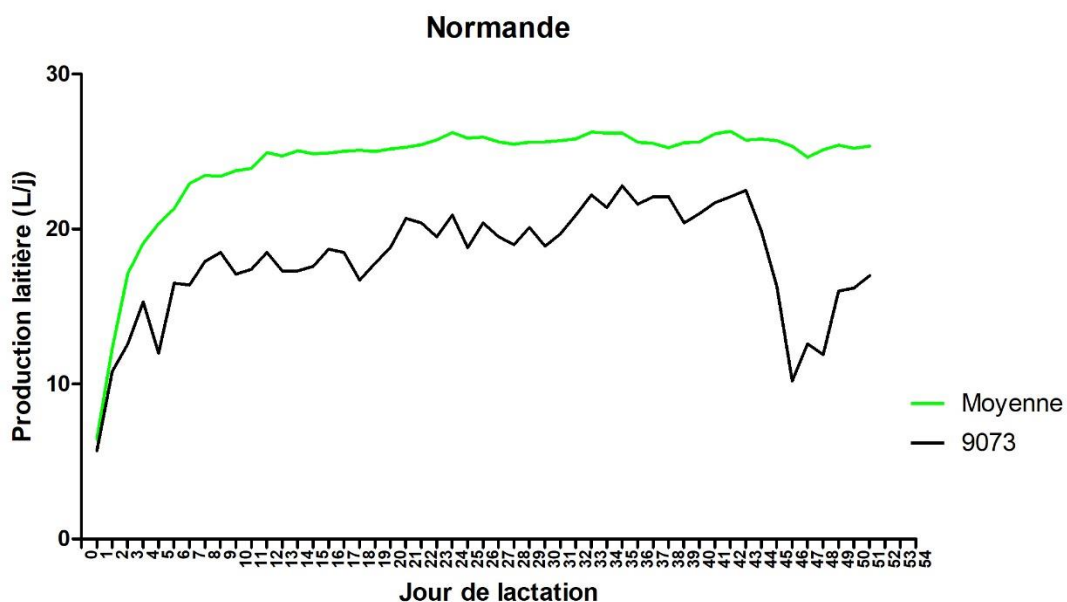


Figure 7 : Comparaison des courbes de lactation entre la moyenne des Normandes de l'expérimentation et la vache N°9073 présentant une anomalie en semaine 6 et 7 de lactation

Pour confirmer notre classification issue des données de la régression linéaire, nous nous sommes également intéressés aux **taux utiles du lait**. En effet, ces taux sont également des indicateurs de l'état de l'animal. Le taux butyreux (TB) et le taux protéique du lait (TP) sont notamment utilisés comme indicateurs de cétose subclinique. Les animaux atteints de cétose

subcliniques ont une augmentation du taux de matières grasses (TB), une baisse du taux de matières protéiques (TP) et donc une augmentation du rapport matières grasses et matières protéiques dans le lait (Benedet et al., 2019). Une étude donne des couples de valeurs de TB et TP pour identifier les animaux atteints de cétose subclinique valables pour la race Holstein : $TB/TP > 1,4$, $TB-TP > 10$, $TP < 28 \text{ g/kg}$ et $TP > 45 \text{ g/kg}$ (Commun et al., 2014). Les animaux de l'échantillon présentant des rapports TB/TP élevés, une baisse du TB et une augmentation du TP au cours des 8 premières semaines de lactation, sont identifiés dans la catégorie « STRESS ».

Sur les 57 animaux de l'échantillon, 7 sont dans la catégorie « STRESS ».

6.1.3. Classes « SAIN » et « NI »

Les animaux qui ne présentent pas de maladie clinique, ni de stress métabolique sont classés dans la catégorie « SAIN ». Cela correspond à 39 animaux sur les 57 de notre échantillon.

Les 4 animaux restants sont placés dans la catégorie « NI » (Non Identifié) car ils présentaient soit une baisse de la production laitière, soit des valeurs de taux utiles du lait élevées mais pas les deux critères à la fois, ce qui ne nous a pas permis d'identifier un stress certain.

6.2. Comparaison et analyse descriptive de notre échantillon

6.2.1. Répartition des individus dans les différentes classes

Notre échantillon est ainsi réparti au total : 76% d'animaux sains (dont les animaux NI), 12% d'animaux en stress métabolique et 12% d'animaux malades (voir la répartition totale dans le *Tableau 6*).

Tableau 6 : Répartition des animaux de notre échantillon dans les différentes classes en fonction de la race et du régime

Race	Régime	Sain	Stress	Malade	Total
Holstein	- C0	4	0	2	6
	- C1	8	1	1	10
	- C3	3	0	0	3
Jersiaise	- C0	4	2	0	6
	- C1	2	0	1	3
	- C3	1	1	0	2
Normande	- C0	7	3	1	11
	- C1	7	0	2	9
	- C3	7	0	0	7
Total		43	7	7	57

Au niveau des races, les Jersiaises sont les plus perturbées ou malades avec 36% d'animaux ayant un problème contre 22% et 21% pour les Normandes et les Holstein.

Au niveau des régimes alimentaires, ce sont les animaux sans apports de concentrés (C0) qui sont les plus touchés avec 35% d'individus perturbés ou malades contre 23% et 8% pour les individus des régimes C1 et C3. Les animaux de la catégorie C0 sont mis dans un état de challenge nutritionnel. Leurs besoins énergétiques ne sont pas atteints et les animaux doivent

puiser dans leurs réserves corporelles. Ils sont donc plus susceptibles de développer un stress métabolique ou une maladie. A l'inverse, les animaux en C3 ont reçu une complémentation dans le dernier tiers de la lactation précédente, ils ont pu reconstituer une partie de leurs réserves corporelles et sont les moins impactés par des troubles. Les animaux en C1 sont trois fois plus touchés que les C3, ce qui suggère que le dernier tiers de lactation est un moment crucial pour préparer la lactation à venir. Cette période semble plus importante qu'une complémentation au début de la lactation où l'animal est au pic de son déficit énergétique et où sa capacité d'ingestion est encore limitée.

6.2.2. Comparaison des métabolites de nos différentes classes

Les métabolites dosés sont des indicateurs du fonctionnement de différents organes. Comme vu précédemment, les AGNE, le BHB et le glucose sont des indicateurs du déficit énergétique, de la mobilisation des réserves lipidiques et des troubles métaboliques. La bilirubine est un produit de dégradation de l'hémoglobine sécrété dans la bile et est un indicateur du fonctionnement hépatique (Russell et Roussel, 2007). La créatinine est un sous-produit azoté du métabolisme musculaire produit en quantité constante, des concentrations soudainement élevées traduisent un dysfonctionnement rénal (Russell et Roussel, 2007). L'urée est un des principaux composants de l'urine des mammifères produit dans le foie par le métabolisme des acides aminés et sécrétée dans le rumen par la salive. C'est un indicateur assez variable dans le temps qui a tendance à être plus sensible que la créatinine à des facteurs externes comme l'alimentation (Reece et al., 2015; Russell et Roussel, 2007).

En comparant les concentrations de métabolites entre nos différentes classes, nous n'observons pas de variation significative entre les groupes (voir *Figure 8*). Seule la concentration en BHB entre les groupes SAIN et STRESS à J10 est significativement différente. Les tendances observées sont une concentration en AGNE, en BHB, en bilirubine et en urée supérieure pour les animaux en stress par rapport aux autres classes à J10. Cela traduit une réponse insuffisante à un fort déficit énergétique malgré une lipomobilisation importante, et un dysfonctionnement du foie associé à l'état de stress. La concentration en glucose des animaux en stress a tendance à être plus faible que celle des autres à J10, ce qui suggère également que la réponse de l'animal est insuffisante pour rétablir la glycémie.

Le profil en métabolites de nos animaux représente leur statut métabolique à un instant donné. Au cours de ce stage, seuls les points S-2, J10 et J20 ont pu être dosés, ils traduisent uniquement le statut métabolique du début de la lactation. A l'issue du projet FAIR_Cow, l'ensemble des points de prélèvement devrait être dosés ce qui donnera une vision plus complète du statut métabolique des animaux tout au long de la lactation. En effet, les animaux placés dans la catégorie STRESS peuvent avoir une perturbation métabolique qui apparaît après les 20 premiers jours de lactation et nos profils en métabolites actuels ne permettent pas de la visualiser. De plus, le faible nombre d'individus et le déséquilibre d'effectifs dans chacune de nos classes ne permet pas d'observer de différences significatives entre nos groupes.

