

**UNIVERSITE DE BLIDA 1**  
**Institut des Sciences Vétérinaires**

**THESE DE DOCTORAT**

En Sciences Vétérinaires

Spécialité : Sciences Vétérinaires

**ETUDE DE L'EFFET DE L'ALIMENTATION SUR LA  
REUSSITE DE L'INSEMINATION ARTIFICIELLE BOVINE EN  
ALGERIE**

Par

**Amine ABDELLI**

Devant le jury composé de :

Mr. A. BERBER	Professeur	Univ. Blida 1	Président
Mr. M. IGUER-OUADA	Professeur	Univ. Bejaïa	Directeur
Mr. R. KAIDI	Professeur	Univ. Blida 1	Co-directeur
Mr. M. LAFRI	Professeur	Univ. Blida 1	Examineur
Mme. S. TEMIM	Professeur	ENSV-Alger	Examinatrice
Mr. A. LAMARA	Maitre de conférence (A)	ENSV-Alger	Examineur

Blida, février 2018

## RESUME

La conduite alimentaire au début de lactation représente un élément clé de la réussite de la reproduction de la vache laitière. Toute erreur alimentaire durant cette période cruciale engendre un bilan énergétique négatif (BNE) sévère traduit par des troubles métaboliques avec notamment des taux élevés d'acides gras non estérifiés (AGNE) et de  $\beta$ -hydroxybutyrate (BHB) et une perte importante de la note de l'état corporel (NEC).

Justement, l'objectif du présent travail est d'étudier l'impact de l'alimentation de la vache laitière sur les performances de reproduction en ayant comme indicateurs de l'état alimentaire la clinique de la vache, via la note de l'état corporel, et les altérations biochimiques, via les taux des AGNE et du BHB. Notre approche consiste également à considérer aussi bien l'impact sur les performances de reproduction de la vache que les impacts sur la mobilité des spermatozoïdes. Les performances de reproduction de la vache retenues sont : la réussite de la première insémination (TR-1IA) et la cyclicité ovarienne (CO). Pour l'impact sur la mobilité spermatique nous avons adopté une approche retenue dans la littérature, dans d'autres espèces, et qui consiste à mettre en contact *in vitro* des spermatozoïdes et du sérum de vaches ayant des états corporels différents le jour de l'insémination. Comme première étape de notre travail, il nous a semblé important de commencer par une méta-analyse pour comprendre les réelles valeurs prédictives de BHB et des AGNE, seuls ou en association, dans les troubles de reproduction. La méta-analyse a concerné 37 différents modèles de 14 études ont été considérés pour étudier l'effet sur TR-1IA, CO, intervalle vêlage-insémination fécondante (IV-IF), les endométrites et la rétention placentaire (PR). Dans une deuxième étape des données hormonales et biochimiques de 50 vaches Montbéliardes au post-partum, ayant des AGNE  $>0.7$  mmol/l et un BHB  $>1.2$  mmol/l, sont considérées pour classer les vaches en 3 groupes ; a) vaches ayant simultanément des taux élevés en AGNE et en BHB b) des vache ayant un taux élevé uniquement en AGNE et c) des vaches saines. Pour ces trois catégories de vaches, différents paramètres biochimiques, NEC, CO et TR-1IA sont mesurés. La dernière partie de notre travail a consisté à étudier l'impact du sérum de vaches sur la mobilité spermatique. 48 vaches Holstein et Montbéliarde sont incluses dans l'étude, des dilutions dans de sérums de vaches de l'ordre de 1 : 9 (V/V) sont réalisées et les spermatozoïdes décongelés sont incubés dans ces solutions durant 5, 30 minutes et

3 heures avec analyse de la mobilité spermatique en utilisant un système CASA (Computer Assisted Semen Analysis). Les sérums proviennent de vaches classées en un état corporel supérieur ou inférieur à 3, des taux plasmatiques en AGNE supérieur ou inférieur à 0.7 mmol/l, et un BHB supérieur ou inférieur à 1.2 mmol/l.

De l'ensemble de ce présent travail, il ressort que des taux sériques élevés en AGNE et en BHB au post-partum affectent le TR-11A, la cyclicité ovarienne, augmentent le risque d'apparition d'endométrites, de rétention placentaire. Il est apparu cependant, qu'en utilisant le BHB comme indicateur prédictif, le TR-11A augmente de 32% par rapport aux AGNE. Les AGNE, par rapport au BHB, semblent ainsi être des indicateurs plus fiables des troubles de reproduction liés au niveau alimentaire des vaches. La qualité du sperme a été également affectée par le statut alimentaire des vaches. En effet, les différents paramètres de motilité ont plus conservés dans les sérums de vaches ayant une NEC élevée et détériorés dans les sérums ayant des concentrations élevées en BHB et en AGNE. Ces résultats renforcent l'hypothèse selon laquelle une partie de la faible fécondité au post-partum des vaches laitières peut être directement liée à un effet négatif sur les spermatozoïdes une fois dans l'environnement femelle.

**Mots clés :** Alimentation, BHB, AGNE, vaches laitières, performances de la reproduction.

## ABSTRACT

Feeding behavior at the beginning of lactation is a key element in the successful reproduction of the dairy cow. Any dietary error during this crucial period generates a severe negative energy balance (NEB) resulting in metabolic disorders including high levels of non-esterified fatty acids (NEFA),  $\beta$ -hydroxybutyrate (BHB) and a significant loss of Body Condition Score (BCS).

It just so, the objective of this work is to study the impact of dairy cow feeding on reproductive performance by having as indicators of the cow's clinical status, via the Body Condition Score and biochemical alterations, via the levels of NEFA and BHB. Our approach also considers both the impact on the reproductive performance of the cow and the impact on sperm motility. The reproductive performance of the selected cow is: the success of the first insemination (TR-1AI), ovarian cyclicity (OC) and the interval between calving and conception. For the impact on sperm mobility we have taken an approach adopted in the literature, in other species, which consists in putting spermatozoa and serum of cows with different body conditions into contact in vitro on the day of the insemination. As a first step in our work, it seemed important to start with a meta-analysis to understand the true predictive values of BHB and AGNE, alone or in combination, in reproductive disorders. The meta-analysis involved 37 different models from 14 papers were considered to study the effect on TR-1IA, CO, calving-conception, endometritis and placental retention (PR).

In a second step, the hormonal and biochemical data of 50 post-partum Montbéliarde cows, with NEFA > 0.7 mmol/l and a BHB > 1.2 mmol/l, are considered to classify cows into 3 groups; a) cows with high levels of both NEFA and BHB at the same time b) cows with high levels only in AGNE and c) healthy cows. For these three categories of cows, different biochemical parameters, BCS, CO and TR-1IA are measured. The last part of our work consisted of studying the impact of cow serum on sperm mobility. 48 Holstein and Montbeliarde cows are included in the study, dilutions in cow sera in the order of 1: 9 (V / V) are performed and the thawed spermatozoa are incubated in these solutions for 5, 30 minutes and 3 hours with sperm mobility analysis using a Computer Assisted Semen Analysis (CASA) system. Sera are from cows classified as less than or equal to 3 for BCS, plasma levels greater than or less than 0.7 mmol/l for NEFA and BHB greater than or less than 1.2 mmol/l.

From all of this work, it appears that elevated serum levels of postpartum NEFA and BHB affect TR-1AI, ovarian cyclicity, increase the risk of endometritis, and placental retention. It has been found, however, that using BHB as a predictor, TR-1AI increased by 32% over NEFA. The NEFA, compared to the BHB, thus seem to be more reliable indicators of reproductive disorders related to the cows' dietary level. Sperm quality was also affected by cows' dietary status.

Indeed, the different motility parameters were more conserved in sera of cows with high BCS and deteriorated in sera with high concentrations of BHB and AGNE. These results reinforce the hypothesis that some of the low postpartum fecundity of dairy cows may be directly related to a negative effect on sperm once in the female environment.

**Keywords:** Diet, BHB, NEFA, dairy cows, reproductive performance.

## ملخص

السلوك الغذائي في بداية ادرار الحليب هو عنصر أساسي لنجاح تربية الأبقار. لأن اي خطأ في التغذية خلال هذه الفترة الحاسمة قد يخلق نقص فادح في الطاقة ويؤدي الى نتائج وخيمة في الاضطرابات الايضية بما في ذلك معدلات عالية من بيتا هيدركسي البيتيرات والأحماض الدهنية وخسارة في الحالة الجسمية.

على وجه التحديد، الهدف من هذا العمل هو دراسة تأثير التغذية على الأداء التناسلي من خلال وجود مؤشرات للحالة السريرية للبقرة، عن طريق الحالة الجسمية والكيمياء الحيوية، من خلال مستويات بيتا هيدركسي البيتيرات والأحماض الدهنية. نهجنا يأخذ في عين الاعتبار أيضا كل من تأثير هذه العوامل على الأداء التناسلي للبقرة وتأثيرها على حركة الحيوانات المنوية.

للتأثير على تنقل الحيوانات المنوية اعتمدنا على وضع الحيوانات المنوية في مصل الأبقار مع حالات جسمية مختلفة. وكخطوة أولى في عملنا، بدأ من المهم أن نبدأ مع تحليل تجميعي بعدي وذلك لفهم القيم التنبؤية الحقيقية لبيتا هيدركسي البيتيرات والأحماض الدهنية، وحدها أو في تركيبة، في الاضطرابات التكاثرية.

شمل التحليل التجميعي 37 نمودجا مختلفا من 14 عمل ميداني لدراسة التأثير على نسبة نجاح التلقيح الأول، العادة الشهرية، فترة الخصاب، التهاب الرحم والاحتفاظ المشيمة. في الخطوة الثانية، تعتبر البيانات الهرمونية والبيوكيميائية ل 50 بقرة مونتبيليارد بعد الولادة، مع نسب عالية من الأحماض الدهنية (اعلى من 0.7 مليمول / لتر) وبيتا هيدركسي البيتيرات (اعلى من 1.2 مليمول / لتر)، لتصنيف الأبقار إلى 3 مجموعات. (أ) الأبقار ذات المستويات العالية لكل من بيتا هيدركسي البيتيرات والأحماض الدهنية في نفس الوقت (ب) الأبقار ذات المستويات العالية فقط من الأحماض الدهنية و (ج) الأبقار السليمة. لهذه الفئات الثلاث من الأبقار، يتم قياس المعلمات البيوكيميائية المختلفة، الحالة الجسمية، نسبة نجاح التلقيح الأول والعادة الشهرية.

وكان الجزء الأخير من عملنا من دراسة تأثير مصل البقر على التنقل الحيوانات المنوية. 48 بقرة من سلالة هولشتاين ومونتبيليارد تم الاستعانة بها في الدراسة، يتم تنفيذ التخفيفات في مصل بمقدار واحد لتسعة من الحجم ويتم تحضين الحيوانات المنوية المذاب في هذه الحلول لمدة 5، 30 دقيقة و3 ساعات مع تحليل التنقل الحيوانات المنوية باستخدام نظام تحليل المنى بمساعدة الكمبيوتر. امصال الأبقار المصنفة على أنها أقل من أو تساوي 3 بالنسبة للحالة الجسمية، مستويات البلازما أكبر من أو أقل من 0.7 مليمول / لتر بالنسبة للأحماض الدهنية، وأكبر من أو أقل من 1.2 مليمول / لتر بالنسبة لبيتا هيدركسي البيتيرات.

من كل هذا العمل، يبدو أن ارتفاع مستويات المصل من بيتا هيدركسي البيتيرات والأحماض الدهنية بعد الولادة تؤثر على نسبة نجاح التلقيح الأول، العادة الشهرية، فترة الخصاب، وزيادة خطر التهاب بطانة الرحم والاحتفاظ المشيمة. ومع ذلك، فقد تبين أن استخدام الأحماض الدهنية

كمؤشر يزيد خطر عدم نجاح التلقيح الأول بنسبة 32% على بيتا هيدركسي البيتيرات. وبالتالي، يبدو أن الأحماض الدهنية بالمقارنة مع بيتا هيدركسي البيتيرات، هي مؤشرات أكثر موثوقية للاضطرابات التناسلية المتعلقة. كما تأثرت جودة الحيوانات المنوية بالحالة الغذائية للأبقار. في الواقع، كانت معايير الحركة المختلفة أكثر تحفظا في مصل الأبقار مع ارتفاع الحالة الجسمية وتراجعت في المصل مع تركيزات عالية من بيتا هيدركسي البيتيرات والأحماض الدهنية. هذه النتائج تعزز فرضية أن بعض الخصوبة المنخفضة بعد الولادة قد تكون ذات صلة مباشرة لتأثير سلبي على الحيوانات المنوية عند توажدها في بيئة الإناث.

**كلمات مفتاح:** التغذية، الحالة الجسمية، ابقار حلوب، الأداء التكاثري.

## REMERCIEMENTS

Je remercie tout d'abord Dieu le tout puissant de m'avoir donné le courage, la force et la patience d'achever ce travail.

### **A Monsieur IGUER-OUADA M.**

Professeur à l'université de Bejaïa,

Qui nous a fait l'honneur d'encadrer notre travail,

Qui dans son éternel soutien et sa disponibilité, a permis le bon déroulement, rédactionnel de nos travaux,

Pour son aide précieuse.

Remerciements chaleureux.

### **A Monsieur KAIDI R.**

Professeur à l'université de Blida,

Qui nous a fait l'honneur de co-encadrer notre travail,

Pour ses précieux conseils et sa patience,

Qu'il trouve ici l'expression de notre profonde reconnaissance,

Hommages respectueux.

### **A Monsieur BERBER A.**

Professeur à l'université de Blida,

Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse,

Remerciements respectueux.

### **A Monsieur LAFRI M.**

Professeur à l'université de Blida,

Qui a aimablement accepté de faire partie de ce jury pour juger ce modeste travail,

Chaleureux remerciements.

### **A Madame TEMIM S.**

Professeur à l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire d'Alger,

Qui nous a fait l'honneur de participer à notre jury de thèse,

Sincères remerciements.

**A Monsieur LAMARA A.**

Maitre de conférences class-A à l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire d'Alger,  
Qui nous a fait l'honneur de siéger à notre jury de thèse,  
Sincères remerciements.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à Dr Kalem Amar, tant pour son aide à la réalisation des analyses biochimiques que pour avoir partagé ses données avec moi. Un grand merci.

J'adresse mes plus vifs remerciements au Dr Didier RABOISSON, chef de laboratoire IAHP à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse pour sa collaboration à la réalisation de l'article. Ce fut un réel honneur d'avoir pu travailler avec lui et de bénéficier de ses remarques éclairées.

Je tiens à remercier Dr Arezki BELHARET et Dr Samir, des Docteurs Vétérinaires privés à Amizour, Bejaia qui ont bien voulu collaborer à la réalisation des prélèvements sanguins.

Pour tous mes amis qui m'ont apporté leur soutien moral, je les en remercie sincèrement.

Enfin, un très grand MERCI à toute ma famille qui m'a gratifié de son amour et fourni les motivations. Je leur adresse toute ma gratitude du fond du cœur.

Merci.