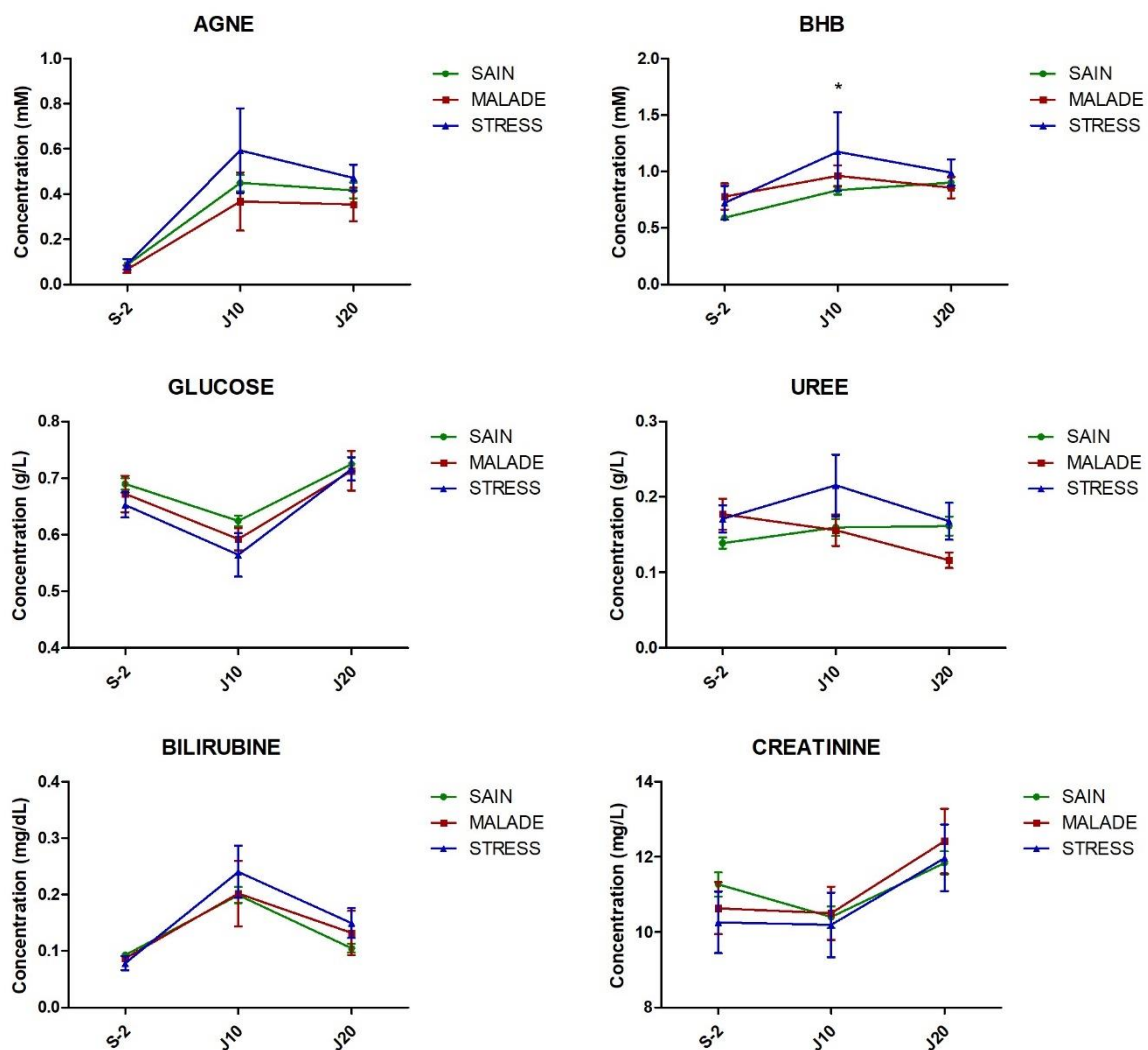


Figure 8 : Dynamique des métabolites plasmatiques des différentes classes de notre échantillon à S-2, J10 et J20 (test statistique : Anova à 2 facteurs avec mesures répétées, résultats non significatifs sauf pour le BHB entre SAIN et STRESS à J10, * : p -value < 0.05)

6.2.3. Composition en AGNE majoritaires de notre échantillon

Lors de notre analyse, 68 AGNE différents ont été détectés. Les AGNE plasmatiques majoritaires présents au début du tarissement sont en moyenne à 46% du C16 (acide palmitique), à 40% du C18 (acide stéarique), à 4,5% du C18 : 1cis9 (acide oléique). Ils représentent 90% des AGNE présents à cette période (voir *Tableau 7*). On retrouve des résultats similaires dans la bibliographie scientifique à des périodes différentes. En effet, plusieurs études récentes montrent que le C18, le C16, le C18 : 1 cis 9 et le C14 sont les AGNE plasmatiques principaux des profils des vaches laitières en début de lactation (Douglas et al., 2007; Puppel et al., 2019; Tessari et al., 2020). Une étude compare la proportion en AGNE entre le *prepartum* (14 jours avant vêlage) et le *postpartum* (jusqu'à 30 jours post-vêlage) et les acides gras majoritaires restent les mêmes, bien que leur proportion varie (Contreras et al., 2010).

Ces AGNE composent majoritairement le tissu adipeux des vaches au *peripartum* et sont relâchés dans le sang suite à la lipolyse (Contreras et al., 2010; Puppel et al., 2019). Leur concentration augmente notamment autour du vêlage en réponse à un déficit énergétique important et à la mobilisation des réserves lipidiques.

Tableau 7 : Profil des AGNE majoritaires des animaux sains de notre échantillon à S-6 avant vêlage (les AGNE en proportion inférieure à 0,03% n'ont pas été représentés)

* Moyenne \pm écart-type

AGNE identifié	Proportion relative moyenne (%) *
C16	46,11 \pm 3,40
C18	39,48 \pm 4,61
C18_1cis9	4,56 \pm 2,71
C14	1,36 \pm 0,42
C17	0,55 \pm 0,13
C20_1cis11 + C18_3n-3*	0,55 \pm 0,15
C16_1cis9	0,47 \pm 0,36
NI73	0,45 \pm 0,08
C18_2n-6ciscis	0,43 \pm 0,10
C17_1cis9	0,38 \pm 0,35
C15	0,34 \pm 0,12
C20	0,30 \pm 0,07

6.3. Impact de la race, du régime et de la parité sur les AGNE identifiés

Dans un premier temps, on s'est intéressé aux facteurs de variations majoritaires entre les animaux de notre échantillon, c'est-à-dire la race, le régime et la parité. L'objectif était de déterminer si ces facteurs avaient un impact sur leur profil en AGNE, nous avons donc comparé la proportion relative moyenne de chaque AGNE entre les trois races, puis entre les trois régimes, puis entre les trois stades de lactation. Nous avons sélectionné uniquement les animaux de la classe SAIN pour cette analyse. Pour faire cette comparaison, des tests Anova à un facteur de variation ont été réalisés, nous n'étions pas dans les conditions statistiques qui permettent de regarder la corrélation des trois facteurs en même temps en raison du faible effectif au sein de chaque groupe (Race x Régime x Parité). Un exemple des sorties Rstudio est disponible en Annexe 3.

Sur les 68 AGNE analysés, seuls 9 sont associés soit à un effet race, régime ou parité significatif (voir *Tableau 8*). L'effet régime est le plus marqué avec 7 AGNE qui ont des proportions significativement différentes entre les groupes. Lorsque qu'il y a un effet significatif, le régime C3 est toujours statistiquement différent des groupes C0 et C1.

Les effets races et parité sont donc quasiment inexistantes et l'effet régime est faible sauf pour quelques AGNE identifiés. Les deux premiers effets n'apparaissent quasiment pas dans la littérature scientifique sauf une étude ancienne qui n'avait pas montré de différences de profils d'AGNE majoritaires entre les races Holstein, Jersiaise et Guernesey (Yamdagni et Schultz, 1970). Par contre, l'effet de l'alimentation a été étudié à de nombreuses reprises que ce soit sur la composition des acides gras du lait (Fougère et al., 2018) ou du plasma (Douglas et al., 2007). Dans notre étude, les animaux au point analysé (S-6) avaient tous la même ration sans

complémentation car il s'agit de la période de tarissement. Il est donc cohérent d'observer un faible impact de l'alimentation sur nos profils. Seul le groupe en C3 a reçu des concentrés jusqu'à deux semaines avant le prélèvement, ce qui explique que ce soit le groupe significativement différent des deux autres pour quelques AGNE. L'étude de Douglas et al., (2007) observe un impact d'une alimentation différente pendant le tarissement sur le profil en acide gras des lipides totaux du plasma au *postpartum*. Cependant, l'impact à long terme de l'alimentation sur le profil en AGNE sur la période de tarissement n'a pas été étudié dans la littérature scientifique.

Au vu des résultats sur notre jeu de données, on va pouvoir s'affranchir des effets races, régimes et parités dans nos analyses suivantes, ce qui augmente les effectifs dans chaque groupe.

Tableau 8 : Comparaison de la composition des profils en AGNE en fonction de l'effet race (premier tableau), de l'effet régime (deuxième tableau) et de l'effet parité (troisième tableau) en proportion relative dans l'échantillon

Test statistique : Anova à un facteur, seuls les AGNE ayant une différence significative sont représentés, *** : p-value < 0.001, ** : p-value < 0.01, * : p-value < 0.05

Les valeurs de Iso15, C14 : 1cis9 et C20 : 4n-6 ont été transformées (log10) pour suivre une loi normale

	Race			P-value
	Ho	Je	No	
Iso15	0,141 ± 0,062	0,135 ± 0,044	0,134 ± 0,041	
C14_1cis9	0,065 ± 0,054	0,049 ± 0,030	0,050 ± 0,027	
Iso18+C17_1trans10?*	0,032 ± 0,013	0,039 ± 0,017	0,029 ± 0,012	
C18_1cis15+C19	0,064 ± 0,029	0,070 ± 0,017	0,067 ± 0,030	
C20_1cis11+C18_3n-3*	0,557 ± 0,150	0,561 ± 0,156	0,518 ± 0,156	
C20_3n-6	0,024 ± 0,007	0,020 ± 0,006	0,025 ± 0,008	
C20_4n-6	0,040 (a) ± 0,015	0,028 (b) ± 0,011	0,041 (a) ± 0,010	*
C24_1n-9*	0,059 ± 0,015	0,058 ± 0,015	0,054 ± 0,013	
NI79	0,152 ± 0,086	0,174 ± 0,070	0,165 ± 0,066	

	Régime			P-value
	C0	C1	C3	
Iso15	0,155 (a) ± 0,034	0,136 (a,b) ± 0,059	0,111 (b) ± 0,040	*
C14_1cis9	0,048 (a,b) ± 0,026	0,071 (a) ± 0,048	0,039 (b) ± 0,030	**
Iso18+C17_1trans10?*	0,038 (a) ± 0,014	0,030 (a,b) ± 0,012	0,025 (b) ± 0,012	*
C18_1cis15+C19	0,066 ± 0,023	0,066 ± 0,028	0,068 ± 0,034	
C20_1cis11+C18_3n-3*	0,601 (a) ± 0,163	0,542 (a,b) ± 0,147	0,451 (b) ± 0,102	*
C20_3n-6	0,019 (a) ± 0,006	0,022 (a) ± 0,005	0,031 (b) ± 0,005	***
C20_4n-6	0,034 (a) ± 0,010	0,037 (b) ± 0,015	0,048 (a,b) ± 0,007	**
C24_1n-9*	0,057 ± 0,017	0,055 ± 0,010	0,057 ± 0,015	
NI79	0,125 (a) ± 0,055	0,166 (a,b) ± 0,061	0,204 (b) ± 0,092	*

	Parité			P-value
	1	2	3	
Iso15	0,139 ± 0,039	0,134 ± 0,065	0,128 ± 0,055	
C14_1cis9	0,053 ± 0,027	0,062 ± 0,059	0,044 ± 0,027	
Iso18+C17_1trans10?*	0,029 ± 0,012	0,032 ± 0,011	0,038 ± 0,023	
C18_1cis15+C19	0,059 (a) ± 0,020	0,068 (a,b) ± 0,032	0,096 (b) ± 0,034	*
C20_1cis11+C18_3n-3*	0,514 ± 0,140	0,587 ± 0,178	0,530 ± 0,123	
C20_3n-6	0,023 ± 0,007	0,024 ± 0,007	0,028 ± 0,009	
C20_4n-6	0,042 ± 0,014	0,034 ± 0,009	0,034 ± 0,012	
C24_1n-9*	0,061 (a) ± 0,013	0,052 (a,b) ± 0,014	0,045 (b) ± 0,008	*
NI79	0,154 ± 0,067	0,160 ± 0,085	0,201 ± 0,074	

6.4. Recherche d'un AGNE indicateur précoce d'apparition d'une perturbation ou d'une maladie

6.4.1. *Variation inter-individuelle de la proportion relative de chaque AGNE par classe*

Une première approche visuelle est réalisée par le biais d'une heatmap qui est une représentation d'une matrice à deux dimensions avec un nuancier de couleurs. Nos données sont d'abord standardisées (centrées réduites) puis représentées selon la règle de décision suivante : les cases blanches représentent les valeurs proches de la moyenne (entre -1 et 1), les vertes représentent les valeurs les plus faibles (< -1) et les rouges les plus fortes (> 1). Cela permet d'observer la surreprésentation (proportion plus élevée dans le profil) ou la sous-représentation (proportion plus faible) d'un AGNE par rapport à la moyenne. On réalise un tri avec comme premier critère la répartition de nos classes STRESS, SAIN, MALADE et en deuxième critère en ordre croissant sur le C16 qui est l'AGNE le plus majoritaire dans nos profils (voir *Figure 9*).

On observe une grande variabilité des comportements des profils en AGNE entre les individus. Il n'est pas possible d'observer une tendance même au sein de nos classes. Nos animaux malades et en stress ne présentent pas une proportion plus importante ou plus faible de certains AGNE qui pourraient nous permettre de les discriminer du reste du troupeau.

Cette approche visuelle est confirmée par des analyses statistiques : des tests ANOVA pour chaque AGNE en fonction de la classe attribuée à l'animal. Aucun AGNE ne ressort significatif. Les animaux classés STRESS ou MALADE ne présentent donc pas de différence dans leur proportion d'AGNE par rapport au reste du troupeau.



Figure 9 : Heatmap des proportions relatives de chaque AGNE en fonction des classes

6.4.2. Variation inter-individuelle de la concentration relative de chaque AGNE par classe

La concentration relative nous donne une information différente de la proportion. L'aire sous la courbe de chaque AGNE, après la correction sur le rendement de l'extraction nous permet de comparer entre eux chacun de nos échantillons en quantité comparable. Les AGNE peuvent être en proportion équivalente d'un profil à l'autre mais en concentration différente si par exemple un individu a une concentration totale en AGNE plus importante qu'un autre. Biologiquement, l'information portée par une concentration a un impact important sur la régulation du métabolisme. Chaque récepteur s'associe à une molécule spécifique selon une constante d'affinité. La variation de concentration de cette molécule spécifique va conduire à l'activation ou l'inactivation du récepteur. C'est le cas notamment des AGNE à longue chaîne qui, par exemple, s'associent aux récepteurs PPAR et régulent différentes grandes fonctions comme le métabolisme des lipides (Bionaz et al., 2020; Nakamura et al., 2014).

Comme pour les proportions relatives, nous commençons par une première approche avec une heatmap. On représente donc les variations des concentrations relatives d'AGNE dans le profil de chaque animal avec en vert des valeurs plus faibles et en rouge des valeurs plus élevées. De nouveau le même tri en fonction de la concentration en C16 et de la classe est réalisé (voir *Figure 10*).

Dans la classe SAIN qui présente l'effectif le plus important, on observe une variabilité et un gradient des quantités en AGNE en fonction des animaux. Cela traduit une corrélation entre la concentration de C16 et la concentration en AGNE globale : plus le C16 est élevé et plus les concentrations des autres AGNE ont tendance à être élevées et inversement. On a donc des animaux avec des concentrations plus faibles pour tous les AGNE et des animaux avec des concentrations plus fortes pour tous les AGNE (voir *Figure 10*). On observe aussi des individus avec des schémas plus complexes : des concentrations plus élevées pour certains AGNE et plus faibles pour d'autres. Les animaux des catégories STRESS et NI semblent présenter un schéma de concentration variable. Dans la catégorie MALADE, un animal a des valeurs d'AGNE élevées, les autres présentent plutôt des valeurs plus faibles que la moyenne. Cette approche ne nous permet pas d'observer une tendance commune au sein des classes qui permettrait de les différencier.

Les analyses statistiques (tests ANOVA pour chaque AGNE en fonction de la classe) confirment cette tendance. Aucun AGNE ne ressort significatif. Les animaux classés STRESS ou MALADE ne présentent donc pas de différences dans leur concentrations d'AGNE par rapport au reste du troupeau.

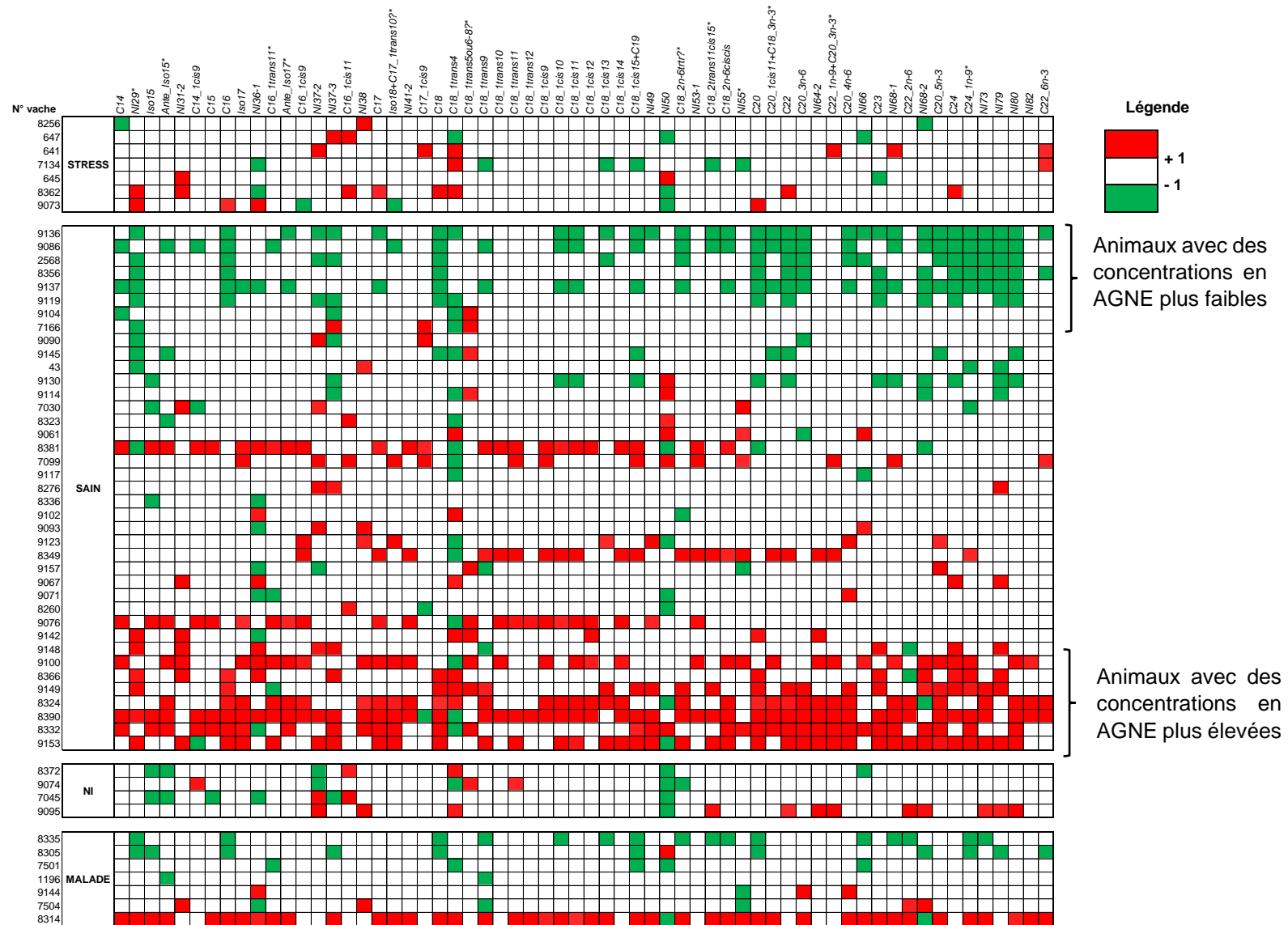


Figure 10 : Heatmap des concentrations relatives des AGNE en fonction des classes

Nos résultats ne permettent donc pas d'identifier des AGNE qui, individuellement, seraient des indicateurs précoces de perturbations métaboliques ou de maladies. Pour aller plus loin dans l'analyse, nous allons vérifier si une combinaison de plusieurs AGNE pourrait indiquer une apparition d'une perturbation ou maladie dans les semaines suivantes.