# TABLE DES MATIERES

Remerciements	
Table des matières	
Liste d'abréviations	
Liste des tableaux	
Liste des figures	

INTRODUCTION GENERALE.....	17
----------------------------	----

## CHAPITRE 1 : REVUE DE LA LITT ATURE

1.1. Introduction.....	19
1.2. Processus d'adaptation biologique au bilan énergétique négatif.....	20
1.3. Sources et régulation.....	20
1.4. Stéatose hépatique.....	22
1.5. Dosage et valeurs seuils.....	25
1.6. Taux élevés des AGNE, BHB et NEC.....	30
1.7. Taux élevés des AGNE/ BHB et la résistance à l'insuline.....	32
1.8. Taux élevés des AGNE et BHB et le stress oxydatif.....	33
1.9. Effets des AGNE et BHB sur la production laitière.....	33
1.10. Effets sur l'immunité.....	35
1.11. Effets sur la reproduction.....	35
1.11.1. Effet sur l'axe hypothalamo-hypophysaire.....	37
1.11.2. Effet sur la stéroïdogénèse.....	37
1.11.3. Effet sur l'utérus.....	38
1.11.4. Effet sur les ovocytes et le développement embryonnaire.....	39
1.11.5. Effet sur les spermatozoïdes dans l'environnement femelle.....	41
1.12. Conclusion.....	41

## **CHAPITRE 2 : TAUX ELEVES DE B-HYDROXYBUTYRATE ET DES ACIDES GRAS NON ESTERIFIES AU PERI-PARTUM ET LEUR ASSOCIATION AVEC LES PERFORMANCES ET LES TROUBLES LIES A LA REPRODUCTION CHEZ LA VACHE LAITIERE : META-ANALYSE**

2.1. Méta-analyse : définition, principe de base et interprétation des résultats .....	43
2.2. Matériels et méthodes.....	45
2.2.1. Position du problème et contexte de l'étude .....	45
2.2.3. Recherche bibliographique et sélection des documents .....	45
2.2.4. Organisation et résumé des données .....	46
2.2.4. Procédure de la Meta-analyse .....	47
Tableau 5 : Définition des modérateurs décrits dans la bibliographie et dans les méta-régressions.....	48
2.3. Résultats .....	49
4.1. Taux de réussite à la première insémination artificielle (TRIA-1).....	51
2.3.1. Cyclicité ovarienne au post-partum (CO) .....	52
2.3.2. Intervalle vêlage-insémination fécondante .....	53
2.3.3. Endométrites .....	53
2.3.4. Rétention placentaire .....	53
2.4. Discussion .....	56
2.5. Conclusions.....	58

## **CHAPITRE 3 : TAUX ELEVES DE B-HYDROXYBUTYRATE ET/OU DES ACIDES GRAS NON ESTERIFIES AU POST-PARTUM ET LEUR ASSOCIATION AVEC LES METABOLITES PLASMATIQUES, L'ETAT CORPOREL ET LES PERFORMANCES DE REPRODUCTION CHEZ LA VACHE LAITIERE**

3.1. Introduction.....	59
3.2. Matériel et méthodes.....	60
3.2.1. Animaux .....	60
3.2.2. Prélèvement du sang et estimation de la NEC .....	61
3.2.4. Détermination de la CO et diagnostic de gestation.....	62
3.2.5. Analyses statistiques.....	62
3.3. Résultats .....	63
3.3.1. Métabolites.....	63
3.3.2. Profil et perte du NEC .....	65

3.3.3.	Cyclicité ovarienne.....	66
3.3.4.	Réussite d'IA 1 .....	67
3.4.	Discussion .....	68
3.5.	Conclusion .....	71

## **CHAPITRE 4: EFFET DU PLASMA DES VACHES EN DIFFERENTS STATUTS ENERGETIQUES SUR LA MOTILITE SPERMATIQUE ET LA DISTRIBUTION DES SOUS-POPULATIONS SPERMATIQUES DE LA SEMENCE BOVINE**

4.1.	Introduction .....	72
4.2.	Matériel et méthodes.....	73
4.2.1.	Animaux, prélèvement sanguin et analyses.....	73
4.2.2.	Semence et incubation post-congélation.....	74
4.2.3.	Evaluation de la motilité spermatique .....	76
4.2.4.	Analyses statistiques .....	77
4.3.	Résultats .....	78
4.3.1.	Effet sur la motilité totale des spermatozoïdes .....	78
4.3.2.	Description des sous-populations de spermatozoïdes .....	79
4.3.3.	Répartition des sous-populations par rapport aux niveaux des NEC, du BHB, des AGNE et du groupe contrôle .....	81
4.3.3.1.	SP1 et 2 versus SP3 .....	81
4.3.3.2.	SP2 versus SP1 .....	83
4.4.	Discussion .....	84
4.5.	Conclusion .....	86
	DISCUSSION GENERALE .....	87
	CONCLUSION GENERALE ET RECOMMANDATIONS.....	91
	PERSPECTIVES .....	93
	LISTE D'ABREVIATION.....	94
	LA LISTE DES REFERENCES.....	96

# LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 :	Dispositifs évaluant la CSC au chevet de la vache	25
Tableau 2 :	Résumé des recherches récentes sur la détermination de valeurs seuils de des AGNE au post-partum par rapport aux performances de reproduction ou l'état de santé de la vache	27
Tableau 3 :	Résumé des recherches récentes sur la détermination de valeurs seuils de BHB au post-partum par rapport aux performances de reproduction ou l'état de santé de la vache	28
Tableau 4 :	Différences de la production laitière par rapport aux élevés en AGNE et BHB	34
Tableau 5 :	Définition des modérateurs décrits dans la bibliographie et dans les méta-régressions	48
Tableau 6 :	Description de chaque étude incluse dans la méta-analyse	50
Tableau 7 :	Résultats de la méta-régression des effets des taux élevés en AGNE et BHB sur TR1IA et CO	51
Tableau 8 :	Comparaison des moyennes des moindres carrés (MMC) et l'erreur-type (ET) des métabolites plasmatiques des vaches ayant des concentrations simultanément élevées en AGNE et BHB, ayant des concentrations élevées en AGNE uniquement (AGNE-E) et les vaches saines au 30, 41 et 52 JPP	64
Tableau 9 :	Sensibilité, spécificité, avec les intervalles de confiance de 95 pourcent et la fiabilité du diagnostic basé sur le BHB, les AGNE ou les deux pour les vaches non cycliques	66
Tableau 10 :	Effet des taux élevés en BHB et/ou en AGNE sur la cyclicité ovarienne à 52 JPP	66

Tableau 11 :	Sensibilité, spécificité, avec les intervalles de confiance de 95 pourcent et la fiabilité du diagnostic basé sur le BHB, les AGNE ou les deux pour les vaches non gestantes.	67
Tableau 12 :	Effet des taux élevés en BHB et/ou en AGNE sur la réussite d'IA-1	67
Tableau 13 :	Comparaison des moyennes de moindres carrés (MMC) et des erreurs-type (ET) du pourcentage de spermatozoïdes mobiles entre les groupes NEC, BHB et AGNE (élevé, faible et contrôle) à 5, 30 minutes et 3 heures d'incubation	78
Tableau 14 :	Moyenne ( $\pm$ écart-type) des paramètres cinématiques définissant les trois sous-populations (SP1, SP2 et SP3) identifiées dans les échantillons de sperme post-décongelé de taureau	80
Tableau 15 :	Effet des catégories NEC, BHB, AGNE et contrôle sur la probabilité d'apparition des sous-populations de spermatozoïdes (SP1 et SP2 vs. SP3)	82
Tableau 16 :	Effet des catégories NEC, BHB, AGNE et contrôle sur la probabilité d'apparition des sous-populations de spermatozoïdes (SP1 vs. SP2)	83

## LISTE DES FIGURES

Figure 1 :	Sources et régulation des AGNE et BHB	24
Figure 2 :	Mécanismes de contrôle de la lipo-mobilisation chez une vache 'grasse' autour du vêlage.	31
Figure 3 :	Effet des taux élevés en AGNE et BHB sur l'axe hypothalamo-hypophysaire, l'ovaire, l'utérus et l'embryon	36
Figure 4 :	Grappe forestier illustratif d'un exemple de méta-analyse	44
Figure 5 :	Grappe en entonnoir pour évaluer le biais possible des études incluses correspondant à la méta-régression exécutée pour l'effet des taux élevés en AGNE et BHB sur le TR-1IA et la CO	54
Figure 6 :	Grappe Forestier pour le TRIA-1. Des ajustements ont été réalisés pour le modérateur "type de test"	54
Figure 7 :	Grappe forestier représentant les études incluses dans la méta-analyse pour évaluer l'effet combiné de CO	55
Figure 8 :	Grappe forestier des études incluses dans la méta-analyse pour évaluer l'effet combiné des taux élevés en AGNE et BHB sur les endométrites.	55
Figure 9 :	Moyennes des moindres carrés (MMC) $\pm$ l'erreur-type (ET) pour la NEC au vêlage, 15, 30, 41 et 52 JPP (A) et la perte de la NEC (dNEC, moyenne $\pm$ ES) pour les vaches qui ont présenté simultanément des taux élevés en AGNE et BHB, un taux élevé uniquement en AGNE (AGNE-E) et les vaches saines (SAINE).	65
Figure 10 :	Protocole de dilution et d'incubation de la semence avec le plasma des vaches	75
Figure 11 :	Les différents paramètres d'évaluation de la motilité spermatique	76
Figure 12 :	Motilité spermatique (%) (MMC $\pm$ ET) à 5, 30 minutes et 3 heures d'incubation par rapport aux groupes NEC, BHB et AGNE	79

Figure 13 : Répartition des fréquences relatives (%) des spermatozoïdes mobiles classés comme sous-population SP1, SP2 ou SP3 dans différents milieux plasmatiques selon les niveaux de NEC, BHB et AGNE et le groupe contrôle à 5, 30 minutes et 3 heures 82

## INTRODUCTION GENERALE

La vache laitière a connu un développement considérable des productions depuis le début de la sélection génétique. Aux États-Unis, le rendement laitier de l'Holstein a presque doublé depuis les années 60 pour atteindre plus de 11000 litres par lactation [2]. Cependant, cette augmentation s'est accompagnée par un déclin de la fertilité avec une augmentation de l'incidence de l'inactivité ovarienne post-partum [3, 4, 5, 6], une diminution des taux de conception à la première insémination [7, 8, 9, 10], une augmentation du nombre d'IA par conception [11] et une accentuation de la mortalité embryonnaire précoce [12, 13] et tardive [14, 15].

Cette orientation biologique extrêmement importante vers la production se traduit par la priorisation énergétique vers la production au détriment de la reproduction. De plus, la prise énergétique au début de la lactation est largement réduite due aux changements hormonaux et anatomiques liés à la gestation et à la parturition avec comme conséquence un état de bilan énergétique négatif (BEN) et des répercussions sur les performances de reproduction [16, 17, 18, 19, 20, 21, 8, 10, 26]. Dans la plupart de ces travaux, les auteurs ont utilisé les acides gras non estérifiés (AGNE) et le  $\beta$ -hydroxybutyrate (BHB) comme indicateurs du bilan énergétique négatif ou d'une cétose sub-clinique (CSC). En effet, l'élévation excessive des AGNE ou de BHB, peut indiquer une mauvaise adaptation au BEN [27] tout en étant associée à des effets négatifs sur la reprise de l'activité ovarienne [4, 26], de la production [28,29, 30] et de l'état de santé [31, 32] de la vache. La plupart de ces études ont déterminé des seuils d'AGNE et de BHB à l'échelle individuelle qui permettent aux producteurs d'identifier les vaches à risque au cours de la période de transition. Bon nombre de ces études ont utilisé des méthodes statistiques semblables et ont exprimé leurs résultats de la même manière et qui ont été confrontés par Raboisson et ses collaborateurs [32] dans une méta-analyse. Cependant, il reste aujourd'hui encore, difficile de distinguer desquels, BHB ou sont le plus liés aux mauvaises performances de reproduction. Seuls, McCarthy et al [33], ont signalé une faible corrélation entre les concentrations des AGNE et du BHB, ce qui suggère que l'effet d'un taux élevé des AGNE ne sera

pas le même que le BHB. Cependant, un nombre d'aspects sont élucidés concernant l'effet négatif des taux élevés en AGNE et en BHB sur la reproduction. Ainsi, des auteurs ont rapportés l'effet des taux élevés de ces deux bio-marqueurs sur la sécrétion hormonales au niveau central [34] , ovarien [35, 36], sur la qualité ovocytaire et embryonnaire [37, 38, 39, 40, 41, 42]. Toutefois, il n'existe, à notre connaissance, aucune étude relative à une influence de ces métabolites et la note d'état corporel (NEC), indicateurs de l'état alimentaire de la vache, sur la qualité des spermatozoïdes une fois introduits dans l'utérus. Le trajet des spermatozoïdes jusqu'à l'ovocyte dans le tractus génital femelle comprend un certain nombre d'étapes avec un processus d'interaction entre le spermatozoïde et le milieu intérieur pour optimiser la chance de la conception. Les variations métaboliques, qui sont directement liées au statut nutritionnel de la vache, influencent l'activité sécrétoire des cellules épithéliales utérines localement et par voie générale. Les sécrétions de ces dernières peuvent modifier le milieu utérin et impacter positivement ou négativement les spermatozoïdes. Il reste ainsi admis que l'environnement utérin est directement affecté par la composition du plasma sanguin.

Ainsi, les objectifs de la présente thèse s'articulent autour de trois objectifs principaux :

- 1) réaliser un état des lieux de la littérature pour comprendre les relations des AGNE et du BHB, seuls ou en association, avec les performances de reproduction ;
- 2) évaluer les effets des taux élevés en AGNE et BHB, seuls ou en association, sur la reprise de l'activité ovarienne et la réussite d'IA1 et leur association avec la NEC et certaines métabolites ;
- 3) explorer l'hypothèse selon laquelle une co-incubation des spermatozoïdes avec du plasma sanguin de vaches ayant une NEC, des AGNE et du BHB différents impactera la motilité spermatique.

# CHAPITRE 1

## REVUE DE LA LITTERATURE

### 1.1. Introduction

Le péri-partum représente un moment-clé dans la vie de la vache laitière. C'est une période qui peut se définir comme allant de 3 ou 4 semaines avant à 3 ou 4 semaines après le vêlage [43, 44]. Pendant cette période, la vache connaît un changement métabolique important en passant d'un état de non lactation à celui de lactation d'où le nom de "période de transition". Durant cette période, la vache est confrontée à une soudaine augmentation de la demande énergétique pour répondre à un besoin croissant de la mamelle. Cependant, la production laitière augmente si rapidement, que l'apport alimentaire ne peut à lui seul répondre aux besoins énergétiques [16]. Cet écart entre "l'offre et la demande" conduit à un bilan énergétique négatif (BEN) avec une mobilisation plus ou moins importante des réserves adipeuses qui se traduit biochimiquement par des concentrations élevées en AGNE et en BHB. Par ailleurs, ces taux élevés en AGNE et en BHB sont en partie liés à la sélection génétique en faveur de la production laitière [46]. Néanmoins, l'hypothèse selon laquelle un niveau de production élevé seul conduit aux taux élevés de ces métabolites est difficilement acceptable. Ils dépendent également de l'environnement et de la nutrition de la vache [47]. Il apparaît cependant intéressant de mieux connaître ces déséquilibres métaboliques en les mettant en relation avec les performances de production, de reproduction et l'incidence des maladies durant le péri-partum. Plusieurs études se sont intéressées aux taux élevés des AGNE et du BHB en péri-partum et leurs associations avec les performances de la vache laitière [32, 45, 48]. L'objectif de cette première partie est de passer en revue les mécanismes qui sont suggérés sur l'apparition, les seuils et les effets des AGNE et du BHB et leur impact sur les performances de la vache au niveau hormonale, fonctionnelle et cellulaires au cours du péri-partum.

## 1.2. Processus d'adaptation biologique au bilan énergétique négatif

Les augmentations importantes des besoins énergétiques après le vêlage pour la production laitière représente un 'challenge' nutritionnel conséquent pour la vache [44]. Ceci est d'autant plus important que la vache est dans un état où elle ne peut accroître sa capacité d'ingestion[43]. Dans ces situations, le concept de l'homéostasie bioénergétique prend toute son importance, il implique l'ensemble des facteurs endocriniens et neuroendocriniens [44] capables de répondre aux changements physiologiques et environnementaux en influençant les fonctions métaboliques de multiples tissus, y compris celles du tissu adipeux [49]. La vache doit ainsi détourner des nutriments de diverses fonctions pour maintenir sa production [50] et adapter la répartition des nutriments entre les différents systèmes en fonction de leur importance vitale.

Le tissu adipeux blanc est l'organe de stockage d'énergie le plus important de l'organisme [51]; grâce à un métabolisme adapté, il assure un ajustement permanent des apports et des pertes de métabolites lipidiques nécessaires à l'organisme [52].