6.5. Recherche d'une combinaison d'AGNE qui indiquerait précocement l'apparition d'une perturbation ou d'une maladie

6.5.1. *Le modèle de régression logistique LASSO*

Nous cherchons à expliquer une des classes en fonction d'une combinaison d'AGNE et pouvoir ainsi créer un modèle qui prédit la classe en fonction des mesures observées sur les AGNE. Nous avons un nombre potentiel de facteurs explicatifs importants (68 AGNE) alors que notre nombre d'observations est limité à 57 individus. Les modèles de régression classique ont tendance à surestimer leur performance en augmentant le nombre de variables explicatives (Ranstam et Cook, 2018). Or nous cherchons à obtenir un modèle qui donne une combinaison d'AGNE associée à l'apparition d'une perturbation et non un modèle qui nous explique les classes avec tous les AGNE. La **régression LASSO** (Least Absolute Shrinkage and Selection Operator) est une méthode statistique qui permet de réduire et sélectionner les variables explicatives d'un modèle (Tibshirani, 1996). Elle réduit un certain nombre de coefficients, en fixe certains sur zéro et optimise la sélection des coefficients qui minimisent l'erreur de prédiction. On diminue ainsi le biais des régressions classiques (Ranstam et Cook, 2018).

6.5.2. *Application du modèle à nos données*

Plusieurs modèles sont créés pour expliquer nos groupes : MALADE, STRESS et PROBLEME (regroupement MALADE et STRESS). On a donc une variable binaire (MALADE : oui/non ; STRESS : oui/non, PROBLEME : oui/non) à expliquer en fonction de variables quantitatives, on choisit donc un **modèle de régression logistique**. La suite de l'explication est illustrée avec l'exemple de la variable à expliquer PROBLEME sur les données en AGNE en proportion relative mais les analyses ont également été faites sur les données en concentration relative et pour les trois classes présentées.

Le package « grplasso » dans R est utilisé (Meier et al., 2008). « Group-LASSO » est une extension du LASSO qui s'applique aux régressions logistiques. Dans un premier temps, on attribue un « poids » plus élevé à nos individus avec une réponse positive sur la variable à expliquer pour éviter le biais sur les effectifs déséquilibrés : le modèle a plus de chance de prédire aléatoirement des individus sains que ceux avec une perturbation car les individus sains représentent plus de 68% de notre échantillon.

Le principe de la régression LASSO est d'imposer une contrainte (λ) sur les paramètres du modèle pour réduire le nombre de coefficients. On simule plusieurs modèles avec différentes valeurs de λ (plus la contrainte est élevée et plus le nombre de variables explicatives est restreint).

	FP	FN	accuracy	n_var
1	0	14	0.7543860	0
2	13	2	0.7368421	7
3	10	1	0.8070175	9
4	5	0	0.9122807	17
5	1	0	0.9824561	26

	FP	FN	accuracy	n_var
1	20	8	0.5087719	7
2	15	5	0.6491228	9
3	12	7	0.6666667	17
4	13	9	0.6140351	26

Figure 11 : Sortie du logiciel R sur la régression Group-Lasso pour le modèle expliquant la variable "PROBLEME" sans validation croisée (à gauche) et avec validation croisée (à droite)

La sortie obtenue sans validation croisée (voir *Figure 11 à gauche*) présente six modèles différents en fonction de λ . A partir de 17 variables, le modèle arrive à ne plus prédire de faux négatifs (des animaux avec un problème qu'il classe en sain) et a un taux de précision supérieur à 91%. Avec 26 variables, il ne prédit plus qu'un seul faux positif (un animal sain chez les malades). Le modèle arrive donc à bien à expliquer nos classes, bien que le nombre de variables explicatives (17 ou 26) commence à être élevé par rapport à notre nombre d'individus ($n = 57$). Le problème de cette méthode est que l'apprentissage se fait sur notre échantillon, le modèle est donc efficace pour prédire les données qu'il connaît. Afin d'avoir un modèle généralisable et choisir la bonne valeur λ , on utilise une méthode de validation croisée appelée « *k-fold* » qui consiste à diviser nos données en k sous-parties aléatoires, d'utiliser $k-1$ sous-parties pour développer le modèle et de le valider avec la sous-partie restante. On l'effectue k fois pour utiliser tour à tour toutes les sous-parties et avec différentes valeurs de contraintes. Ainsi, on diminue le surajustement qui est propre à notre échantillon (Ranstam et Cook, 2018). La sortie obtenue avec validation croisée (voir *Figure 11 à droite*), présente plusieurs modèles très différents de celle sans. Le modèle avec 17 variables explicatives donne 7 faux négatifs sur 14 et 12 faux positifs avec un taux de précision à 66%. Si on augmente le nombre de variables explicatives, la prédiction est encore moins bonne.

Le modèle n'arrive donc pas à identifier une combinaison d'AGNE qui discrimine suffisamment les classes entre elles. Le résultat est le même pour chacune des classes testées que ce soit sur les proportions ou les concentrations relatives. Les animaux SAIN et MALADE ne présentent pas de schémas d'AGNE suffisamment homogènes pour les différencier du reste du troupeau.

7. Discussions et perspectives

Nos résultats ne permettent pas d'identifier des AGNE de manière individuelle ou combinée comme des indicateurs précoces de l'apparition d'une perturbation ou d'une maladie sur nos animaux. Pour autant, nous n'excluons pas que les AGNE puissent être des indicateurs. En effet, plusieurs facteurs peuvent impacter nos résultats et donc notre réponse à l'hypothèse de départ.

Tout d'abord, le projet Tripl'XL est une expérimentation système complexe avec beaucoup de facteurs de variations : plusieurs races (Holstein, Jersiaise, Normande), plusieurs régimes (C0, C1, C3), plusieurs parités (de 1 à 3). Les animaux de notre échantillon avaient également une NEC *prepartum* variable allant de 2,25 à 5. Nos animaux n'ont donc pas tous des caractéristiques homogènes et les effectifs au sein de chaque groupe ne sont pas suffisants pour avoir un plan d'expérience équilibré. Ces facteurs inhérents à l'expérimentation ont forcément un impact sur nos résultats qui peut s'avérer difficile à quantifier.

Le point analysé, au début du tarissement, est très en amont du vêlage (6 semaines) et de l'apparition de maladies ou de perturbations métaboliques qui ont lieu au début de la lactation. Ce choix a été fait car notre objectif était de rechercher des indicateurs les plus prédictifs possibles et non des indicateurs de constatation d'un état sanitaire. Toutefois, il est possible que les AGNE indicateurs ne soient pas encore détectables à cette période-là. Très peu de travaux se sont intéressés à analyser le plasma en amont de l'apparition de la maladie, au cours de la période de tarissement. En effet, la grande majorité des études réalisées se concentre sur l'analyse du profil des acides gras pendant la lactation (Fiore et al., 2020; Puppel et al., 2019). Les résultats permettent ainsi d'identifier des acides gras indicateurs de perturbations métaboliques et non des acides gras prédictifs. Dans ce cadre-là, une étude a montré que certains AGNE (C14 : 0, C18 : 1n-9, C18 : 1n-7 et C18 : 1n-3) étaient des biomarqueurs associés à un état d'hypercétonémie déclaré chez la vache laitière en début de lactation (Tessari et al., 2020).

Cependant, une étude récente portant sur la composition plasmatique en AGNE des animaux en état de cétose sur la période du *peripartum*, a montré que sept jours avant le vêlage le C12 : 0 était significativement plus élevé chez les animaux du groupe contrôle par rapport à ceux du groupe cétose (avec le seuil BHB > 1,2 mM et non encore diagnostiqués). Ils ont également montré que deux ratios étaient significativement supérieurs dans le groupe cétose : C18 : 1n-9 / C12 : 0, C18 : 1n-9 / C22 : 1n-9, et les présentent comme des potentiels indicateurs de prédiction de cétose à confirmer sur des effectifs plus importants (Liu et al., 2020). Notre méthode de dosage des AGNE ne permet pas d'identifier des acides gras à faible nombre de carbone, la détection commence au C13 : 0, nous ne pouvons donc pas conclure sur le C12 : 0. De plus, pour le deuxième ratio, dans notre méthode, le C22 : 1n-9 co-élue avec le C20 : 3n-3, c'est-à-dire qu'ils sortent au même moment de la chromatographie et qu'ils sont très difficiles à différencier. L'analyse du ratio C18 : 1n-9 / C22 : 1n-9 sur nos résultats 6 semaines avant le vêlage (S-6) ne nous permet pas d'observer de différence significative entre les individus sains et les individus présentant des concentrations en BHB > 1,2 mM (voir *Figure 12*). Toutefois, nous sommes très en amont par rapport au prélèvement de l'étude de Liu et al., (2020). Ainsi, lorsque les autres points de prélèvements situés sur la période du *peripartum* seront analysés et malgré la coélution, nous pourrions regarder comment le ratio C18 : 1n-9 / C22 : 1n-9 varie sur nos données.

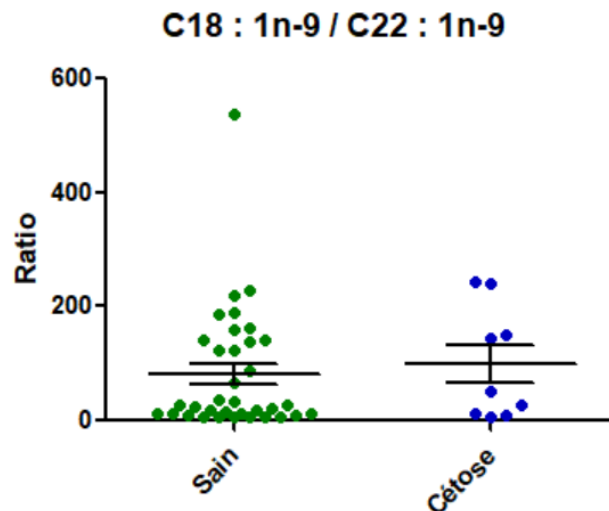


Figure 12 : Ratio C18 : 1n-9 / C22 : 1n-9 entre les animaux sains et ceux ayant un BHB > 1,2 mM au point de prélèvement S-6 avant vêlage

De plus, dans le cadre du projet FAIR_Cow, il sera intéressant de voir si l'analyse à venir des points de prélèvement S-4 et S-2, qui sont plus proches du vêlage, permet l'identification d'AGNE prédicteurs de perturbations/maladies *postpartum*. Cela permettra également de compléter la dynamique des profils en AGNE de nos animaux sur la période de tarissement. Plus nous nous rapprocherons du moment du vêlage et de la perturbation et plus nous aurons de chance d'observer des AGNE potentiellement prédicteurs car la concentration en AGNE totale augmente autour de la parturition suite à la lipomobilisation (Contreras et Sordillo, 2011). Des analyses complémentaires sur les oxylipides qui appartiennent à la famille des AGNE, vont être réalisées. En effet, l'étude récente sur de Putman et al., (2022) a réalisé le suivi plasmatique de ces acides gras libres tout au long de la période de tarissement et autour du vêlage. Ils ont montré que certains oxylipides étaient des indicateurs prédictifs de l'apparition de maladies pour certains points de prélèvements.