## 1.3. Sources et régulation

Dans certaines conditions de BEN excessif, le processus d'adaptation biologique de la vache devient dépassé et la sollicitation des tissus adipeux blancs réduit la robustesse des vaches laitières [50]. La mobilisation massive de tissus adipeux blancs est réalisée par une diminution considérable de la lipogenèse associée à une lipolyse accrue grâce à l'action de triglycéride-lipases. Ces enzymes décomposent les triglycérides (TG) en AGNE et en glycérol [53, 54, 55]. La libération adipocytaire du glycérol et des AGNE est principalement dépendante de deux lipases hormono-sensibles (figure 1): l'ATGL (adipose triglyceride lipase) et la LHS (lipase hormono-sensible) [56, 57, 58] dont l'activité est contrôlée principalement par l'insuline et les catécholamines [51, 55]. L'enzyme ABHD5 active spécifiquement l'ATGL, en effet cette enzyme se lie aux gouttelettes lipidiques en interférant avec la périlipine [59], avec l'augmentation des niveaux d'AMPc intracellulaires, l'ABHD5 se dissocie de la périlipine et interagit avec l'ATGL pour activer l'hydrolyse des TG [55, 60]. La

sensibilité et la réponse aux catécholamines dans le tissu adipeux est augmentée par l'hormone de croissance (GH) [43, 61], mais diminuée par l'insuline [62, 63]. Les corticoïdes semblent également jouer un rôle important dans cette régulation [43, 64] en agissant sur les peroxisome-proliférateur-activé- $\gamma$  (PPRA  $\gamma$ ) et en inhibant la lipoprotéine lipase (LPL) [65] (figure 1).

Chez les ruminants, l'absorption des acides gras hydrogénés dans l'intestin grêle représente une autre source en AGNE [66]. Ces AGNE sont transportés par l'albumine [67] et peuvent être métabolisés par de nombreux tissus maternels et fœtaux pour la production d'énergie et la synthèse des graisses [27, 68]. C'est ainsi que les AGNE contribuent de façon significative à la synthèse des graisses dans la glande mammaire [69] et le reste est capté par le foie avec oxydation dans les mitochondries et le peroxyosome [48, 61]. Pour les AGNE à longues chaînes (plus de 20 carbones), c'est surtout le peroxyosome qui prend en charge majoritairement ce type d'acides gras [43, 70, 71] dont il raccourcit la chaîne carbonée à 18 carbones [71]. Ces acides gras sont ensuite généralement pris en charge par la mitochondrie [43].

La  $\beta$ -oxydation mitochondriale et peroxysomique est contrôlée par le PPRA- $\alpha$  (peroxisome proliférateur-activé récepteur- $\alpha$ ) [70] qui stimule l'acétyl-CoA carboxylase1 (ACC1) pour produire le malonyl-CoA [72].

La  $\beta$ -oxydation des acides gras a lieu principalement dans la matrice mitochondriale pour permettre la formation, à partir d'un acide gras, d'une molécule d'acétyl-CoA. L'acide gras est tout d'abord converti en acyl-CoA grâce à l'Acyl-CoA Synthetase (ACS), lequel est ensuite transformé en acylcarnitine par la carnitine palmitoyl Transférase I (CPT-1) afin d'être transloqué dans le cytoplasme de la mitochondrie par l'intermédiaire de la Carnitine Acylcarnitine Translocase (CAT). L'acyl-carnitine est ensuite reconverti en acyl-CoA par CPT-2 [72]. Dans la matrice mitochondriale, l'acyl-CoA est séquentiellement dégradé en acétyl-CoA par des tours successifs de  $\beta$ -oxydation [74]. Les acétyl-CoA formés pourront alors être complètement oxydés en présence des substrats glucoformateurs pour la formation d'oxalo-acétate à partir de pyruvate [46, 69] en facilitant son intégration dans le Cycle de Krebs [69, 74]. Cependant, si le cycle de Krebs est saturé ou les substrats glucoformateurs sont insuffisants [46], l'acétyl CoA est dérivé pour produire des corps cétoniques [27]. La synthèse des corps cétoniques, se produit donc dans la matrice mitochondriale et commence par la condensation de  $\beta$ -oxydation, dérivée de l'acétyl-coA, en acéto-acétate (AcAc) par une participation séquentielle des enzymes mitochondriales 3-

hydroxy- 3-méthylglutaryl-CoA synthase 2 (HGMCS2) et 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA lyase (HMGCL) [75]. Ensuite, cet acéto-acétate (AcAc) peut être converti spontanément en acétone, un autre corps cétonique qui n'a pas de fonction métabolique, ou en BHB par la BHB déshydrogénase 1 (BDH1) [76]. Contrairement à l'acétyl-coA qui est exclusivement intracellulaire, les corps cétoniques, sous une forme plus stable (BHB et AcAc), sont exportés dans la circulation sanguine pour leur utilisation par des tissus extra-hépatiques [77]. L'utilisation des corps cétoniques par les cellules est un processus normal du métabolisme de la vache laitière, cependant la capacité individuelle d'adaptation aux corps cétoniques peut varier d'une vache à l'autre [28].

Au début de la lactation, à mesure que le BEN augmente, les AGNE sont libérés de la réserve corporelle en grande quantité avec une augmentation importante des niveaux sériques [80]. Cette augmentation peut dépasser la capacité d'oxydation du foie [69]. De même, est observée une diminution des substrats glucoformateurs [46] tel que le glucose dû à la fois à une diminution de la sécrétion d'insuline [81] et un état transitoire de résistance à cette dernière [82] pour diriger le glucose vers le lactose afin de maintenir la production laitière [46].

Chez les ruminants, l'épithélium ruminal peut également produire le BHB et l'acéto-acétate [85] par oxydation de butyrate [356] grâce aux Acetyl-CoA acetyl transferase (ACAT) et à la 3-hydroxy, 3-méthylglutaryl CoA synthase 1 (HMGCS1) [86] (figure1). Il apparaît de plus en plus claire que la BHB n'est pas seulement un simple intermédiaire d'énergie, mais fonctionne également comme une molécule de signalisation [87]. Il est particulièrement impliqué dans la régulation de la signalisation de l'insuline [89] et la réduction de la néoglucogenèse [88].

#### 1.4. Stéatose hépatique

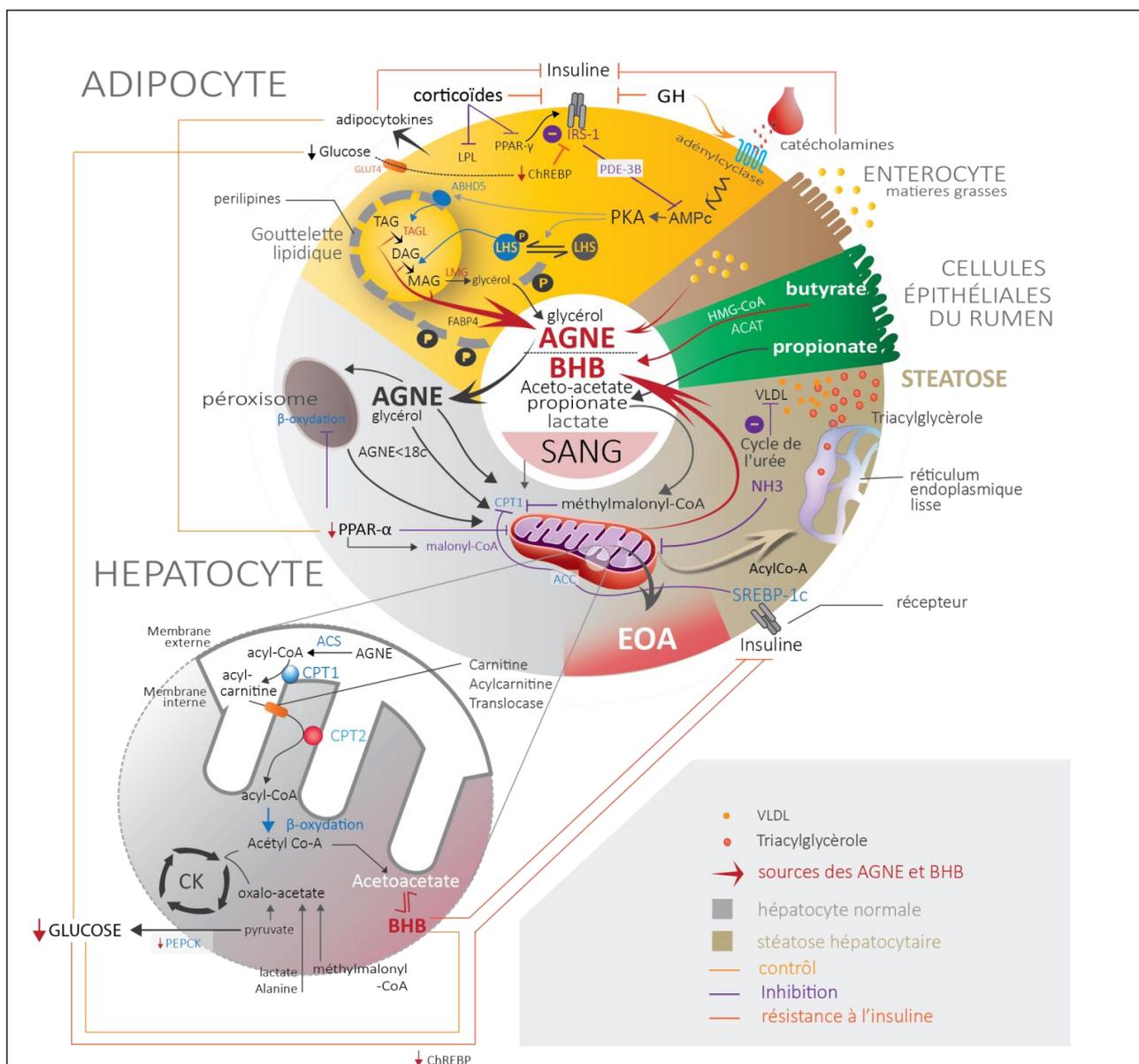
Les AGNE sous forme d'acyl-CoA qui ne sont pas métabolisés dans la mitochondrie peuvent, alternativement à la voie de l'oxydation, entrer dans le réticulum endoplasmique lisse pour y être ré-estérifiés en triglycérides, phospholipides et cholestérol [81, 90]. Ces derniers sont associés aux apolipoprotéines (ApoB100) sous forme de very low density lipoproteins (VLDL) [91]. Une altération de synthèse, de l'assemblage et/ou de la sécrétion des particules de VLDL pourra conduire à une accumulation de lipides hépatiques. De même, la résistance à l'insuline joue un rôle

important, puisque, à travers la lipolyse non régulée du tissu adipeux et la lipogenèse de novo, elle augmente le taux de lipides disponibles dans l'hépatocyte et ainsi favoriser l'assemblage des particules de VLDL [92].

L'augmentation de la production et de la sécrétion des particules de VLDL ne parvient pas à compenser la surproduction de triglycérides dont la concentration reste très élevée [93]. L'exposition prolongée du foie à des AGNE pourra induire un stress du réticulum endoplasmique (RE), ce qui impacterait directement l'export des particules de VLDL (figure 1).

Naturellement, le ruminant se caractérise, également, par un très faible taux d'exportation des VLDL [81]. Lorsque l'afflux d'acides gras augmente fortement, il entraîne une élévation de la synthèse des triglycérides même si la  $\beta$ -oxydation est nettement accrue dans les cas de cétose [70, 94]. Par ailleurs, il peut exister des situations en début de lactation où la cétogenèse est modérée et la ré-estérification importante.

La synthèse des triglycérides peut alors largement dépasser les possibilités de leur exportation sous forme de VLDL, et il se développe une stéatose hépatique [73, 77, 81, 95]. L'accumulation de VLDL dans les hépatocytes diminue en parallèle la capacité de synthèse de l'urée [96], l'ammoniac accumulé diminue à son tour l'aptitude des hépatocytes à synthétiser le glucose à partir des substrats glucoformateurs [97], ce qui limite encore la capacité hépatique de l'oxydation complète des AGNE conduisant à une accumulation excessive des corps cétoniques (sous forme surtout de BHB) et d'AGNE. De même, les effets métaboliques des taux élevés en AGNE impliqués dans la stéatose hépatique peuvent s'expliquer en partie par des actions directes ou indirectes du facteur de nécrose tumorale- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), une cytokine pro-inflammatoire synthétisée par les macrophages, les lymphocytes et principalement le tissu adipeux [98]. Ceci a été relevé par une association entre la stéatose hépatique chez les vaches laitières et des concentrations sériques de TNF $\alpha$  [99].



Les catécholamines stimulent la lipolyse via les récepteurs  $\beta$ 1- et  $\beta$ 2-adrénergiques qui augmentent le taux intracellulaire d'AMP cyclique. L'AMPc produit par l'activation de l'adénylyl cyclase active la protéine kinase A (PKA) qui stimule la phosphorylation des périlipines et de la lipase hormonosensible (LHS). La phosphodiesterase de type 3B (PDE- 3B), qui hydrolyse l'AMPc, est représentée. Cette voie exerce des effets modulateurs puissants sur la lipolyse adrénérique. Lorsque la LHS est activée (phosphorylées) et chargées sur perilipine A phosphorylée, le complexe peut accéder et hydrolyser les triglycérides en diglycérides (DG) et acides gras libres (AGL). Les monoglycérides sont hydrolysés par une lipase des monoglycérides (LMG). L'activité lipolytique de l'adipocyte est sous le contrôle permanent des voies lipolytiques ( $\beta$ -adrénérique) et antilipolytiques ( $\alpha$ 2-adrénériques, adénosine). Le contrôle du CPT-1 par le malonyl-CoA 'stimulé par l'insuline' est un moyen d'inhiber l'oxydation et la synthèse simultanées des acides gras dans la cellule hépatique. Chez les ruminants, le CPT-1 est également très sensible à l'inhibition de méthylmalonyl-CoA qui est un intermédiaire dans la conversion du propionate en succinyl-CoA dans le processus de gluconéogenèse. FABP4 (fatty acids binding protein 4) est une protéine cytosolique se liant aux AG qui est fortement exprimée dans les adipocytes et est impliquée dans le trafic intracellulaire des AG. Ce facteur agit comme un chaperon moléculaire facilitant la captation des AG et la lipolyse LPL: lipoprotéine lipase, SCD-1: stearoyl-CoA desaturase 1, ChREBP: Carbohydate-responsive element-binding protein, CPT: carnitine palmitoyl Transférase, GH: l'hormone de croissance, PEPCK: phosphoenolpyruvate carboxykinase, SREBP-1c: sterol regulatory element-binding protein 1c, ACC: acetyl-CoA carboxylase, LMG: lipase des monoglycérides, CK: cycle de Krebs, REL: réticulum endoplasmique lisse, ACS: Acyl-CoA Synthetase, EOA: espèces oxygénées activées, NH3: Ammoniac, VLDL: very low density lipoproteins; CCT, CTP: phosphocholine cytidyllyltransferase; Glut4: transporteur de glucose 4; CAT: Carnitine Acylcarnitine Translocase.

**Figure 1 :** Sources et régulations des AGNE et BHB (schéma personnel).

### 1.5. Dosage et valeurs seuils

Actuellement, il existe divers tests de terrain pour mesurer les AGNE et surtout le BHB. Ces méthodes sont semi-quantitatives ou quantitatives et peuvent utiliser le sang, le lait et les urines pour le BHB mais seulement le plasma pour les AGNE. Cependant, Enjalbert et al [101] ont rapporté une faible corrélation entre les concentrations plasmatiques de BHB et celles du lait. En revanche, Geishauser et al [102] ont rapporté une sensibilité et spécificité élevées en se basant sur un taux seuil de 1.4 mmol/l de BHB pour le lait. De même, Oetzel, [103] a rapporté que le BHB sanguin est le test le plus fiable pour détecter un cétose sub-clinique (CSC) ou bien BEN.

Plusieurs auteurs ont rapporté une association entre les concentrations de BHB mesurées par des dispositifs de terrain et ceux de référence notamment dans le sérum et le plasma de vaches laitières [104, 105, 106, 107], de brebis, de chèvres [108, 109], de chiens, de chats [110] et de l'homme [111].

Aujourd'hui, plusieurs dispositifs quantitatifs portables sont mis sur le marché pour le dosage de BHB chez l'homme et qui ont été adoptés pour le dépistage de CSC (tableau 1) chez la vache dans le sang total ou le sang capillaire [10, 31, 112]. Pour ce dernier, une lancette montée sur un auto-piqueur (humain) est utilisée sur la partie extérieure de la vulve de la vache [113].

**Tableau 1** : Dispositifs de terrain évaluant la CSC.

Appareils	Plage de mesure (mmol/l) <sup>1</sup>	Volume de sang (µL) <sup>1</sup>	Sensibilité <sup>2</sup>	Spécificité <sup>2</sup>	Validation
<b>Precision Xtra</b>	NS	1.5	88	96	Iwersen et al [104]
<b>FreeStyle Precision</b>	0.0 - 8.0	1.5	98	90	Iwersen et al [105]
<b>Glucomen LX Plus</b>	0.1 - 8.0	0.8	80	87	Iwersen et al [105]
<b>Optium Xceed<sup>3</sup></b>	0.0 - 6.0	NS	85	94	Voyvoda et Erdogan [106]

<sup>1</sup>Données à partir des fabricants

<sup>2</sup>Sensibilité et spécificité calculées à partir d'un taux seuil de 1.2 mmol/l de BHB

<sup>3</sup> la nomenclature actuelle est FreeStyle Optium®

NS : non signalé

Peu de dispositifs portables pour le dosage des AGNE sont disponibles sur le marché. Ceux qui existent sont des spectrophotomètres miniaturés qui fonctionnent avec du plasma (une centrifugeuse est nécessaire) [117] et nécessitent environ 30 minutes

pour analyser 10 à 20 échantillons [118]. Commun et al [119] ont montré une forte corrélation ( $r=0.96$ ) entre le test de référence et le test avec un dispositif portable (DVM-NEFA, Veterinary Diagnostics, Newburg, Wisconsin, États-Unis). Pour le même appareil, Leslie et al [120] ont rapporté une sensibilité et une spécificité de 84% et 96%, respectivement pour un taux seuil de 0.4 mEq/L, lesquelles deviennent 85% et 97% pour un seuil  $> 0.5$  mEq/L. Il existe également un autre dispositif portable (Vet-Photometer, Diaglobal GmbH, Allemagne) qui utilise le même principe que le précédent et mesure simultanément le calcium, le magnésium et le lactate. Il apparaît contrairement aux dosage du BHB, que le dosage des AGNE est comparativement plus difficile dans les exploitations [121] et relativement coûteux [48].

Le dosage des AGNE et BHB est fortement influencé par le *timing* d'échantillonnage [122]. Pour la BHB, le moment idéal est suggéré à 4-5 h après le repas, tandis que pour les AGNE c'est juste avant le repas. Pour les vaches souffrant de cétose de type II (stéatose hépatique), il est préférable de réaliser le dosage de 5-15 jours postpartum.

La décision pour définir un seuil approprié en utilisant des concentrations plasmatiques ou sériques des AGNE et BHB semble être arbitraire [28]. De ce fait, la définition d'un seuil de concentrations élevées en AGNE et en BHB doit être basée sur l'abaissement des performances de production [30] et de reproduction [124, 125, 126] ou sur l'état de santé de la vache [25, 28, 127]. Généralement, ces seuils sont définis au pré et postpartum pour les AGNE [4, 8] et au postpartum pour le BHB. Mc Art et al [10], Chapinal et al [128], Roberts et al [129], Yasui et al [130] et Tatone et al [116] ont défini un taux seuil de BHB au cours du pré-partum. Dans les études d'Ospina et al [25] et Dubuc et al [4] les auteurs ont rapporté que des taux élevés en AGNE au post-partum présentent une association plus élevée avec le développement des maladies ou avec des performances de reproduction faibles qu'au moment du pré-partum. Les tableaux 1 et 2 résument les recherches réalisées pour définir les seuils des AGNE et BHB par rapport aux performances ou à l'état de santé de la vache au cours de post-partum.

**Tableau 2** : Recherches réalisées sur la détermination de valeurs seuils des AGNE au postpartum par rapport aux performances de reproduction et à l'état de santé de la vache.

Seuils (mmol/l)	Temps	Paramètre prédit	sensibilité	spécificité	LR+	AUC	Risque	Référence
0.26	15, 24 et 42 JPP	Cétose sub-clinique	82.54	91.89	10.18	0.93	–	Asl et al [127]
0.47	1-9 SPP	Retard de l'activité ovarienne	100.00	64.00	2.75	0.80	1.5	Giuliodori et al [125]
0.53	1-3 SPP	Endométrites sub-cliniques	-	-	-	-	-	Yasui et al., [130]
0.72	3-14 JPP	Déplacement de la caillette	80.00	73.00	3.00	0.80	9.70	Ospina et al [25]
0.57	3-14 JPP	Cétose clinique	74.00	59.00	1.80	0.70	5.00	Ospina et al [25]
0.36	3-14 JPP	Métrites	97.00	30.00	1.40	0.60	17.00	Ospina et al [25]
0.57	3-14 JPP	Déplacement de la caillette, Cétose clinique ou Métrites	75.00	61.00	1.90	0.70	4.40	Ospina et al [25]
0.56	-	Stéatose hépatique	44.00	88.00	3.59	0.74	5.70	Mostafavi et al[131]
0.52	1-2 JPP	Rétention placentaire	100.00	85.71	-	0.93	Infer	Kumari et al [132]
0.76	14-21 JPP	Cétose sub-clinique	64.50	91.70	7.77	0.81	-	Sun et al [133]
1.28	1SPP	Déplacement de la caillette	75.00	62.50	2.00	0.75	1.05	Basiri et al [134]
0.20	4SPP	Taux de réussite IA1	78.60	63.80	-	0.62	0.17	Dehkordi et al [124]
0.20	6SPP	Taux de réussite IA1	85.7	63.8	-	0.65	0.11	Dehkordi et al [124]
0.31	4-21 JPP	Inactivité ovarienne	60.0	64.8	-	-	3.22	Lomander et al [126]
0.28	4-21 JPP	Retard de la 11A	54.1	54.1	-	-	0.92	Lomander et al [126]
0.26	4-21 JPP	Taux de conception à 145 JPP	51.0	48.8	-	-	-	Lomander et al [126]
1.0	+1SPP	Déplacement de la caillette	51.0	80.0	-	-	3.4	Chapinal et al [128]
0.8	+1SPP	Taux de réforme dans les 60 JPP	53.0	61.0	-	-	2.0	Roberts et al [129]
0.8	+2SPP	Taux de réforme dans les 60 JPP	49.0	61.0	-	-	0.6-2.1**	Roberts et al [129]
1.0	1-7 JPP	Taux de réforme dans les 60 JPP	71.8	65.1	-	-	4.65	Seifi et al [135]
1.0	8-14 JPP	Taux de réforme dans les 60 JPP	56.4	67.5	-	-	2.57	Seifi et al [135]
1.0	1-7 JPP	Cétose clinique	87.1	65.3	-	-	11.3	Seifi et al [135]
0.4	3 JPP	Métrites	51.7	63.4	1.41	0.54	-	Bicalho et al [26]

JPP: jours postpartum; SPP: semaines postpartum

+LR: *Positive likelihood ratio* ou Rapport de vraisemblance positifAUC : *Area under ROC* ou l'aire sous la courbe ROC

AUC&lt;0.5= non informatif ; 0.5 &lt; AUC ≤ 0.7= fiable ; 0.7 &lt; AUC ≤ 0.9= très fiable ; 0.9 &lt; AUC ≤ 1= très hautement fiable

**Tableau 3** : Recherches réalisées sur la détermination de valeurs seuils de BHB au post-partum par rapport aux performances de reproduction et à l'état de santé de la vache.

Seuils (mmol/l)	Temps	Paramètre prédit	Sensibilité	spécificité	LR+	AUC	Risque	Référence
0.7	1-3 SPP	Endométrites sub-cliniques	-	-	-	-	-	Yasui et al [130] Suthar et al [31]
1.4	2-15 JPP	Métrites	28.5	84.1	1.8	0.6	2.1	Suthar et al [31]
1.1	2-15 JPP	Cétose clinique	39.3	72.7	3.6	0.5	14.0	Suthar et al [31]
1.7	2-15 JPP	Déplacement de la caillette	60.4	87.4	4.8	0.76	10.7	Suthar et al [31]
1.1	2-15 JPP	Boiteries	39.1	75.4	1.6	0.6	2.1	Suthar et al [31]
0.97	3-14 JPP	Déplacement de la caillette	71	80	3.5	0.8	6.9	Ospina et al [25]
0.97	3-14 JPP	Cétose clinique	57	80	2.8	0.7	4.9	Ospina et al [25]
0.68	3-14 JPP	Métrites	63	59	1.5	0.6	2.3	Ospina et al [25]
0.97	3-14 JPP	Déplacement de la caillette, Cétose clinique ou Métrites	57	82	3.1	0.7	4.4	Ospina et al [25]
0.78	-	Stéatose hépatique	33	96	9.42	0.7	13.6	Mostafavi et al [131]
0.99	1-2 JPP	Rétention placentaire	100	100	-	1.0	Infer	Kumari et al [132]
0.82	1SPP	Déplacement de la caillette	81.3	75.0	3.25	0.85	2.68	Basiri et al [134]
1.1	4-21 JPP	Inactivité ovarienne	53.9	53.4	-	-	1.97	Lomander et al [126]
1.0	4-21 JPP	Retard de la 11A	49.4	43.6	-	-	0.72	Lomander et al [126]
1.0	4-21 JPP	Taux de conception à 145 JPP	54.3	44.5	-	-	-	Lomander et al [126]
0.9	+1SPP	Déplacement de la caillette	57.0	69.0	-	-	2.9	Chapinal et al [128]
1.2	+1SPP	Taux de réforme dans les 60 JPP	31.0	82.0	-	-	1.8	Roberts et al [129]
1.6	+2SPP	Taux de réforme dans les 60 JPP	21.0	89.0	-	-	0.7-2.3**	Roberts et al [129]

1.2	+1SPP	Déplacement de la caillette	43.7	76.6	1.87	-	2.5	Duffield et al [28]
1.8	+2SPP	Déplacement de la caillette	45.0	88.4	3.87	-	6.22	Duffield et al [28]
1.4	+1SPP	Cétose clinique	46.1	83.2	2.75	-	4.25	Duffield et al [28]
1.4	+2SPP	Cétose clinique	57.1	81.8	3.14	-	5.98	Duffield et al [28]
1.2	+1SPP	Endométrites	51.9	75.7	2.13	-	3.35	Duffield et al [28]
1.0	1-7 JPP	Déplacement de la caillette	91.0	71.0	-	-	24.6	Seifi et al [135]
1.2	1-7 JPP	Cétose clinique	67.7	82.2	-	-	8.5	Seifi et al [135]
1.0	1SPP	Taux de conception après la 1IA	-	-	-	-	0.73	Walsh et al [23]
1.4	2SPP	Taux de conception après la 1IA	-	-	-	-	0.48	Walsh et al [23]
1.0	1SPP	Taux de conception à 42 jours post-IA1	-	-	-	0.57	-	Compton et al [30]
1.8	1SPP	Faible production laitière	-	-	-	0.45	-	Compton et al [30]
1.2	1SPP	Décharge vaginal purulent à 35 JPP	-	-	-	0.60	-	Compton et al [30]
0.6	14 JPP	Métrites	64.5	54.0	1.4	0.58	-	Bicalho et al [26]
0.9	3 JPP	Endométrites cliniques	36.6	71.7	1.27	0.525	-	Bicalho et al [26]

JPP: jours postpartum; SPP: semaines postpartum

+LR: *Positive likelihood ratio* ou Rapport de vraisemblance positif

AUC : *Area under ROC* ou l'aire sous la courbe ROC

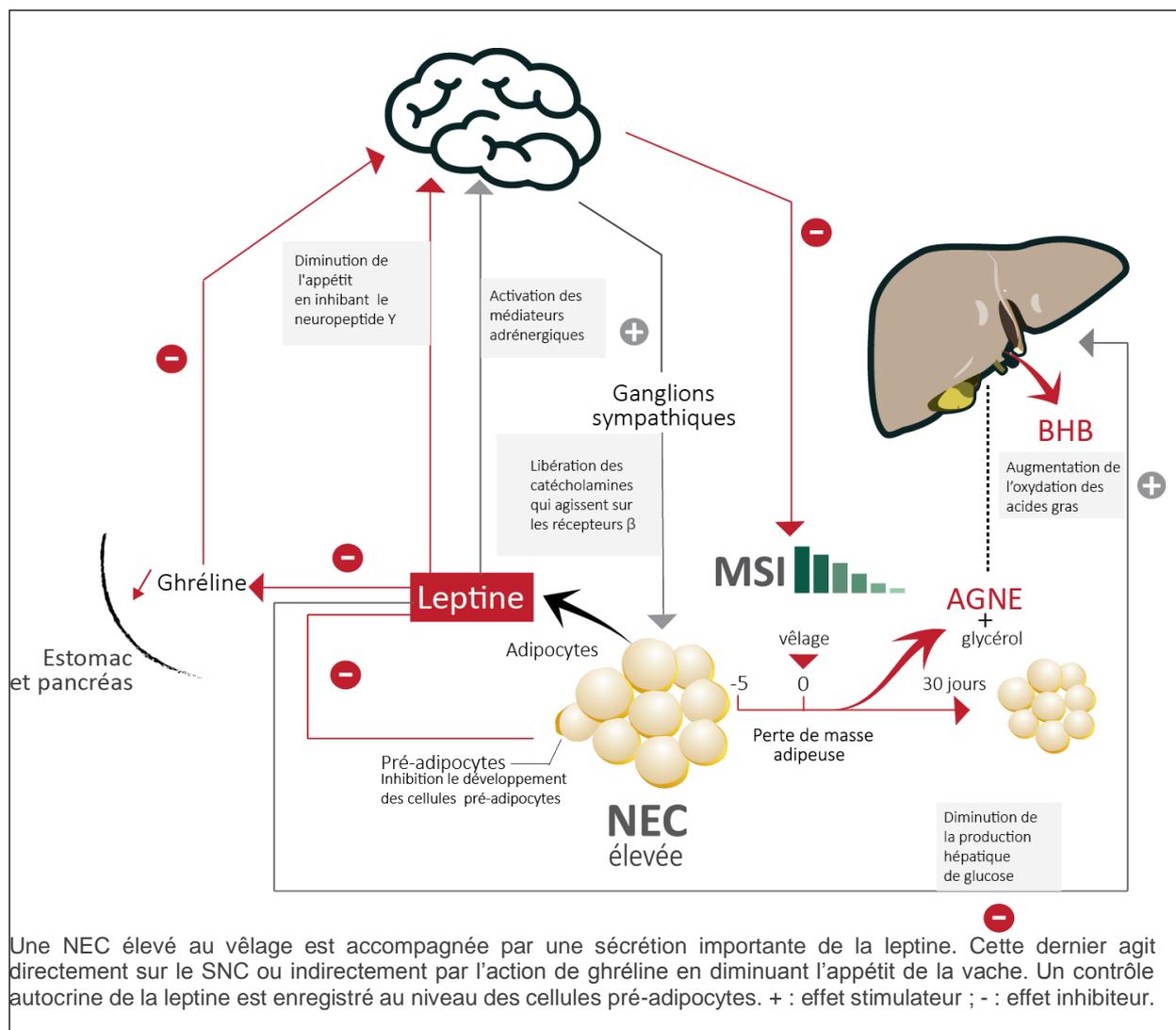
AUC<0.5= non informatif ; 0.5 < AUC ≤ 0.7= faible ; 0.7 < AUC ≤ 0.9= très faible ; 0.9 < AUC ≤ 1= très hautement fiable

\*\* par rapport au numéro de lactation

## 1.6. Taux élevés des AGNE, BHB et NEC

La capacité d'adaptation de la vache s'évalue par sa capacité à mobiliser puis à reconstituer ses réserves corporelles lors d'une restriction alimentaire et ceci sans pénaliser ses performances futures de production et de reproduction [136]. La note d'état corporelle (NEC) est toujours un objet de recherche pour la prévention des changements métaboliques négatifs excessifs des vaches laitières. Les études ont montré une corrélation négative entre le NEC et les concentrations en AGNE et en BHB [49, 137, 138]. Ainsi, plusieurs études ont rapporté une augmentation du risque de cétose sub-clinique (CSC) chez les vaches laitières avec une NEC élevée au vêlage par rapport à celles ayant une NEC faible [30, 139, 140]. De même, les vaches ayant perdu plus de 1 point de NEC (>1 point) au premier mois de lactation présentent une incidence plus élevée de CSC par rapport celles qui montrent un état corporel stable [30]. En outre, les vaches "grasses" (NEC > 4.0<sup>2</sup>) au vêlage montrent des concentrations plasmatiques plus élevées en AGNE au début de la lactation comparativement à celles ayant une NEC modérée ou faible [141]. Les AGNE paraissent ainsi comme le paramètre qui reflète le plus fidèlement les pertes de NEC [142], une augmentation des concentrations sériques en AGNE est ainsi indicatrice de la mobilisation des réserves lipidiques [49, 137]. Au moment du vêlage, une NEC élevée peut provoquer une diminution importante de matières sèches ingérées [43]; [143] directement par l'action centrale de la leptine [53] ou indirectement par l'action négative de la leptine sur la Ghréline [143] (figure 2). Cette dernière est une hormone digestive connue pour son action d'augmenter l'appétit chez le rat et la vache [144]. La vache fait recours à ses propres réserves lipidiques en mobilisant en quantité considérable des AGNE. La lipo-mobilisation intense pour les vaches grasses au vêlage [138, 145] peut s'expliquer par une augmentation de la NEC due à un accroissement de la surface [146] et du nombre [58] des adipocytes avec une sécrétion importante de la leptine [20, 143]. Zeng et al [147] ont rapporté que chez la souris, la leptine agit au niveau central en déclenchant des signaux qui activent les neurones ganglionnaires du système nerveux sympathique. Ces derniers libèrent les catécholamines qui agissent sur les récepteurs  $\beta$  [148] en augmentant en conséquence la lipolyse. De même, il a été clairement montré chez les rongeurs que la leptine, de façon directe et/ou via le système nerveux sympathique, active l'AMP

kinase (AMPK) dans le foie, entraînant une diminution de la production hépatique de glucose et une activation de la  $\beta$ -oxydation des acides gras [149]. En conséquence, cette hyperlipidémie peut provoquer une résistance à l'insuline chez les vaches laitières [141, 150], ce qui est en accord avec des études associant une NEC élevée à une sensibilité réduite à l'insuline périphérique en état de lipo-mobilisation [151].