En ce qui concerne la classification de nos animaux dans les classes SAIN, STRESS et MALADE plusieurs biais peuvent entraîner une mauvaise classification des animaux. Tout d'abord, la campagne de production n'étant pas encore terminée, des animaux classés comme « SAIN » peuvent encore développer des maladies cliniques ou des perturbations métaboliques et ainsi perturber nos analyses statistiques.

Au niveau des métabolites, d'autres points vont être dosés (S-6, S-4 et J40, J60 et J100), ce qui permettra de compléter la dynamique des différentes concentrations déjà dosées à S-2, J10 et J20. Ces analyses pourront aider à confirmer et consolider notre groupe STRESS qui a été le plus délicat à définir.

De plus, pour définir la classe STRESS, nous nous sommes basés sur les données de production laitière jusqu'à la semaine 8 de lactation, les semaines suivantes aideront à déterminer si de nouveaux animaux présentent des perturbations après les deux premiers mois de lactation. Les données sur la reproduction rentrent également dans les performances des animaux, elles n'étaient pas disponibles au moment de l'étude mais elles seront prises en compte car elles peuvent traduire également la présence d'une perturbation.

D'autres indicateurs pourraient être utilisés pour définir plus précisément notre classe STRESS avec notamment d'autres tests hépatiques, en plus de la bilirubine. Des dosages sur les enzymes AST (aspartate aminotransférase), LDH (lactate déshydrogénase), et IDH (L- iditol déshydrogénase) sont souvent réalisés pour déterminer des problèmes hépatocellulaires chez les ruminants. Une augmentation de l'activité plasmatique de ces enzymes indique un dysfonctionnement du foie (Russell et Roussel, 2007). Le dosage de ces enzymes est

fréquemment fait dans les laboratoires de l'équipe Biomarqueurs, une réflexion est en cours pour le réaliser sur les échantillons de cette étude.

Pour la catégorie MALADE, nous n'avons pas différencié les différentes maladies développées dans notre échantillon (mammites, métrites et fièvre de lait). Nous espérons pouvoir identifier des AGNE prédicteurs non spécifiques. En effet, l'étude portant sur les oxylipides a montré qu'ils étaient des indicateurs prédictifs non spécifiques, les maladies développées dans leur groupe malade étant variables : mammite, métrite, hypocalcémie, boiterie, déplacement de la caillette, et rétention du placenta (Putman et al., 2022). Dans notre échantillon, il n'a pas été possible de déterminer des AGNE indicateurs non spécifiques d'une maladie. Comme vu dans la première partie de ce rapport, ces maladies ont des origines différentes (infectieuses et hormonales) et elles n'impactent pas le métabolisme de l'animal de la même façon. Elles n'ont potentiellement pas les mêmes indicateurs. Il faudrait faire des distinctions au sein de la classe MALADE, et rechercher des indicateurs spécifiques d'une maladie. Dans notre cas, cela n'a pas été possible en raison d'un faible effectif.

Notre analyse s'est limitée à la classe des acides gras non estérifiés mais d'autres classes de lipides sont présentes dans le plasma comme les esters de cholestérols, les phospholipides et les triglycérides. Nous nous sommes initialement focalisés sur les AGNE car ce sont les ligands des FFARs (récepteurs étudiés dans le cadre du projet FAIR_Cow). Cependant, les acides gras estérifiés (triglycérides, phospholipides, esters de cholestérol...), transportés dans le sang par des lipoprotéines, peuvent être hydrolysés en AGNE de manière transitoire et libérés à proximité des tissus cibles (muscle, tissu adipeux, ...) (Cuvelier et al., 2005). Ils peuvent donc devenir à leur tour des ligands des FFARs. On pourrait envisager des dosages sur ces classes de lipides plasmatiques pour identifier des prédicteurs de perturbations ou maladies futures.

8. Conclusion

L'objectif de cette étude était d'identifier parmi les acides gras non estérifiés plasmatiques, des potentiels indicateurs précoces du risque de développer des perturbations ou des maladies postpartum chez la vache laitière. En effet, l'hypothèse de départ était que les AGNE pourraient être des potentiels candidats car ils sont à la fois des indicateurs de troubles et à la fois des molécules bioactives qui régulent des fonctions métaboliques et immunitaires. Ainsi, des comparaisons de profils en AGNE entre des animaux sains et des animaux en stress métabolique ou des animaux malades ont été réalisées dans le cadre de ce stage. Notre analyse n'a pas permis de mettre en évidence le caractère prédictif des AGNE de manière individuelle ou combinée au début du tarissement. Les animaux de notre échantillon ne présentent pas des profils en AGNE homogènes en fonction de leur état métabolique ou sanitaire. La précocité du prélèvement analysé et les différents facteurs de variations de l'expérimentation système d'où proviennent nos individus ont sûrement un impact sur nos résultats. Des données complémentaires sur la campagne de production laitière qui est toujours en cours viendront confirmer notre classement de l'état métabolique et sanitaire des animaux. D'autres prélèvements au cours du tarissement et au début de la lactation vont être prochainement étudiés dans la suite du projet. L'hypothèse de FAIR_Cow selon laquelle la composition plasmatique en AGNE pendant la période de transition oriente l'animal vers une adaptation ou une perturbation va être poursuivie et étudiée, notamment dans le cadre d'un sujet de thèse jusqu'à la fin de l'année 2025.

Bibliographie

- Adewuyi, A. A., Gruys, E. et van Eerdenburg, F. J. C. M. (2005). Non esterified fatty acids (NEFA) in dairy cattle. A review. *Veterinary Quarterly*, 27(3), 117-126. <https://doi.org/10.1080/01652176.2005.9695192>
- Aguinaga Casañas, M. A., Schäff, C. T., Albrecht, E., Hammon, H. M., Kuhla, B., Röntgen, M., Nürnberg, G. et Mielenz, M. (2017). Short communication: Free fatty acid receptors FFAR1 and FFAR2 during the periparturient period in liver of dairy cows grouped by their postpartum plasma β -hydroxybutyrate concentrations. *Journal of Dairy Science*, 100(4), 3287-3292. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11021>
- Benedet, A., Manuelian, C. L., Zidi, A., Penasa, M. et De Marchi, M. (2019). Invited review: β -hydroxybutyrate concentration in blood and milk and its associations with cow performance. *Animal: An International Journal of Animal Bioscience*, 13(8), 1676-1689. <https://doi.org/10.1017/S175173111900034X>
- Bionaz, M., Vargas-Bello-Pérez, E. et Busato, S. (2020). Advances in fatty acids nutrition in dairy cows: from gut to cells and effects on performance. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 11(1), 110. <https://doi.org/10.1186/s40104-020-00512-8>
- Burdge, G. C., Wright, P., Jones, A. E. et Wootton, S. A. (2000). A method for separation of phosphatidylcholine, triacylglycerol, non-esterified fatty acids and cholesterol esters from plasma by solid-phase extraction. *The British Journal of Nutrition*, 84(5), 781-787.
- Church, D. C. (1993). *The Ruminant Animal: Digestive Physiology and Nutrition*. Waveland Press.
- Commun, L., Bertrand, E. et Oliveira, L. A. de. (2014, 3 décembre). IDEC : un indicateur de cétose chez la vache laitière. 21. Rencontres autour des Recherches sur les Ruminants. <https://hal.inrae.fr/hal-02740304>
- Contreras, G. A. et Sordillo, L. M. (2011). Lipid mobilization and inflammatory responses during the transition period of dairy cows. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 34(3), 281-289. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2011.01.004>
- Contreras, G. Andres et Rodríguez, J. M. (2011). Mastitis: Comparative Etiology and Epidemiology. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 16(4), 339-356. <https://doi.org/10.1007/s10911-011-9234-0>
- Contreras, G.A., O'Boyle, N. J., Herdt, T. H. et Sordillo, L. M. (2010). Lipomobilization in periparturient dairy cows influences the composition of plasma nonesterified fatty acids and leukocyte phospholipid fatty acids. *Journal of Dairy Science*, 93(6), 2508-2516. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2876>
- Coulon, J. B., Landais, E. et Garel, J. P. (1989). Alimentation, pathologie, reproduction et productivité de la vache laitière : Interrelations à l'échelle de la lactation et de la carrière. *INRA Productions Animales*, 2(3), 171-188.
- Cuvelier, C., Cabaraux, J.-F., Dufrasne, I., Istasse, L. et Hornick, J.-L. (2005). Transport sanguin et métabolisme hépatique des acides gras chez le ruminant. *Annales de Médecine Vétérinaire*, 149. <https://orbi.uliege.be/handle/2268/8397>
- Douglas, G. N., Rehage, J., Beaulieu, A. D., Bahaa, A. O. et Drackley, J. K. (2007). Parturient Nutrition Alters Fatty Acid Composition in Plasma, Adipose Tissue, and Liver Lipids of Periparturient Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*, 90(6), 2941-2959. <https://doi.org/10.3168/jds.2006-225>