**Figure 2** : Mécanismes de contrôle de la lipo-mobilisation chez une vache 'grasse' autour de vèlage (schéma personnel).

### 1.7. Taux élevés des AGNE/ BHB et la résistance à l'insuline

L'insuline joue un rôle fondamental dans l'adaptation physiologique des vaches laitières au péri-partum [82]. La résistance à l'insuline est définie comme un état avec une concentration normale d'insuline où l'hormone est incapable de produire une réponse biologique normale [55]. Plusieurs auteurs ont admis que la résistance à l'insuline chez la vache laitière autour du vêlage est un élément commun avec les diabètes humains types 1 et 2 [96, 152, 153, 154, 155]. En revanche, cette similarité varie dans le fait que les vaches ont un niveau inférieur de glucose dans le sang [156]. Selon De Koster et Opsomer [154], la résistance à l'insuline pourrait être subdivisée en deux aspects distincts : la sensibilité et la réceptivité à l'insuline. Ainsi, l'effet maximal de l'insuline détermine la réceptivité de l'insuline alors que la concentration d'insuline pour obtenir une réponse maximale détermine la sensibilité à l'insuline.

De nombreux problèmes potentiels métaboliques, immunologiques et de la reproduction qui accompagnent le développement de la résistance à l'insuline ont été discutés pour de nombreuses espèces de mammifères y compris la vache [82, 157, 158]. Des études récentes ont rapporté une résistance à l'insuline chez les vaches dans diverses conditions physiologiques notamment en début de la lactation où les vaches enregistrent des taux élevés en AGNE et BHB [159, 160, 161]. Kerestes et al. [159] ont constaté que des taux élevés en BHB provoquent une grande résistance à l'insuline. Les mêmes auteurs ont rapporté que des taux élevés en AGNE sont négativement corrélés avec l'insulinémie. Pires et al [162] ont montré une relation positive et directe entre l'AGNE et la résistance à l'insuline chez les vaches Holstein. En tenant compte des valeurs sériques du glucose, des AGNE et de l'insuline, de la période pré-partum à la période post-partum, un nouvel indice a été récemment décrit chez la vache, le RQUICKI (quantitative insulin sensitivity check index) [151, 164]. De même, Balogh et al [165]; Youssef et al [166] ont établi un autre indice en se basant sur la concentration de BHB (RQUICKIBHB).

### 1.8. Taux élevés des AGNE et BHB et le stress oxydatif

Une mobilisation significative des AGNE chez les vaches laitières cétosiques a été également associée à la production des radicaux libres de l'oxygène, tels que les espèces oxygénées activées [EOA, en anglais *reactive oxygen species (ROS)*]. Ces espèces pourraient à leur tour lancer un état de stress oxydatif et mener à une inhibition de la prise de glucose par interférence directe sur la fonction du transporteur de glucose [167]. Dans ce contexte, Pedernera et al [168] ont constaté que l'état du stress oxydatif chez les vaches au péri-partum est lié aux taux élevés en AGNE et BHB. Des taux élevés de BHB [169, 170], d'acetoacetate [171] et des AGNE [172] ont été également reliés à un taux élevé en EOA avec induction d'une apoptose adipocytaire chez la vache et le veau. La mobilisation intense des réserves graisseuses suggère que le corps présente des niveaux élevés de radicaux libres due aux oxydations et ré-oxydations des AGNE. Des constatations similaires ont été rapportées [98, 173, 174, 175]. Cependant, plusieurs études *in vitro* et *in vivo* chez l'homme et la souris ont montré un effet des BHB et de l'aceto-acetate sur les EOA dans les cellules nerveuses [176, 177], adipocytaires et immunitaires. Song et al [170] ont constaté, en effet, que les cellules hépatocytaires cultivées dans un milieu contenant une faible concentration de BHB produisent moins de EOA par rapport à celles cultivées dans des concentrations élevées de BHB (>1.2 mmol/l).

### 1.9. Effets des AGNE et BHB sur la production laitière

L'association entre la production laitière et des taux élevés en AGNE et BHB reste contradictoire (tableau 4) avec des associations positives [24, 28, 139] et négatives [10, 178, 179]. Raboisson et al [32] ont rapporté que des taux élevés en AGNE et BHB affectent négativement la production laitière au pré-partum ; alors que cette association peut être positive ou négative au postpartum. La mobilisation des AGNE et la production de corps cétoniques fait partie des changements homéostatiques qui permettent à la lactation de progresser et de se maintenir à des niveaux de production élevés [27]. Les AGNE, le BHB et l'acétate sont captés par la glande mammaire et

utilisés comme précurseurs pour la synthèse des acides gras à chaîne courte ou longue [180].

**Tableau 4** : Différences de production laitière par rapport aux taux des AGNE et BHB.

Temps relatif au vêlage pour l'échantillonnage	Bio-marqueurs	Taux seuil	Définition	Différence (kg du lait)	SE	Références
+1	BHB	1,6	PS3	-333.7	ns	Duffield et al [28]
+2	BHB	0.6	PS3	+224.6	ns	Duffield et al [28]
+2	BHB	1.0	PS3	+272.3	ns	Duffield et al [28]
+2	BHB	1.2	PS3	+242.4	ns	Duffield et al [28]
+1	BHB	0.6	MJ1	+1.61	ns	Duffield et al [28]
+1	BHB	1.2	MJ1	-1.22	ns	Duffield et al [28]
+1	BHB	1.4	MJ1	-1.88	ns	Duffield et al [28]
+1	BHB	1.6	MJ1	-1.76	ns	Duffield et al [28]
+1	BHB	1.8	MJ1	-1.71	ns	Duffield et al [28]
+2	BHB	1.4	MJ1	-1.39	ns	Duffield et al [28]
+2	BHB	1.6	MJ1	-1.81	ns	Duffield et al [28]
+2	BHB	1.8	MJ1	-2.29	ns	Duffield et al [28]
+2	BHB	2.0	MJ1	-3.30	ns	Duffield et al [28]
-1 et -2	AGNE	0.33	PS120	-683	180	Ospina et al [24]
+1 et +2	BHB	0.87	PS120	+403	195	Ospina et al [24]
+1 et +2	AGNE	0.57	PS120	+488	203	Ospina et al [24]
+1 et +2	AGNE	0.72	PS120	-647	195	Ospina et al [24]
+1 et +2	BHB	0.97	PS120	-393	195	Ospina et al [24]
-1	AGNE	0.5	MJ4	-1.6	0.5	Chapinal et al [9]
-1	BHB	0.6	MJ4	-1.7	0.4	Chapinal et al [9]
+1	AGNE	0.7	MJ1	-1.8	0.6	Chapinal et al [9]
+1	BHB	1.4	MJ1	-2.4	0.5	Chapinal et al [9]
+2	AGNE	1.0	MJ1	-1.7	0.8	Chapinal et al [9]
+2	BHB	1.2	MJ1	-1.5	0.6	Chapinal et al [9]
+1 ou +2	BHB	1.4	MJ3	-0.85	ns	Seifi et al [181]
+1 ou +2	BHB	1.4	PS2	-121	ns	Seifi et al [181]
+2	BHB	1.2	MJ1	+0.03 <sup>1</sup>	ns	Vanholder et al [139]
+1 à +4	BHB	0.2 <sup>2</sup>	MJ1	-2.33	0.04	Santschi et al [178]
+1 ou +2	BHB	1.2	MJ1	-2.20	ns	McArt et al [10]

<sup>1</sup>Déférence entres les moyennes des moindres carrés ;

<sup>2</sup>BHB du lait ;

PS3 : Production laitière standard projetée à partir du 3<sup>ème</sup> test ;

MJ1 : Moyenne journalière de la production laitière calculée à partir du premier test ;

PS120 : Production laitière standard projetée au 120 JPP ;

MJ4 : Moyenne journalière de la production laitière projetée à partir des 4 premiers tests ;

MJ3 : Moyenne journalière de la production laitière calculée à partir des 3 premiers tests ;

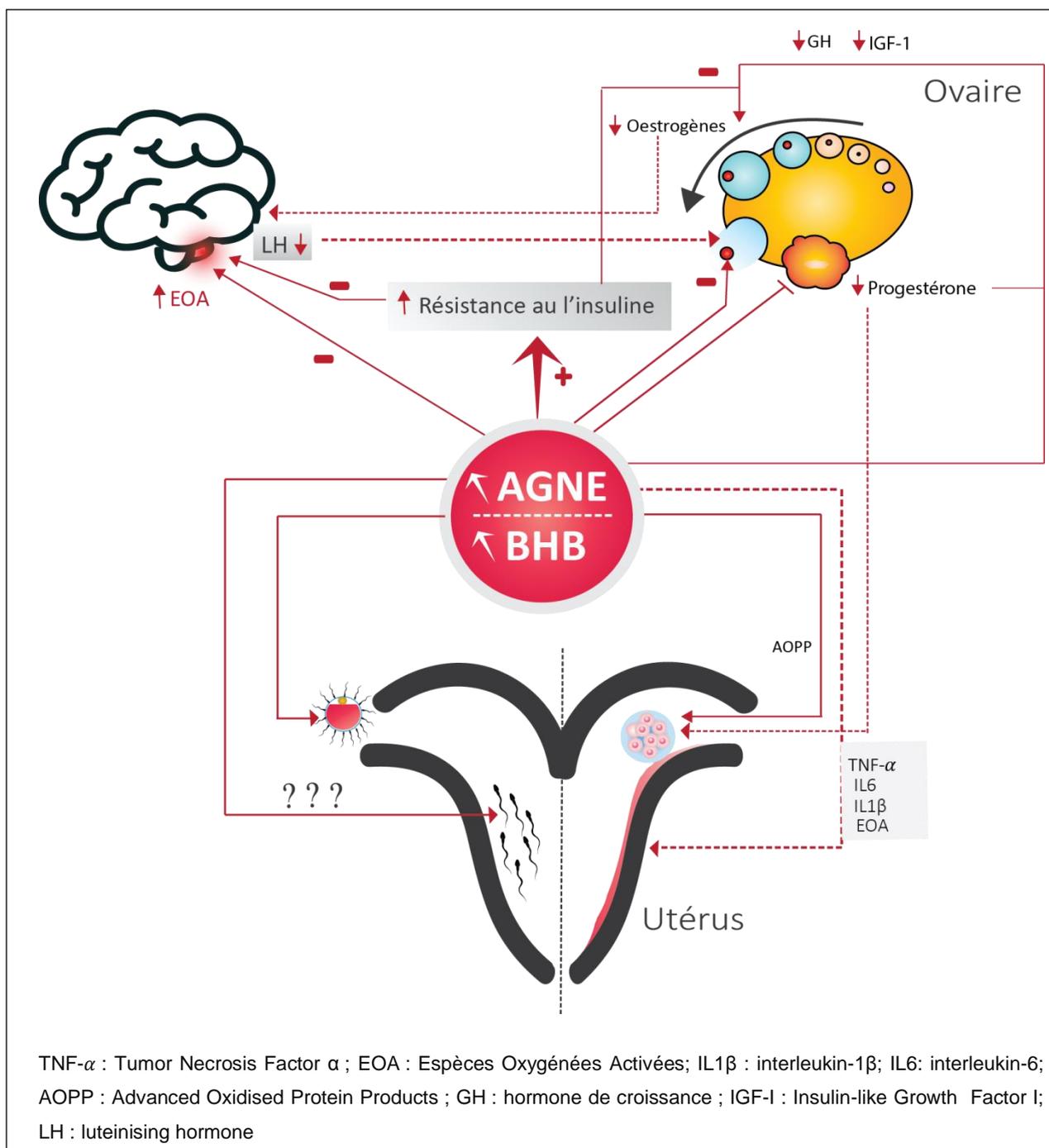
PS2 : Production laitière standard projetée au 2<sup>ème</sup> test.

### 1.10. Effets sur l'immunité

Il est connu que les métabolites peuvent influencer sur le système immunitaire par plusieurs mécanismes [182]. Des taux élevés en AGNE et BHB sont observés en concomitance avec d'autres changements métaboliques et endocriniens [183] cependant l'effet immunosuppresseur ne peut être attribué exclusivement aux corps cétoniques ou aux AGNE [184, 185]. Les résultats des effets exclusifs des concentrations élevées de ces deux bio-marqueurs sur le système immunitaire sont disponibles à partir d'études *in vitro* où il est montré que des concentrations élevées en AGNE inhibent la synthèse d'ADN, la sécrétion d'IgM [186] et la production d'interféron- $\gamma$  dans des monocytes [186, 187] et les adipocytes [188] avec diminution de la combustion respiratoire des polynucléaires sanguins [189, 190]. Plusieurs études *in vitro* ont montré que des concentrations élevées de corps cétoniques diminuent le recrutement des neutrophiles [191], la capacité chimiotactique [192], la combustion respiratoire [184] et augmentent la production de IL1 [193] et de l'interféron- $\gamma$  [184]; [193]. A l'opposé, d'autres études ont rapporté un effet bénéfique des 'diètes cétogènes' sur l'immunité chez l'homme et chez des modèles animaux [194, 195, 196, 197].

### 1.11. Effets sur la reproduction

De nombreuses études ont montré que des taux élevés en AGNE et BHB au postpartum peuvent affecter négativement le taux de conception à la première insémination [22, 23, 8, 9, 10, 139] et le taux de la reprise de l'activité ovarienne [4, 20, 125, 140, 198]. Des taux élevés en BHB et en AGNE peuvent allonger l'intervalle vélage-conception [10, 23] et augmenter le risque de kystes ovariens [140]. Ces effets négatifs peuvent être indirects en agissant sur l'axe hypothalamo-hypophysaire, la stéroïdogénèse et sur l'utérus ou direct en agissant sur les ovocytes, l'embryon et les spermatozoïdes (figure 3).



**Figure 3** : Effet des taux élevés en AGNE et BHB sur l'axe hypothalamo-hypophysaire, l'ovaire, utérus et l'embryon (schéma personnel).

#### 1.11.1. Effet sur l'axe hypothalamo-hypophysaire

Des concentrations élevées en AGNE pourraient antagoniser l'action de l'insuline et créer un état de résistance à l'insuline diminuant la sensibilité de l'ovaire à la LH et à la FSH [199]. Les AGNE rentrent dans les neurones hypothalamiques par simple diffusion et sont estérifiés en Acyl-CoA de telle sorte que la concentration d'acyl-CoA est proportionnelle à la concentration plasmatique des AGNE [125]. Ainsi, des taux élevés en AGNE sont associés à l'inflammation de l'hypothalamus et à une résistance accrue à l'insuline et à la leptine [200, 34]. En effet, des études *in vitro* montrent un effet négatif sur la signalisation de l'insuline au niveau hypothalamique avec augmentation du stress oxydatif au niveau du réticulum endoplasmique [201, 202]. Nanda et al [203], ont enregistré une faible réponse de libération de LH par un analogue de la GnRH chez les vaches qui présentent un taux élevé de BHB. Egalement l'injection de concentrations élevées de BHB dans le ventricule latéral du cerveau des animaux castrés diminue le relargage de la LH [346, 348]. En utilisant la même approche, il est montré que des concentrations élevées de BHB peuvent altérer l'expression des gènes impliqués dans la régulation de la production de cytokines, des récepteurs de l'insuline et de la pyruvate déshydrogénase kinase 4 au niveau de l'hypothalamus [347].

#### 1.11.2. Effet sur la stéroïdogénèse

Au cours de la dernière décennie, de nombreuses études ont rapporté un effet directs des AGNE et BHB sur les cellules sécrétrices au niveau de l'ovaire. Il est ainsi montré que la stéroïdogénèse des cellules de la granulosa peut être réduite par des traitements BHB [36, 205] et les vaches ayant une cétose au post-partum présentent un faible taux de progestéronémie et d'oestradiol [23]. Chez la souris, une 'diète cétogène' induit une diminution du taux de 3  $\beta$ -androstane-diol et de progestérone [206]. Des concentrations élevées en AGNE ont également *in vitro* un effet toxique sur les cellules de la granulosa en diminuant la prolifération et la stéroïdogénèse chez les bovins [207] et l'homme [208]. Cependant, il est signalé un effet positif sur la production de l'oestradiol [207] et de la progestérone [205] en dépit de l'effet apoptotique sur les cellules de granulosa.

L'induction de cette apoptose et/ou de la nécrose par les AGNE, à différentes concentrations, est décrite aussi pour d'autres types cellulaires comme les cellules de

Leydig [209]. Ceci est expliqué par une augmentation de l'activité sécrétrice des cellules au cours des premiers stades de l'apoptose [210]. Cette augmentation initiale de la stéroïdogénèse dans les cellules apoptotiques peut masquer une réduction de la stéroïdogénèse dans les autres cellules vivantes [205]. Ceci est rencontré chez les vaches hautes productrices avec des concentrations élevées d'œstradiol dans des follicules dominants [38, 211]. Dans ce sens, Jorritsma et al [212] ont rapporté une forte corrélation entre les AGNE dans les liquides folliculaires et le plasma.

Plusieurs études *in vitro* suggèrent que la GH module significativement la libération de la progestérone et de l'œstradiol [214, 215]. Il est ainsi rapporté que la GH stimule la production de la progestérone et de l'œstradiol par les cellules de la granulosa bovines [349, 350] et les cellules de granulosa lutéinisées humaines [216]. Il est montré que des taux élevés en AGNE [34] et en BHB [213] sont à l'origine de mutations de gènes codant pour les récepteurs de la GH. De même, il est rapporté une corrélation négative entre le taux de progestérone, l'IGF1 et les AGNE [217]. L'insuline a également un effet stimulateur direct sur la production globale des stéroïdes ovariens [219, 220], sur l'aromatisation des androgènes en œstrogènes [219] et sur la réponse ovarienne à des facteurs circulants tel que la LH ou l'IGF-I [221] (figure 3).

### 1.11.3. Effet sur l'utérus

Tel que susmentionné, des effets négatifs des AGNE et du BHB sur l'immunité en général [184, 186, 191] et l'immunité utérine en particulier sont signalés [222, 223, 224]. De plus, des études ont fourni des preuves directes que les changements dans les concentrations en AGNE pourraient altérer les réponses des cellules impliquées dans l'inflammation. Ainsi, l'exposition à des mélanges en AGNE, qui imitent la composition et les concentrations dans le plasma des vaches pendant la période de transition, augmente l'expression des cytokines pro-inflammatoires par les cellules endothéliales bovines [225]. Plusieurs gènes de cytokines inflammatoires comme le facteur TNF- $\alpha$ , l'interleukine 6 (IL-6) et l'interleukine 1 bêta (IL-1 $\beta$ ) sont liées aux concentrations élevées en AGNE [169] et en BHB [96] chez les vaches laitières (figure 3). Ces cytokines sont également associées à l'infection de l'utérus chez les vaches laitières en post-partum [226, 227, 228]. Huszenicza et al. [229] ont rapporté que des taux élevés en AGNE et BHB nuisent à la capacité phagocytaire, de migration et de combustion respiratoire des polymorphonucléaires (PMN) et autres leucocytes,

augmentant par conséquence la susceptibilité de l'endomètre à divers pathogènes. Ainsi, une qualité endométriale compromise peut affecter, subtilement ou profondément, la qualité des spermatozoïdes, l'implantation et le développement embryonnaire [230, 231], avec des conséquences visibles et parfois graves pour la placentation, le développement fœtal, les résultats de gestation et à long terme la santé de la progéniture [231].

#### 1.11.4. Effet sur les ovocytes et le développement embryonnaire

Plusieurs études ont été consacrées pour l'étude de la relation entre le BEN et la qualité ovocytaire et embryonnaire à travers des cultures *in vitro* dans des milieux contenant des taux élevés en AGNE et en BHB. Les résultats montrent dans leur globalité que les environnements à haute teneur en AGNE et à faible teneur en glucose nuisent à la capacité de développement ovocytaire et compromettent le développement embryonnaire précoce [37, 41, 232]. Egalement, Leroy et al [233] ont constaté que des milieux contenant des taux élevés en BHB et faible en glucose sont à l'origine de diminution de la compétence de développement et de maturation ovocytaire. Les mêmes résultats sont rapportés par Endo et al [234] pour le développement embryonnaire. A l'opposé, Tsuzuki et al [235] ont rapporté qu'un taux élevé de BHB (3.1 mmol/l) est à l'origine d'une amélioration de la maturation nucléaire des ovocytes de la truie.

Egalement, des études ont montré que l'exposition à des concentrations élevées en AGNE, en particulier, l'acide palmitique, l'acide stéarique [240] et l'acide oléique [13], pendant la maturation des ovocytes réduit la qualité de l'embryon.

La maturation des ovocytes sous des concentrations élevées en AGNE altère significativement l'expression des gènes et la méthylation de l'ADN dans le complexe ovocyte-cumulus et dans les blastocystes [241]. De même, Van Hoeck et al [13] ont rapporté *in vitro* que des taux élevés en AGNE peuvent provoquer l'apoptose ovocytaire, diminuer la consommation du pyruvate, du glucose et de l'oxygène, tout en augmentant la consommation de lactate et en altérant le métabolisme des acides aminés des blastocystes. Des effets indésirables similaires sont observés après culture de zygotes bovins avec du sérum de génisses nourries avec un régime riche en l'huile de palme [232, 242, 243].

Les EOA et le stress oxydatif (OS) sont connus pour avoir un rôle dans la progression de plusieurs événements clés liés à la reproduction chez l'homme et l'animal, comme

la fécondation et le développement embryonnaire précoce (figure 3). Cependant, il semble que l'excès du stress oxydatif soit responsable de lésions embryonnaires qui peuvent alors conduire à la mort embryonnaire [244, 245]. Celi et al [246] ont rapporté une association entre les produits de l'oxydation avancée des protéines (A.O.P.P. ou 'Advanced Oxidised Protein Products') et la mortalité embryonnaire [246]. Les AOPP sont proposés comme marqueurs de l'inflammation aiguë [249], chez l'homme, leur augmentation est associée à plusieurs marqueurs immuno-inflammatoires et aux inflammations utérines responsables de l'infertilité chez la femme [250].

Une étude menée par Ribeiro et al [5] a montré que des taux élevés en AGNE et en BHB sont associés à une mortalité embryonnaire allant de 6.6 à 8.3 %. De même, Senosy et al [251] ont constaté une association entre des taux élevés en AGNE et la mortalité embryonnaire, probablement liée à l'accumulation d'acides gras dans les embryons et l'environnement utérin [252]. En effet, il est connu qu'une accumulation excessive de lipides nuit à la qualité des embryons en augmentant leur sensibilité au stress oxydatif [253] et en altérant la fonction des mitochondries [238]. Chez la femme, Montoro et al [255] ont rapporté une incidence de 35% de mortalité fœtale en situation de diabète de type 1 et d'acidocétose diabétique. Ce taux de mortalité devient encore plus élevé (57%) chez les patients avec des acidocétoses diabétiques.

#### 1.11.5. Effet sur les spermatozoïdes dans l'environnement femelle

La contribution paternelle dans la procréation est représentée par la production du sperme et son dépôt dans les voies génitales femelles, la mère elle, produit non seulement les gamètes (ovocytes), mais contribue aussi au transport et à la capacitation des spermatozoïdes, héberge la fertilisation, l'embryon et le fœtus. L'effet des taux élevés en AGNE et en BHB sur la fertilité a été largement investigué en considérant l'ovocyte et l'embryon [13, 37, 35, 40, 42, 233, 232, 235, 243, 258].

Néanmoins, un éventuel effet des faibles notes d'état corporel (NEC) et des taux élevés en AGNE et en BHB sur le spermatozoïde reste largement méconnu. Le micro environnement utérin est composé d'une combinaison de constituants dérivés du plasma et de molécules sécrétées par l'oviducte et l'épithélium utérin [259]. Toute altération de la NEC et élévation plasmatique des AGNE et de BHB peut ainsi se répercuter sur le milieu utérin et donc impacter la fonctionnalité spermatique.

#### 1.12. Conclusion

Le bilan énergétique négatif est un événement communément observé chez toutes les vaches laitières au péri-partum. Ce BEN se traduit par une mobilisation plus ou moins importante des réserves corporelles sous un contrôle endocrinien avec une chute de la NEC et libération des AGNE. Ces AGNE représentent une source d'énergie si l'oxydation complète de ces derniers a lieu au niveau hépatique. Cependant, une oxydation incomplète conduira à la voie cétogénique avec une libération importante de corps cétoniques notamment le BHB. Chaque élévation en AGNE et en BHB affecte significativement les performances de la vache laitière via des effets négatifs sur l'immunité, les sécrétions hormonales et la qualité ovocytaire et embryonnaire. Cependant, à notre connaissance, aucune étude concernant les effets des AGNE et du BHB sur les spermatozoïdes n'est encore disponible.

## CHAPITRE 2

### TAUX ELEVES EN B-HYDROXYBUTYRATE ET EN ACIDES GRAS NON ESTERIFIES AU PERI-PARTUM ET LEUR ASSOCIATION AVEC LES PERFORMANCES ET LES TROUBLES LIES A LA REPRODUCTION CHEZ LA VACHE LAITIERE : META-ANALYSE

Au début de la lactation, les vaches laitières dites “hautes productrices” sont incapables de répondre à leurs considérables demandes d'énergie par la glande mammaire à partir, seulement, de l'apport alimentaire [127]. En effet, les vaches, doivent s'adapter de cette accroissement de production par une mobilisation de leur réserve grasseuse afin de fournir les acides gras non estérifiés (AGNE) comme source d'énergie [81]. Une mobilisation excessive a cependant comme conséquence une concentration élevée des AGNE dans le sang. Ces AGNE sont métabolisés par les hépatocytes via une  $\beta$ -oxydation pour produire l'acétyl-coenzyme A (Acétyl-CoA) [266]. Ainsi, une quantité excessive de l'acétyl-CoA est dérivée pour la synthèse de cholestérol, triglycérides [77] ou bien des corps cétoniques par la cétogenèse ce qui, occasionnellement, provoque une acétonémie [61]. Trois molécules de corps cétoniques sont ainsi identifiées chez les ruminants, acéto-acétate (AcAc), 3- $\beta$ -hydroxybutyrate (BHB) et acétone (AC) avec des taux de 70, 28 et 2%, respectivement [267]. Le BHB est le corps cétonique prédominant chez les ruminants [28], à cause de sa stabilité dans le sang on le considère comme indicateur pour un éventuel diagnostic de la cétose sub-clinique (CSC) [114]. Les concentrations en AGNE peuvent quant à eux être employés comme marqueurs du bilan énergétique négatif et/ou du CSC [45]. Ces dernières années, plusieurs d'études ont démontré que des concentrations élevées en BHB et en AGNE sont associées à de faibles performances de reproduction [7, 8, 10, 31, 139] et à un taux élevé des troubles liés à la reproduction [140, 222, 268]. Les résultats de ces études demeurent cependant contradictoires et l'évaluation globale de leur effet, positif ou négatif, reste difficile à affirmer [48]. Les causes possibles de cette ambiguïté sont l'hétérogénéité de la conception méthodologique de l'expérimentation, la conduite des élevages et les populations

étudiées. Dans une étude récente [32], des chercheurs ont essayé de surmonter certaines de ces contraintes par une méta-analyse. Ces méta-analyses sont menées pour l'évaluation des effets de concentrations élevées en AGNE et BHB sur diverses maladies postpartum et les performances de la reproduction et de production. Dans le cadre de la présente étude, une méta-analyse est menée et dans laquelle les performances et les troubles de reproduction sont analysés en considérant de nouveaux paramètres de reproduction.

### 2.1. Méta-analyse : définition, principe de base et interprétation des résultats

Les médecins et notamment les médecins vétérinaires, sont constamment confrontés à une quantité grandissante d'informations médicales. Une interrogation d'une base de données telle que MEDLINE avec les mots-clefs «ketosis in dairy cows » indique que plus de 500 articles sont disponibles sur ce sujet. Une lecture critique sous forme d'une méta-analyse reste cependant indispensable pour une évaluation intégrée des résultats de ces articles. La méta-analyse a comme objectif de réaliser une synthèse des informations disponibles à un moment donné, sur un problème particulier. Cette synthèse doit être la plus objective possible, ne reflétant que les faits, et doit être obtenue de manière reproductible, à travers une démarche scientifique.

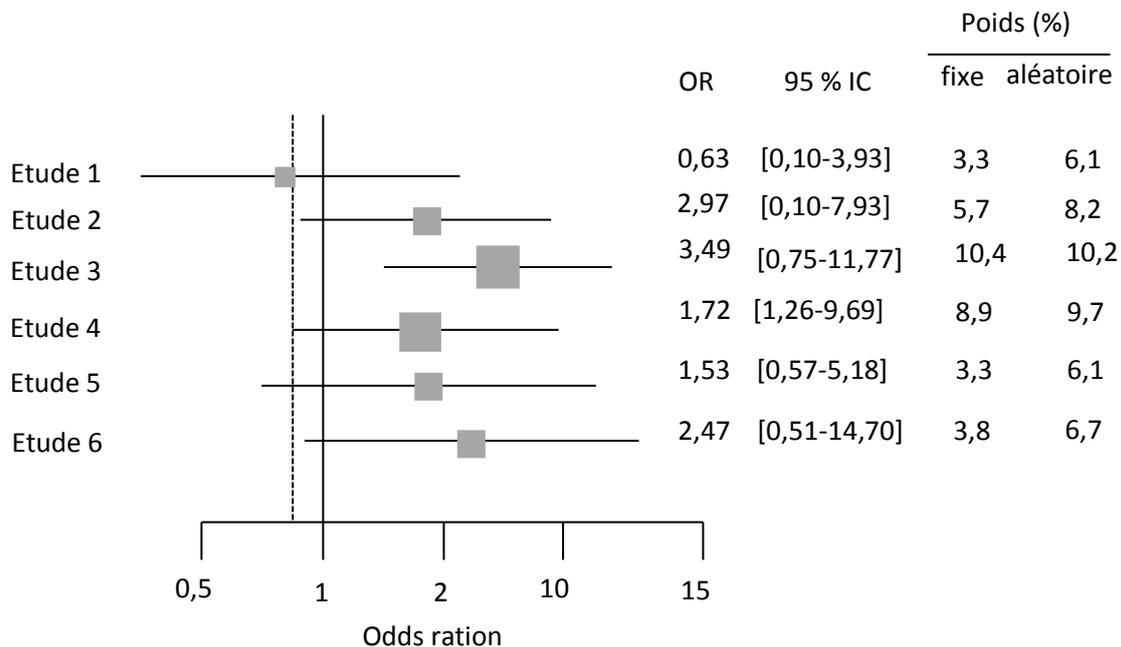
Le principe des méta-analyses est d'évaluer l'effet d'un traitement utilisé sur des populations comparables, en combinant les résultats de multiples études. Cette technique permet d'augmenter la puissance statistique pour tester certaines hypothèses. En outre, les méta-analyses renseignent sur la généralisation des résultats dans différentes populations. Celle-ci est établie si les résultats de différentes études sur des groupes variés (mâle et femelle ; groupes d'âge (parité) ; niveau de sévérité) sont comparables.