- Faye, B., Landais, E., Coulon, J. B. et Lescourret, F. (1994). Incidence des troubles sanitaires chez la vache laitière : bilan de 20 années d'observation dans 3 troupeaux expérimentaux. *INRA Productions Animales*, 7(3), 191-206.
- Fiore, E., Tessari, R., Morgante, M., Gianesella, M., Badon, T., Bedin, S., Mazzotta, E. et Berlanda, M. (2020). Identification of Plasma Fatty Acids in Four Lipid Classes to Understand Energy Metabolism at Different Levels of Ketonemia in Dairy Cows Using Thin Layer Chromatography and Gas Chromatographic Techniques (TLC-GC). *Animals*, 10(4), 571. <https://doi.org/10.3390/ani10040571>
- Fougère, H., Delavaud, C. et Bernard, L. (2018). Diets supplemented with starch and corn oil, marine algae, or hydrogenated palm oil differentially modulate milk fat secretion and composition in cows and goats: A comparative study. *Journal of Dairy Science*, 101(9), 8429-8445. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14483>
- Fourichon, C., Beaudeau, F., Bareille, N. et Seegers, H. (2001). Incidence of health disorders in dairy farming systems in western France. *Livestock Production Science*, 68(2-3), 157-170. [https://doi.org/10.1016/S0301-6226\(00\)00249-9](https://doi.org/10.1016/S0301-6226(00)00249-9)
- Goff, J. P. et Horst, R. L. (1997). Physiological Changes at Parturition and Their Relationship to Metabolic Disorders^{1, 2}. *Journal of Dairy Science*, 80(7), 1260-1268. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(97\)76055-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(97)76055-7)
- Gröhn, Y. T. et Rajala-Schultz, P. J. (2000). Epidemiology of reproductive performance in dairy cows. *Animal Reproduction Science*, 60-61, 605-614. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00085-3](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00085-3)
- Kimura, I., Ichimura, A., Ohue-Kitano, R. et Igarashi, M. (2020). Free Fatty Acid Receptors in Health and Disease. *Physiological Reviews*, 100(1), 171-210. <https://doi.org/10.1152/physrev.00041.2018>
- Kossaibati, M. A. et Esslemont, R. J. (1997). The costs of production diseases in dairy herds in England. *The Veterinary Journal*, 154(1), 41-51. [https://doi.org/10.1016/S1090-0233\(05\)80007-3](https://doi.org/10.1016/S1090-0233(05)80007-3)
- Liu, L., Shen, T., Yang, W., Yu, H., Gao, S., Huang, B. et Xu, C. (2020). Ketotic cows display a different serum nonesterified fatty acid composition. *The Journal of Dairy Research*, 87(1), 52-55. <https://doi.org/10.1017/S002202991900092X>
- Mahnani, A., Sadeghi-Sefidmazgi, A., Ansari-Mahyari, S. et Ghorbani, G.-R. (2021). Assessing the consequences and economic impact of retained placenta in Holstein dairy cattle. *Theriogenology*, 175, 61-68. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2021.08.036>
- Maillard, V., Desmarchais, A., Durcin, M., Uzbekova, S. et Elis, S. (2018). Docosahexaenoic acid (DHA) effects on proliferation and steroidogenesis of bovine granulosa cells. *Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E*, 16(1), 40. <https://doi.org/10.1186/s12958-018-0357-7>
- Maizon, D. O., Oltenacu, P. A., Gröhn, Y. T., Strawderman, R. L. et Emanuelson, U. (2004). Effects of diseases on reproductive performance in Swedish Red and White dairy cattle. *Preventive Veterinary Medicine*, 66(1), 113-126. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2004.09.002>
- Martín-Tereso, J. et Martens, H. (2014). Calcium and Magnesium Physiology and Nutrition in Relation to the Prevention of Milk Fever and Tetany (Dietary Management of Macrominerals in Preventing Disease). *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 30(3), 643-670. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2014.07.007>
- Meier, L., van de Geer, S. et Bühlmann, P. (2008). The group lasso for logistic regression. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)*, 70(1), 53-71.
- Mielenz, M. (2017). Invited review: nutrient-sensing receptors for free fatty acids and hydroxycarboxylic acids in farm animals. *Animal*, 11(6), 1008-1016. <https://doi.org/10.1017/S175173111600238X>

- Nakamura, M. T., Yudell, B. E. et Loor, J. J. (2014). Regulation of energy metabolism by long-chain fatty acids. *Progress in Lipid Research*, 53, 124-144. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2013.12.001>
- Nikkhah, A., RezaGholivand, A. et Khabbazan, M. H. (2021). Milk yield depression and its economic loss due to production diseases: Iran's large dairy herds. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 22(2), 136-139. <https://doi.org/10.22099/ijvr.2021.38463.5596>
- Olde Riekerink, R. G. M., Barkema, H. W., Kelton, D. F. et Scholl, D. T. (2008). Incidence Rate of Clinical Mastitis on Canadian Dairy Farms. *Journal of Dairy Science*, 91(4), 1366-1377. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0757>
- Olmo, I., Teuber, S., Larrazabal, C., Alarcon, P., Raipane, F., Burgos, R. A. et Hidalgo, M. A. (2019). Docosahexaenoic acid and TUG-891 activate free fatty acid-4 receptor in bovine neutrophils. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 209, 53-60. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2019.02.008>
- Ospina, P. A., Nydam, D. V., Stokol, T. et Overton, T. R. (2010). Evaluation of nonesterified fatty acids and β -hydroxybutyrate in transition dairy cattle in the northeastern United States: Critical thresholds for prediction of clinical diseases. *Journal of Dairy Science*, 93(2), 546-554. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2277>
- Pantaleo, M., Rizzo, A., D'Onghia, G., D'Onghia, G., Roncetti, M., Piccinno, M., Mutinati, M., Terlizzi, M. et Sciorsci, R. (2014). Immunological Aspects Of Metritis In Dairy Cows: A Review. *Endocrine, metabolic & immune disorders drug targets*, 14. <https://doi.org/10.2174/1871530314666140527142346>
- Peeler, E. J., Green, M. J., Fitzpatrick, J. L., Morgan, K. L. et Green, L. E. (2000). Risk Factors Associated with Clinical Mastitis in Low Somatic Cell Count British Dairy Herds. *Journal of Dairy Science*, 83(11), 2464-2472. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(00\)75138-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(00)75138-1)
- Pires, J. A. A., Delavaud, C., Faulconnier, Y., Pomiès, D. et Chilliard, Y. (2013). Effects of body condition score at calving on indicators of fat and protein mobilization of periparturient Holstein-Friesian cows. *Journal of Dairy Science*, 96(10), 6423-6439. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-6801>
- Puppel, K., Gołębiewski, M., Solarczyk, P., Grodkowski, G., Slósarz, J., Kunowska-Slósarz, M., Balcerak, M., Przysucha, T., Kalińska, A. et Kuczyńska, B. (2019). The relationship between plasma β -hydroxybutyric acid and conjugated linoleic acid in milk as a biomarker for early diagnosis of ketosis in postpartum Polish Holstein-Friesian cows. *BMC Veterinary Research*, 15. <https://doi.org/10.1186/s12917-019-2131-2>
- Puppel, K. et Kuczyńska, B. (2016). Metabolic profiles of cow's blood; a review: Metabolic profiles of cow's blood. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(13), 4321-4328. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7779>
- Putman, A. K., Gandy, J. C., Contreras, G. A. et Sordillo, L. M. (2022). Oxylipids are associated with higher disease risk in postpartum cows. *Journal of Dairy Science*, 105(3), 2531-2543. <https://doi.org/10.3168/jds.2021-21057>
- Ranstam, J. et Cook, J. A. (2018). LASSO regression. *British Journal of Surgery*, 105(10), 1348. <https://doi.org/10.1002/bjs.10895>
- Reece, W. O., Erickson, H. H., Goff, J. P. et Uemura, E. E. (2015). *Dukes' Physiology of Domestic Animals*. John Wiley & Sons.
- Rémésy, C., Chilliard, Y., Rayssiguier, Y., Mazur, A. et Démigné, C. (1986). Le métabolisme hépatique des glucides et des lipides chez les ruminants : principales interactions durant la gestation et la lactation. *Reproduction Nutrition Développement*, 26(1B), 205-226.

- Roche, J. R., Burke, C. R., Crookenden, M. A., Heiser, A., Loor, J. L., Meier, S., Mitchell, M. D., Phyn, C. V. C. et Turner, S.-A. (2018). Fertility and the transition dairy cow. *Reproduction, Fertility and Development*, 30(1), 85. <https://doi.org/10.1071/RD17412>
- Russell, K. E. et Roussel, A. J. (2007). Evaluation of the Ruminant Serum Chemistry Profile. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 23(3), 403-426. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2007.07.003>
- Salat, O. (2005). Les troubles du péripartum de la vache laitière : risques associés et moyens de contrôle. *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France*, 158(2), 153-160. <https://doi.org/10.4267/2042/47763>
- Sordillo, L. M., Contreras, G. A. et Aitken, S. L. (2009). Metabolic factors affecting the inflammatory response of periparturient dairy cows. *Animal Health Research Reviews*, 10(1), 53-63. <https://doi.org/10.1017/S1466252309990016>
- Sordillo, L. M. et Raphael, W. (2013). Significance of Metabolic Stress, Lipid Mobilization, and Inflammation on Transition Cow Disorders. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 29(2), 267-278. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2013.03.002>
- Tessari, R., Berlanda, M., Morgante, M., Badon, T., Gianesella, M., Mazzotta, E., Contiero, B. et Fiore, E. (2020). Changes of Plasma Fatty Acids in Four Lipid Classes to Understand Energy Metabolism at Different Levels of Non-Esterified Fatty Acid (NEFA) in Dairy Cows. *Animals : an Open Access Journal from MDPI*, 10(8), 1410. <https://doi.org/10.3390/ani10081410>
- Tibshirani, R. (1996). Regression Shrinkage and Selection Via the Lasso. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)*, 58(1), 267-288. <https://doi.org/10.1111/j.2517-6161.1996.tb02080.x>
- Van Winden, S. C. L., Jorritsma, R., Müller, K. E. et Noordhuizen, J. P. T. M. (2003). Feed Intake, Milk Yield, and Metabolic Parameters Prior to Left Displaced Abomasum in Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*, 86(4), 1465-1471. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73730-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73730-8)
- Walsh, R. B., Walton, J. S., Kelton, D. F., LeBlanc, S. J., Leslie, K. E. et Duffield, T. F. (2007). The Effect of Subclinical Ketosis in Early Lactation on Reproductive Performance of Postpartum Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*, 90(6), 2788-2796. <https://doi.org/10.3168/jds.2006-560>
- Yamdagni, S. et Schultz, L. H. (1970). Fatty Acid Composition of Blood Plasma Lipids of Normal and Ketotic Cows. *Journal of Dairy Science*, 53(8), 1046-1050. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(70\)86343-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(70)86343-3)