Pour répondre à ces objectifs, une méta-analyse doit :

- porter sur l'exhaustivité des essais réalisés ;
- expliquer clairement sur quels critères les essais ont été ou non retenus pour l'analyse ;- enfin quantifier l'effet du traitement ou d'une maladie.

Ainsi, une méta-analyse permet d'appréhender les résultats sous leurs diverses composantes :

- Les résultats des essais élémentaires avec les effectifs inclus les cas correspondant aux critères de jugement et les intervalles de confiance de ces résultats ;
- Calcul d'un estimateur unique pour l'ensemble des études, avec son intervalle de confiance ;
- Une présentation graphique (Figure 4) permet de synthétiser l'ensemble de ces informations. La présentation graphique permet également d'apprécier l'homogénéité des résultats ;



**Figure 4** : Graphe forestier illustratif d'un exemple de méta-analyse.

OR : odds ratio, 95% IC : intervalle de confiance à 95% ; P : poids de l'étude dans la méta-analyse

- En abscisse, les odds ratio et en ordonnées, les différentes études ;
- Les segments horizontaux sont des intervalles de confiance avec au centre un carré représentant l'effet de chaque étude ;
- La ligne verticale en trait plein permet de conclure en l'absence/présence d'effet. Si la ligne coupe l'intervalle de confiance, on rejette l'existence d'un effet significatif ;
- Le carré noir représente le poids de l'étude dans la méta-analyse. Sa taille est inversement proportionnelle à la variance de l'étude. Si la variance est très grande, l'étude aura une faible précision et donc un faible poids, conséquence d'un intervalle de confiance large. C'est le cas des études 1, 2, 5 et 6 dont la contribution à la méta-analyse est très faible, alors que les études 3 et 4 y contribuent fortement.

## 2.2. Matériels et méthodes

### 2.2.1. Position du problème et contexte de l'étude

L'élévation du taux sérique des corps cétoniques et des AGNE a été identifiée depuis longtemps comme étant un facteur de risque des maladies métaboliques chez la vache laitière. Ces maladies sont responsables d'une perte économique importante dans les pays développés, en particulier par une réduction des performances de production. À côté des arguments économiques, d'autres aspects peuvent faire considérer la cétose comme étant un facteur causal de réduction des performances de reproduction : réduction de la qualité des ovocytes, risque de mortalité embryonnaire, risque des maladies liées à l'utérus, etc. Conséquemment, plusieurs études récentes ont été réalisées dans ce contexte. Ces études signalent un impact positif, négatif ou le neutre en ce qui concerne l'effet des taux sériques élevés en AGNE et BHB sur les performances de reproduction et les troubles liés à la reproduction. C'est dans ce contexte que la présente étude est réalisée et dont l'objectif est d'étudier l'effet global des taux sériques élevés des AGNE et BHB sur les performances de reproduction et les troubles liés à la reproduction via une méta-analyse.

### 2.2.3. Recherche bibliographique et sélection des documents

Les publications sur l'effet des taux élevés des AGNE et BHB sur les performances de reproduction et les troubles de la reproduction ont été systématiquement recherchées dans les bases de données bibliographiques : PubMed (la librairie Nationale de Médecine, Bethesda, MD, Etats-Unis ; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/> ), CAB (CAB Abstracts, Cab Internationale, Oxon, Grande-Bretagne ; <http://cabi.org/> ), et Google Scholar (Compagnie–Google, Californie, Etats-Unis; <http://scholar.google.com/>). Les termes de recherche consistaient à utiliser les mots clés suivants avec différentes combinaisons : BHB, AGNE, cétose sub-clinique, performances de reproduction, fertilité, taux de conception, péri-partum, vache, le début de la lactation et troubles de la reproduction. Pour être inclus dans l'ensemble des données, les documents doivent avoir exploré l'effet de concentrations élevées de

BHB et/ou AGNE sur les performances de reproduction et les troubles de reproduction (nommé résultats primaires) chez les vaches laitières en péri-partum. Les documents sont exclus si : 1) ils ne sont pas des documents originaux de recherche, 2) ne sont pas publiés dans des revues scientifiques reconnues; 3) le plan d'étude n'est pas décrit ; 4) les résultats n'ont pas pu être utilisés pour calculer l'estimation de l'effet (par exemple, la relation était seulement mesurée par le coefficient de corrélation) ; 5) les effets ont été estimés en comparant les cas selon la gravité de la maladie mais sans témoins "non malades" ; 5) les données ont été recueillies avant 1980, 6) elles sont issues des pays où l'industrie laitière n'est pas intensive.

#### 2.2.4. Organisation et résumé des données

Le processus de recensement bibliographique a identifié 48 études, dont 34 ont été considérées comme inconvenable pour être incluses dans la méta-analyse. A partir des études incluses, 37 différents modèles ont été extraits et introduits dans une base de données qui contenait le type d'étude (essai d'observation clinique, étude de cohorte), origine (pays), le nombre de vaches et de troupeaux étudiés, la production laitière moyenne , la méthode statistique utilisée (régression logistique, régression de Poisson ou régression mixte), l'expression du risque (OR ,RR et HR), le métabolite utilisé (BHB et AGNE), le seuil utilisé, la semaine du péri-partum, le nombre de prélèvements d'échantillons par vache, la nature du modèle signalé (uni ou multi-variable), la prévalence, la valeur du risque, son intervalle de confiance à 95 %, la moyenne , erreur standard et l' écart-type. Puisque HR, OR ou RR étaient utilisées dans diverse analyses, le terme « risque » désigne les présentes conditions quand au moins deux d'entre elles ont été utilisés dans la méta-analyse.

De nombreux modèles ont été retenus dans chaque publication, et les choix de ces modèles sont fondés sur des données brutes au niveau de la même vache et les modérateurs inclus (tableau 5) : métabolite utilisé dans le test et le temps (AGNE, BHB, post-partum ou pré-partum) et la fréquence de test.

#### 2.2.4. Procédure de la Meta-analyse

Toutes les analyses ont été effectuées dans le logiciel R (version 3.2.3 ; Base de R pour les calculs statistiques, Vienne, Autriche) en employant les paquets statistiques de Meta (version 4.3-2 ; [353]) et Metafor (version 1.9-5 ; [354]). Un modèle à un effet aléatoire a été conduit au premier temps afin d'estimer l'effet logarithmique, son intervalle de confiance de 95%, et sa signification statistique. L'hétérogénéité des résultats a été estimée en utilisant  $\chi^2$  de l'hétérogénéité (Q-test de Cochran) et  $I^2$  pour évaluer la préention de l'effet fixe. L'index  $I^2$  décrit le pourcentage de la variabilité totale à travers des études due à l'hétérogénéité. Une valeur de  $I^2$  supérieure à 75% signifie une hétérogénéité moyenne ou haute [269].

Si une hétérogénéité est constatée ( $I^2 > 75\%$ ), une analyse de méta-régression (modèle à effet mixte) est exécutée pour explorer les sources d'hétérogénéité en utilisant la taille individuelle d'effet logarithmique pour chaque épreuve comme résultats. Des variables de modérateur incluses dans la méta-régression et leurs niveaux ont été choisies a priori en se basant sur la relation logique, théorique, et relation empirique précédente entre les métabolites et les performances de reproduction et les troubles de la reproduction. Le modèle mixte suivant a été employé:

$$\theta_j = \gamma_0 + \gamma_1 \times \text{mod} + \varepsilon_j$$

$\gamma_0$  est l'effet attendu pour une étude quand le modérateur est nul,  $\gamma_1$  l'effet fixe, mod est le modérateur introduit et  $\varepsilon_j$  la variance.

Plusieurs modèles sont rapportés à partir de leur hétérogénéité. Le modèle fixe est appliqué pour des études homogènes. Ainsi, pour tous les effets fixes de méta-analyse, nous avons supposé que les valeurs de l'effet étaient les mêmes pour toutes les études et toute différence observée est liée à la variation de l'échantillonnage. Pour une interprétation plus facile, il peut être utile de transformer l'effet logarithmique des résultats observés dans la méta-régression à l'échelle de risque relatif par exponentiation [270]. Pour chaque paramètre étudié, des graphes forestiers '*forest plots*' ont été produits pour afficher les effets estimés (logarithme de risque) pour chacune des études pertinentes avec une estimation sommaire globale (OR) générée à partir de la méta-analyse. Les intervalles de confiance correspondant à 95 % (IC

95%) sont montrés à côté de l'OR. Les biais des études ont été étudiés pour chaque méta-régression à l'aide du graphe en entonnoir avec les valeurs de l'effet (sur l'axe des abscisses) et une mesure de précision de l'étude (généralement l'erreur standard des valeurs de l'effet sur l'axe des ordonnées).

**Tableau 5** : Définition des modérateurs décrits dans la bibliographie et dans les méta-régressions.

<b>Modérateur</b>	<b>type</b>	<b>valeur</b>	<b>Description</b>
<b>Type de test et temps</b>	catégorique	BHB-post	BHB élevé au post-partum
		AGNE-post	AGNE élevés au post-partum
<b>Fréquence de test</b>	Catégorique	Tous les deux	BHB ou AGNE élevés dans la 1 <sup>ère</sup> et la 2 <sup>ème</sup> semaine.
		une	Un seul test, BHB ou AGNE élevés dans une seule semaine (dans la 1 <sup>ère</sup> ou la 2 <sup>ème</sup> semaine)
		L'une ou l'autre	Deux tests, BHB ou AGNE élevés dans la 1 <sup>ère</sup> ou la 2 <sup>ème</sup> semaine

### 2.3. Résultats

Le tableau 6 récapitule les études incluses dans la méta-analyse. Le nombre de troupeaux varie de 3 à 528 troupeaux, le nombre de vaches varie de 213 vaches à 2290 (tableau 6). Les taux seuils utilisés s'étendent de 0.96 à 1.4 mmol/L pour le taux de BHB au post-partum [7, 8, 10, 24, 28, 140, 198] et de 0.33 à 1 mmol/L pour le taux de AGNE au post-partum [4, 24, 198]. Les seuils utilisés pour les AGNE au pré-partum était de 0.27 à 0.4 mmol/L [4, 9, 268, 271, 272]. La méta-régression a montré qu'il existe peu de biais pour les études incluses comme l'indique le graphe en entonnoir pour le taux de réussite de la première insémination artificielle (TR1IA) et la cyclicité ovarienne (CO) (figure 5).

**Tableau 6** : Description de chaque étude incluse dans la méta-analyse.

Etudes	Origine <sup>1</sup>	Type d'étude <sup>2</sup>	Nombre de troupeaux	Nombre des vaches	temps <sup>3</sup>	Test	Seuil	Niveau de vache(%)	La Production laitière (305)
LeBlanc et al [271]	CA	Et	20	138	4 à 10 JAVP	AGNE	0.5	NA	NA
Walsh et al [7]	CA	Et	25	796	21JAVP et 7 à 63 JPP	BHB	1 à 1.4	13-42	7,000 à 10,000
Duffield et al [28]	US	Eob	25	1010	1-14 JPP	BHB	0.6 à 2	NA	8,211.5 ±201.4 à 8,639.2 ±195.2
Quiroz-Rocha et al [272]	CA	Et	20	990	7 à 1 JAVP	AGNE	0.3	NA	NA
Dubuc et al [268]	US, CA	Eob	3	1363	7 à 1 JAVP 1 à 21 JPP	AGNE BHB	0.6 à 1.1 1.3-1.5	17	NA
Ospina et al [24]	US	Coh	91	2290	14-2 JAVP et 3-14 JPP	AGNE BHB	0.33 à 0.72 0.7-1.2	NA NA	12,197 et 12,572
Ospina et al [8]	US	Coh	100	2758	14-2 JAVP et 3-14 JPP	AGNE BHB	0.2 à 1.02 0.8 à 1.4	NA	NA
Chapinal et al [273]	US, CA	Eob	55	2,365	10-4 JAVP et 1 à 21 JPP	AGNE	0.3 à 1.0	26	NA
Dubuc et al [4]	US, CA	Eob	6	2134	7 JAVP et 1 à 21 JPP	AGNE	0.4-0.9	17	11,571 ± 2,437
McArt et al [10]	US	Eob*	3	751	3 - 16 JPP	BHB	1.20	20	NA
Ribeiro et al [198]	US	Eob	69	771	7-14 JPP	AGNE BHB	0.70 0.96	20.0 35.4	6000**
Suthar et al [31]	EU	Eob	528	5884	2-15 JPP	BHB	1.2 à 1.4	21.8	NA
Shin et al [6]	SK	Eob	4	213	7-14 JPP	BHB	1.20	27.7	NA

<sup>1</sup>Origine : US = États-Unis ; CA = Canada ; SK = Corée du Sud ; EU : Europe. <sup>2</sup>Type de l'étude : Eob: Étude observationnelle, Eob\*: étude d'observation d' une partie d'un essai clinique, Coh: étude de cohorte, Et: essai clinique. <sup>3</sup>Temps : JAVP, jours avant le vêlage présumé ; JPP, jours post-partum. \*\* rendement annuel de la production laitière.

**Tableau 7** : Résultats de la méta- régression des effets des taux élevés des AGNE et BHB sur TR1IA et CO.

	Statistiques descriptives		Effets mixtes			
	N	Moyenne (ET <sup>1</sup> )	Estimation (ES <sup>2</sup> )	95% IC	I <sup>2</sup> (%)	χ <sup>2</sup> (df)
<b>TR1IA</b>						
<b>Aucun modérateur</b>	10	0.615 (0.165)	-0.523(0.083) ***	-0.686 à -0.359	82.89	55.790 (9)***
<b>Intercepté</b>	-	-	-0.368 (0.078) ***	-0.522 à -0.213	65.52	22.539 (8)**
<b>Test=AGNE-Post</b>	4	0.524 (0.101)	-0.369 (0.119) **	-0.603 à -0.135		
<b>Test= BHB-post</b>	6	0.703 (0.155)	Référence			
<b>RAO</b>						
<b>Aucun modérateur</b>	7	0.991 (0.466)	-0.128 (0.232) ~	-0.584 à 0.327	90.94	47.524 (6)***
<b>intercepté</b>	-	-	0.333 (0.176)*	-0.012 à 0.679	70.92	13.163 (5)*
<b>NO =1<sup>er</sup> ou le 2<sup>ème</sup></b>	4	0.682 (0.383)	-0.889 (0.263)***	-1.406 à -0.372		
<b>NO =un</b>	3	1.403 (0.116)	Référence			

\*\*\*P < 0.0001; \*\*P < 0.001; \*P < 0.05; ~P < 0.10.

<sup>1</sup>ET : Ecart Type.

<sup>2</sup>ES : Erreur Type ?