Annexes

Annexe 1 : Composition en matières premières et en valeur nutritive du concentré expérimental (Source : Haras du Pin)

Matières 1ères	% brut	Valeur nutritive (1)	g/kg MS
Blé	21	MO	949
Maïs	22	MAT	141
Orge	20	CB	82
Pulpes de betteraves	20	Phosphore total	4,2
Tourteaux de colza	14	Calcium total	4,0
Mélasse	2	UFL	1,10
Sel	1	PDI	96
		BPR	-7

(1) selon Tables INRA 2018

Annexe 2 : Sorties Rstudio du modèle de régression linéaire sur la production laitière

```
## lm(formula = PL_jour ~ Jour_lact + Alim + Race + Nb_lact + Semaine_debut_lact +
##   NEC_PrePartum, data = data_reg)
##
## Residuals:
##      Min       1Q   Median       3Q      Max
## -25.1923  -2.3270  -0.2039   2.3644  16.9921
##
## Coefficients:
##              Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
## (Intercept)      5.7787     0.6454   8.954 < 2e-16 ***
## Jour_lactJ01      7.8895     0.7233  10.908 < 2e-16 ***
## Jour_lactJ02     12.4088     0.7233  17.156 < 2e-16 ***
## Jour_lactJ03     14.2123     0.7233  19.649 < 2e-16 ***
## Jour_lactJ04     15.7386     0.7233  21.760 < 2e-16 ***
## Jour_lactJ05     16.6754     0.7233  23.055 < 2e-16 ***
## Jour_lactJ06     18.0974     0.7233  25.021 < 2e-16 ***
## Jour_lactJ07     18.8123     0.7233  26.009 < 2e-16 ***
## Jour_lactJ08     18.8193     0.7233  26.019 < 2e-16 ***
## Jour_lactJ09     19.1281     0.7233  26.446 < 2e-16 ***
## Jour_lactJ10     19.3368     0.7233  26.735 < 2e-16 ***
## Jour_lactJ11     20.1579     0.7233  27.870 < 2e-16 ***
## Jour_lactJ12     19.9289     0.7233  27.553 < 2e-16 ***
## Jour_lactJ13     20.2018     0.7233  27.930 < 2e-16 ***
## Jour_lactJ14     20.0684     0.7233  27.746 < 2e-16 ***
## Jour_lactJ15     19.9149     0.7233  27.534 < 2e-16 ***
## Jour_lactJ16     20.1754     0.7233  27.894 < 2e-16 ***
```

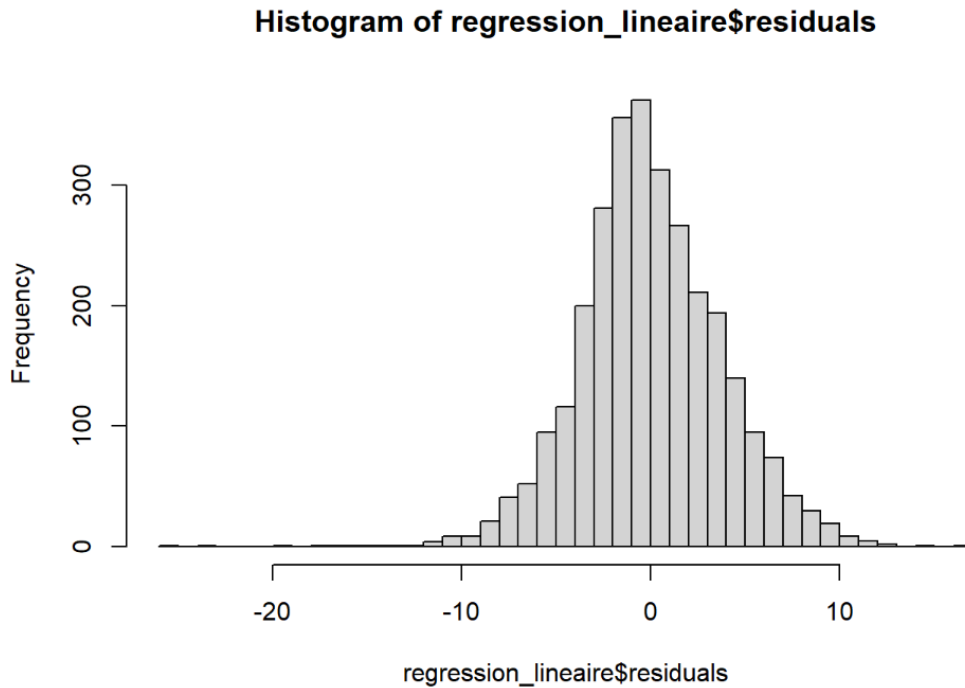
## Jour_lactJ17	20.2684	0.7233	28.022	< 2e-16	***
## Jour_lactJ18	20.2123	0.7233	27.945	< 2e-16	***
## Jour_lactJ19	20.3044	0.7233	28.072	< 2e-16	***
## Jour_lactJ20	20.4816	0.7233	28.317	< 2e-16	***
## Jour_lactJ21	20.6211	0.7233	28.510	< 2e-16	***
## Jour_lactJ22	20.9544	0.7233	28.971	< 2e-16	***
## Jour_lactJ23	21.3579	0.7233	29.529	< 2e-16	***
## Jour_lactJ24	21.0000	0.7233	29.034	< 2e-16	***
## Jour_lactJ25	21.1351	0.7233	29.221	< 2e-16	***
## Jour_lactJ26	20.9193	0.7233	28.922	< 2e-16	***
## Jour_lactJ27	20.8351	0.7233	28.806	< 2e-16	***
## Jour_lactJ28	21.0404	0.7233	29.090	< 2e-16	***
## Jour_lactJ29	20.9430	0.7233	28.955	< 2e-16	***
## Jour_lactJ30	21.0579	0.7233	29.114	< 2e-16	***
## Jour_lactJ31	21.0474	0.7233	29.099	< 2e-16	***
## Jour_lactJ32	21.3281	0.7233	29.488	< 2e-16	***
## Jour_lactJ33	21.2368	0.7233	29.361	< 2e-16	***
## Jour_lactJ34	21.4070	0.7233	29.597	< 2e-16	***
## Jour_lactJ35	20.8789	0.7233	28.867	< 2e-16	***
## Jour_lactJ36	20.8579	0.7233	28.837	< 2e-16	***
## Jour_lactJ37	20.3702	0.7233	28.163	< 2e-16	***
## Jour_lactJ38	20.9947	0.7233	29.027	< 2e-16	***
## Jour_lactJ39	20.9877	0.7233	29.017	< 2e-16	***
## Jour_lactJ40	21.3482	0.7233	29.515	< 2e-16	***
## Jour_lactJ41	21.4140	0.7233	29.606	< 2e-16	***
## Jour_lactJ42	20.8474	0.7233	28.823	< 2e-16	***
## Jour_lactJ43	20.8912	0.7233	28.884	< 2e-16	***
## Jour_lactJ44	20.8175	0.7233	28.782	< 2e-16	***
## Jour_lactJ45	20.6219	0.7233	28.511	< 2e-16	***
## Jour_lactJ46	20.0702	0.7233	27.748	< 2e-16	***
## Jour_lactJ47	20.4658	0.7233	28.295	< 2e-16	***
## Jour_lactJ48	20.6719	0.7233	28.580	< 2e-16	***
## Jour_lactJ49	20.4316	0.7233	28.248	< 2e-16	***
## Jour_lactJ50	20.4991	0.7233	28.341	< 2e-16	***
## Jour_lactJ51	20.1316	0.7233	27.833	< 2e-16	***
## AlimC1	1.6057	0.1993	8.058	1.13e-15	***
## AlimC3	-0.3633	0.2314	-1.570	0.116536	
## RaceJe	-10.0363	0.2672	-37.562	< 2e-16	***
## RaceNo	-6.0483	0.2208	-27.398	< 2e-16	***
## Nb_lact	3.5187	0.1248	28.184	< 2e-16	***
## Semaine_debut_lactS11	-1.7182	0.3844	-4.470	8.12e-06	***
## Semaine_debut_lactS12	-1.7245	0.3488	-4.945	8.07e-07	***
## Semaine_debut_lactS13	0.3611	0.4833	0.747	0.455083	
## Semaine_debut_lactS14	-2.7994	0.3997	-7.005	3.07e-12	***
## Semaine_debut_lactS15	-1.9426	0.5171	-3.757	0.000176	***

```

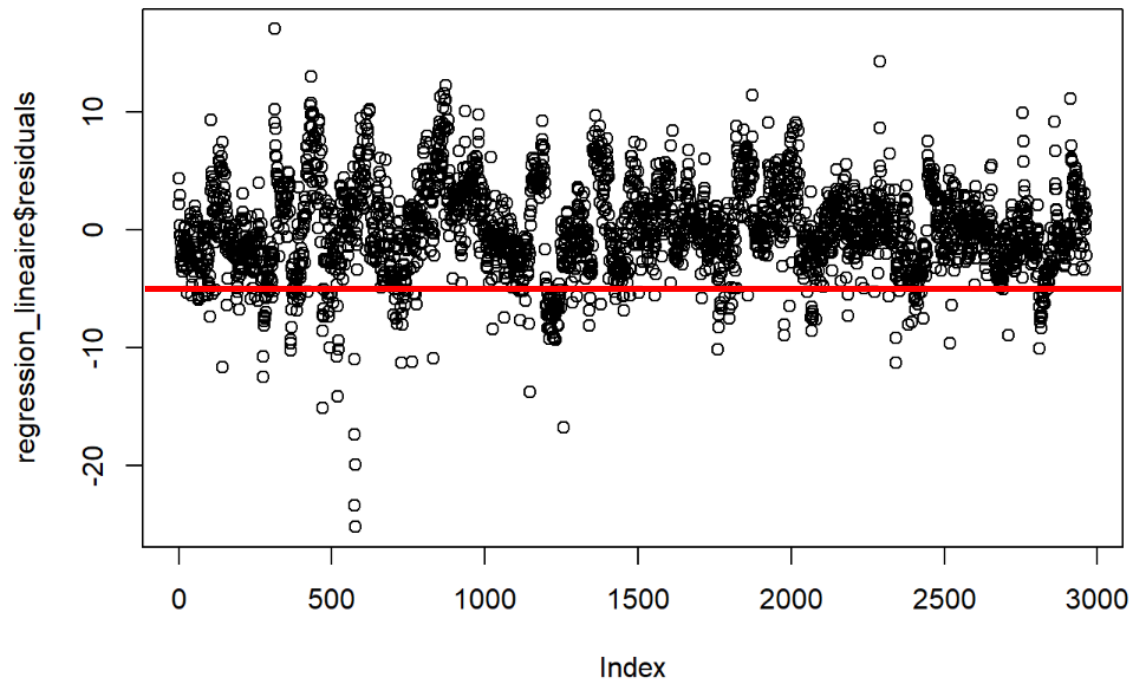
## Semaine_debut_lactS16 -3.6974    0.6385   -5.791 7.75e-09 ****
## Semaine_debut_lactS17 -1.8423    0.4964   -3.711 0.000210 ****
## Semaine_debut_lactS3  -3.6605    0.6463   -5.664 1.63e-08 ****
## Semaine_debut_lactS4  -6.4182    0.5046  -12.719 < 2e-16 ****
## Semaine_debut_lactS5  -5.1571    0.3946  -13.070 < 2e-16 ****
## Semaine_debut_lactS6  -3.2928    0.4802   -6.858 8.51e-12 ****
## Semaine_debut_lactS7  -2.5957    0.3614   -7.183 8.66e-13 ****
## Semaine_debut_lactS8  -4.9210    0.3982  -12.360 < 2e-16 ****
## Semaine_debut_lactS9  -4.5850    0.3767  -12.170 < 2e-16 ****
## NEC_PrePartumFORT      0.3524    0.3501    1.006 0.314283
## NEC_PrePartumMOYEN    -0.9122    0.2376   -3.840 0.000126 ****
## ---
## Signif. codes:  0 '****' 0.001 '***' 0.01 '**' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
##
## Residual standard error: 3.861 on 2891 degrees of freedom
## Multiple R-squared:  0.7318, Adjusted R-squared:  0.7251
## F-statistic: 109.6 on 72 and 2891 DF,  p-value: < 2.2e-16

```

Le graphique ci-dessous montre une répartition normale des résidus de la régression.



Les résidus extrêmes représentent l'écart à la production laitière qui n'est pas expliquée par les différents facteurs du modèle de régression. Les résidus négatifs sont donc des pertes de production laitière. On s'est intéressé aux animaux ayant des résidus en dessous de -5 litres comme expliqué dans la partie 6.1.2 (voir ligne rouge ci-dessous).



Annexe 3 : Exemple de sortie Rstudio des tests Anova sur l'effet Régime sur le C20 : 3n-6

Partie Script :

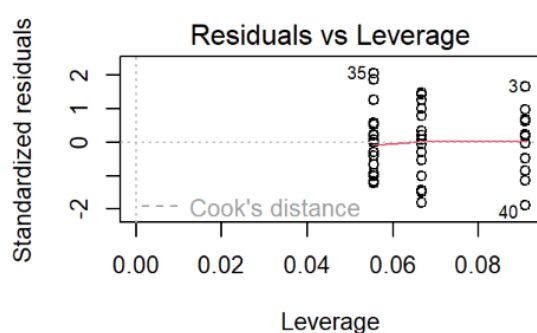
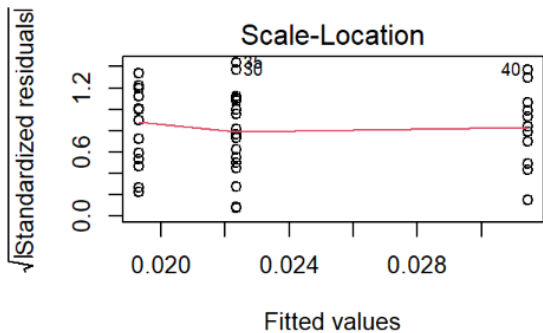
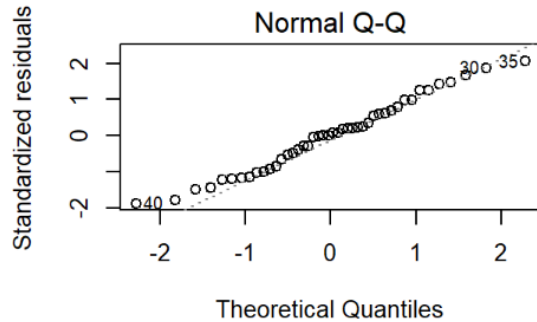
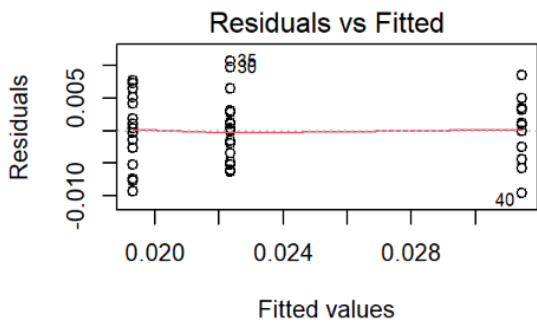
REGIME

```
for (i in 1:64){
  print(list_AGNE[i])
  test <- lm(data_sain[,i+11]~Alim, data_sain)
  test_log <- lm(log10(data_sain[,i+11])~Alim, data_sain)
  a <- shapiro.test(residuals(test))
  b <- shapiro.test(residuals(test_log))
  if (a$p.value > 0.05) t = test else t = test_log
  test_anova <- Anova(t)
  print(test_anova)
  print(a$p.value)
  print(b$p.value)
  par(mfrow=c(2,2))
  plot(t)
  test_posthoc <- tukey_hsd(t)
  print(test_posthoc)
}
```

Partie Résultats :

```
## [1] "C20_3n-6"
## Anova Table (Type II tests)
##
## Response: data_sain[, i + 11]
##           Sum Sq Df F value    Pr(>F)
## Alim      0.00097911  2  17.157 3.856e-06 ***
## Residuals 0.00116988 41
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
## [1] 0.6316092
```

Le résultat de l'Anova à 1 facteur donne une différence significative de l'effet régime avec une P-value < 0,001 (***) visible en rouge ci-dessus. La normalité de nos valeurs est vérifiée par le test de Shapiro-Wilk avec une P-value > 0,05 visible en vert ci-dessus et confirmée par les 4 graphiques ci-dessous.



Des tests post-hoc (test de Tukey) sont ensuite réalisés pour déterminer quels régimes sont significativement différents : ici C0 vs C3 et C1 vs C3 (voir ci-dessous en rouge).

```
## # A tibble: 3 × 9
##   term  group1 group2 null.value estimate conf.low conf.high  p.adj p.adj....1
## * <chr> <chr> <chr>      <dbl>   <dbl>   <dbl>   <dbl>   <dbl> <chr>
## 1 Alim  C0      C1          0  0.00303 -0.00151  0.00757  0.248      ns
## 2 Alim  C0      C3          0  0.0121  0.00696  0.0173  0.00000324 ***
## 3 Alim  C1      C3          0  0.00909  0.00412  0.0141  0.000189  ***
## # ... with abbreviated variable name 'p.adj.signif'
```


Résumé

La période de transition chez la vache laitière est une étape clé dans le cycle de l'animal qui doit s'adapter à d'importants changements nutritionnels, métaboliques et immunitaires. Des perturbations métaboliques ou des maladies peuvent survenir notamment au début de la lactation où le déficit énergétique est le plus important. Pour éviter que ces troubles viennent impacter les performances de l'animal, il faudrait déterminer des indicateurs suffisamment précoces pour pouvoir repérer les animaux qui doivent bénéficier d'une attention particulière. Les acides gras non estérifiés (AGNE), étant des molécules déjà indicatrices de troubles et des molécules actives dans la régulation de différentes fonctions métaboliques, sont des bons candidats. Pendant la période de tarissement, leurs compositions plasmatiques pourraient être des indicateurs de l'apparition de perturbations ou de maladies lors de la lactation suivante. L'objet de cette étude est donc de tester cette hypothèse. Des prélèvements de plasma sont réalisés sur la période de tarissement et sur le début de la lactation de vaches laitières de race Holstein (n = 19), Jersiaises (n = 11) et Normandes (n = 27) multipares. Trois stratégies d'alimentation sont appliquées : une complètement à l'herbe sans apport de concentré (C0), une avec apport de concentré pendant les 100 premiers jours de lactation (C1) et une avec apport de concentré pendant les 100 derniers jours de lactation (C3). Leurs compositions plasmatiques en AGNE au début du tarissement (6 semaines avant le vêlage) sont analysées par chromatographie en phase gazeuse (GC – FID). Les effets de la race et de l'alimentation sur les profils en acides gras libres sont faibles, ils ne sont pas pris en compte dans la construction de nos groupes. Les animaux sont séparés en différentes classes en fonction de leur état métabolique et sanitaire : les animaux sains (n = 43), les animaux avec une maladie clinique (n = 7), les animaux en stress métabolique (n = 7). Nos résultats ne permettent pas d'identifier d'AGNE de manière individuelle ou combinée comme des indicateurs précoces associés à une maladie ou un stress. La précocité du point analysé et les différents facteurs de variations de l'expérimentation peuvent impacter nos résultats. Des analyses complémentaires en cours ou à venir dans le cadre du projet permettront de tester ces nouvelles hypothèses.

Mots clés

Acides gras non estérifiés, vache laitière, période de transition, adaptation, perturbations métaboliques, maladies *postpartum*

Pour citer cet ouvrage : [Grell, Lisa, 2022. *Les acides gras libres, des potentiels indicateurs précoces du risque de développer des perturbations / maladies postpartum chez la vache laitière ?* Mémoire de fin d'études, diplôme Ingénieur Agronome, option : Systèmes d'élevage, L'institut Agro Montpellier. 56 pages.]

L'institut Agro Montpellier, Institut national d'études supérieures agronomiques de Montpellier, 2 place Pierre Viala, 34060 Montpellier cedex 02. <https://www.institut-agro-montpellier.fr/>