#### 4.1. Taux de réussite à la première insémination artificielle (TRIA-1)

L'association entre des taux élevés en AGNE et BHB et TRIA-1 a été rapportée dans 10 modèles de 3 publications [7, 10, 198]. Le risque brut (Moyenne ± écart type) de TRIA-1 des vaches ayant des taux élevés en AGNE et BHB a été de 0.615±0.165 et il a été de 0.703 ±0.155 chez des vaches ayant des taux élevés en BHB au post-partum. Ce risque brut a été de 0.524 ± 0.101 chez des vaches ayant des taux élevés en AGNE au post-partum. L'hétérogénéité de l'ensemble des données est élevée (I<sup>2</sup> = 82.89 %) et le score de χ<sup>2</sup> est de 55.790 sur 9 degrés de liberté (P 0.0001). L'interception du logarithme de l'effet dans le modèle aux effets aléatoires est de -0.523 (SE = 0.083; P 0.001), ce qui signifie un OR combiné de 0.592. L'inclusion du modérateur "type de test" a réduit l'hétérogénéité à 65.52 % (tableau 7; figure 6). Ce modérateur est significatif (χ<sup>2</sup> le modérateur = 9.564, P = 0.002) suggérant que le type de test (AGNE/BHB) et influence le TRIA-1.

La valeur de risque correspondant à TRIA-1 est plus important de 0.691 ( $P=0.001$ ) chez les vaches ayant des taux élevés en AGNE post-partum que chez des vaches ayant uniquement des taux élevés de BHB au post-partum. L'hétérogénéité des données des vaches avec des taux élevés des AGNE post-partum est faible ( $I^2 = 22.20\%$ ) et le score de  $\chi^2$  est de 3.637 sur 3 degrés de liberté ( $P > 0.05$ ). Le logarithme de l'effet dans le modèle à effet fixe de TRIA-1 des vaches qui ont des taux élevés en AGNE post-partum est de -0.749 ( $P=0.0001$ ), ce qui signifie un OR combiné de 0.472.

### 2.3.1. Cyclicité ovarienne au post-partum (CO)

L'association entre des taux élevés en AGNE et BHB et la CO est rapportée dans 7 modèles et dans deux études [4, 198]. Le risque brut (moyenne  $\pm$  écart type) de CO chez des vaches ayant des taux élevés en AGNE et BHB est de  $0.991 \pm 0.466$  et est de  $0.682 \pm 0.383$  chez des vaches au-dessus du seuil durant la 1<sup>ère</sup> semaine ou la 2<sup>ème</sup> semaine. Ce risque est de  $1.403 \pm 0.116$  chez des vaches au-dessus du seuil durant une semaine uniquement. L'hétérogénéité de l'ensemble des données est très élevée ( $I^2 = 90.94\%$ ) et le score de  $\chi^2$  est de 47.524 sur 6 degrés de liberté ( $P = 0.0001$ ). L'interception du logarithme de l'effet dans le modèle aux effets aléatoires sans modérateur est de -0.128 (erreur type = 0.232,  $P=0.10$ ), ce que signifie un OR de 0.879. L'inclusion du modérateur "fréquence du test" a réduit l'hétérogénéité à 57.39% (tableau7). Le modérateur "fréquence du test" ("Un"/"l'un ou l'autre") (Coefficient=2) est significatif ( $Q_{\text{modérateur}} = 11.379$ ,  $P = 0.0007$ ). Les vaches diagnostiquées avec des taux sériques élevés en AGNE ou BHB durant une des deux semaines ont une chance plus élevée de 59% (OR=0.411, 95 % CI = 0.245 à 0.689,  $P = 0.0001$ ) pour la CO que des vaches diagnostiquées avec des taux sériques élevés en AGNE ou BHB une fois uniquement (figure 7).

### 2.3.2. Intervalle vêlage-insémination fécondante

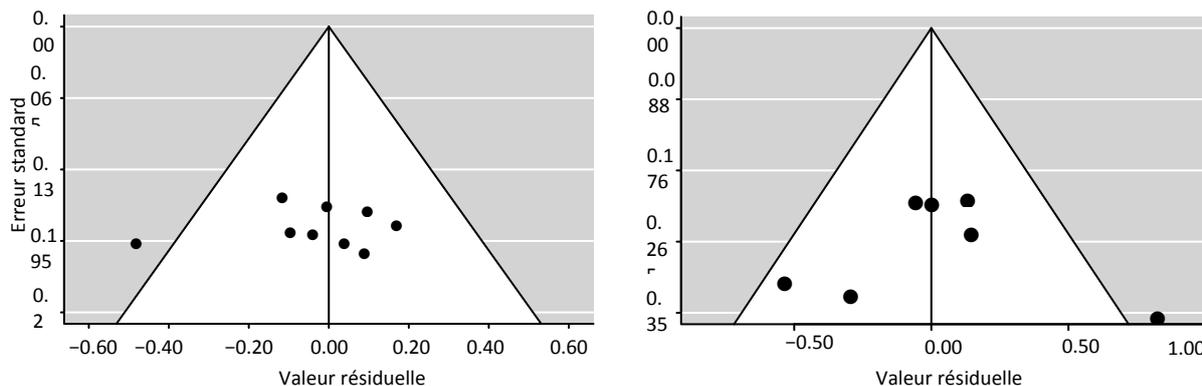
Le HR pour l'intervalle vêlage-insémination fécondante (IV-IF) chez les vaches avec des taux sériques élevés en AGNE ou BHB est rapporté dans 6 modèles et dans 3 études [7, 24, 10]. Il a été conduit en utilisant une méta-analyse de survie de temps via le paquet "Meta". L'hétérogénéité de l'ensemble des données est élevée ( $I^2 = 76.8\%$ ) et le score de  $\chi^2$  est de 21.590 sur 5 degrés de liberté ( $P = 0.0006$ ). Le HR est de 0.771 [95 % CI (0.611 à 0.972),  $P = 0.028$ ] pour le modèle aux effets aléatoires. Aucun résultat significatif n'a été observé pour l'inclusion des modérateurs dans la méta-régression pour l'IV-IF.

### 2.3.3. Endométrites

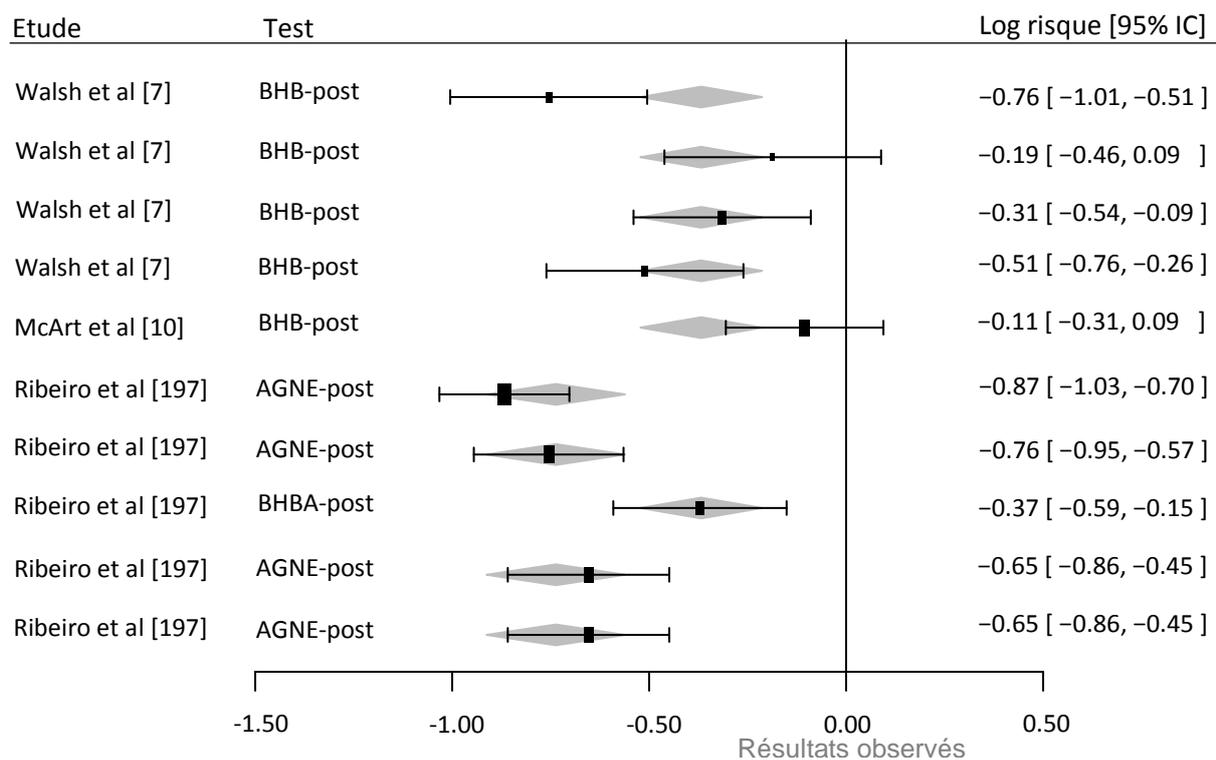
L'association entre des taux élevés en AGNE et BHB et les endométrites est rapporté dans 11 modèles et dans 6 études [6, 8, 28, 31, 268, 273]. L'hétérogénéité de l'ensemble des données est basse ( $I^2 = 9.4\%$ ) et le score de  $\chi^2$  est de 11.030 sur 10 de degrés de liberté ( $P = 0.355$ ). L'OR combiné, représenté par un diamant au fond du graphe dans la figure 8, est de 1.910 (95 % CI 1.720 à 2.122) pour le modèle à effet fixe et est de 1.912 (95 % CI 1.701 à 2.151) pour le modèle aux effets aléatoires. Le P dans les deux modèles est inférieur à 0.0001.

### 2.3.4. Rétention placentaire

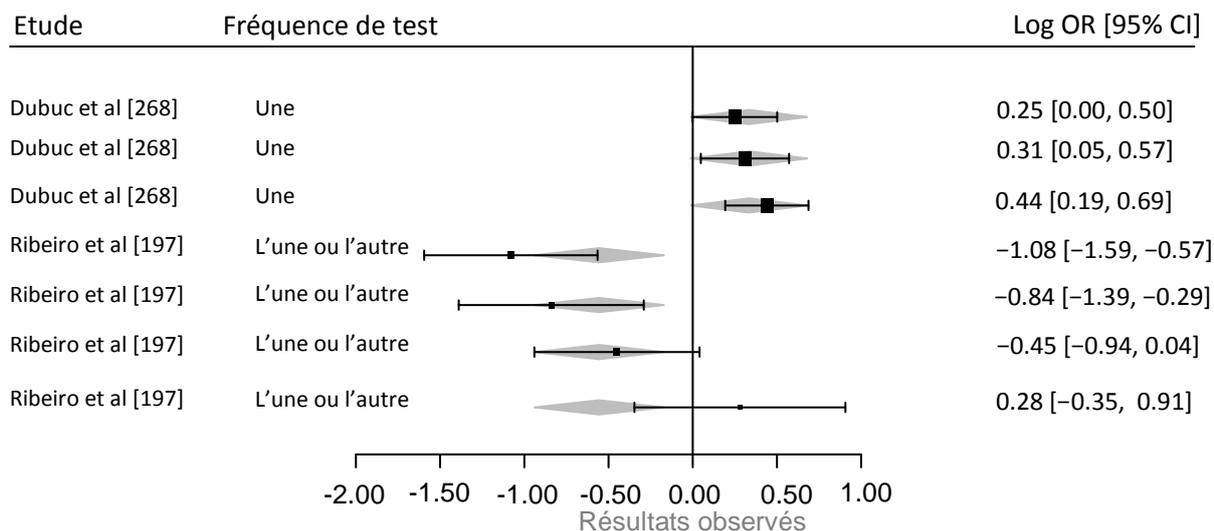
L'association entre des taux élevés en AGNE et BHB et la rétention placentaire est rapportée uniquement dans 3 modèles et dans 3 études incluses [271, 274, 273]. Aucune hétérogénéité n'a été observée dans l'ensemble des données ( $I^2 = 25.1\%$ ) et le score de  $\chi^2$  est de 2.670 sur 2 degrés de liberté ( $P = 0.263$ ). L'OR combiné est de 1.479 (95 % CI 1.222 à 1.791,  $P = 0.001$ ) pour le modèle à effet fixe et est de .514 (95 % CI 1.194 à 1.920,  $P = 0.0006$ ) pour le modèle aux effets aléatoires.



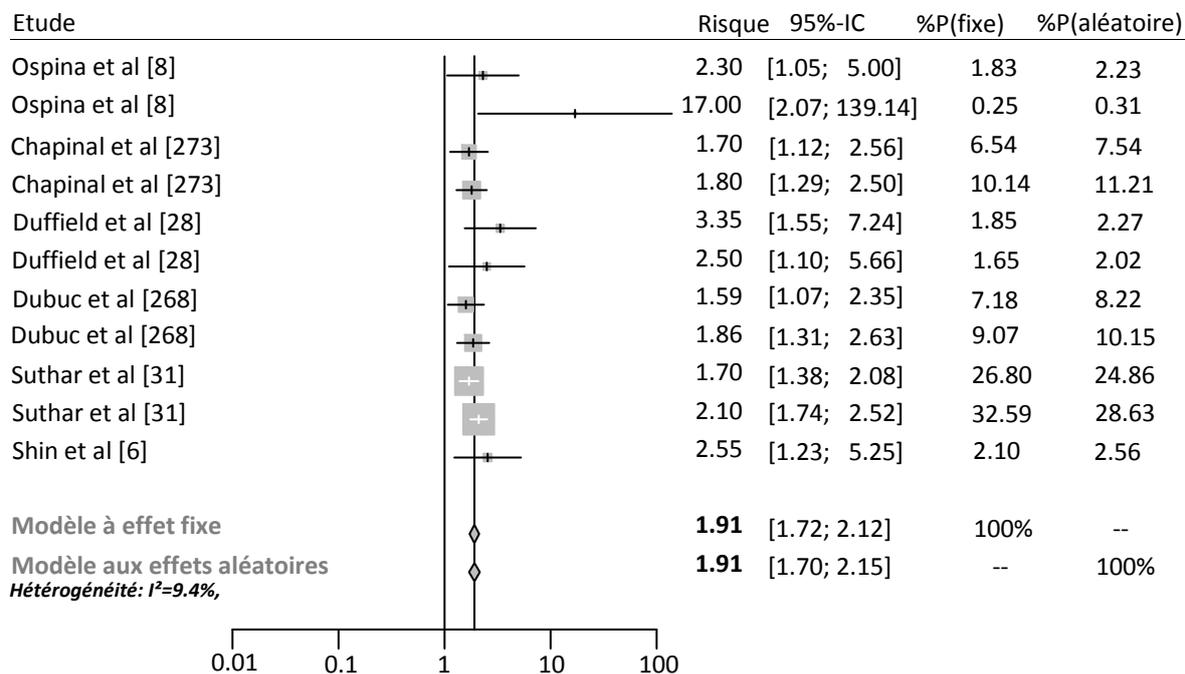
**Figure 5 :** Graphe en entonnoir pour évaluer le biais possible des études incluses correspondant à la meta-régression exécutée pour l'effet des taux élevés des AGNE et BHB sur le TR-1IA (graphe à gauche) et la CO (graphe à droite).



**Figure 6 :** Graphe Forestier pour le TRIA-1. Des ajustements ont été réalisés pour le modérateur "type de test".



**Figure 7** : Graphe forestier représentant les études incluses dans la méta-analyse pour évaluer l'effet combiné du CO.



**Figure 8** : Graphe forestier des études incluses dans la méta-analyse pour évaluer l'effet combiné des taux élevés en AGNE et BHB sur les endométrites.

## 2.4. Discussion

La présente méta-analyse a été conduite pour étudier l'association entre des taux sériques élevés des AGNE/BHB chez des vaches laitières durant la période de transition et les performances de reproduction d'une part et les troubles liés à la reproduction d'autre part. Malgré le petit nombre d'études incluses dans la présente méta-analyse, la base de données créée après l'assemblage des études éligibles a fourni de puissants résultats statistiques. La majeure partie des résultats (concernant TRIA-1 et la CO) utilisés dans le modèle de régression logistique dans les études incluses sont les rapports des côtes (OR). Ospina et al [8] et McArt et al [10] ont utilisé le risque relatif (RR) comme un résultat des variables dépendantes. La différence entre l'OR et RR est généralement faible dans une méta-analyse comme montré par Raboisson et al [32]. Le RR et l'OR peuvent être considérés interchangeables dans une mesure de changement relatif d'un risque d'un événement.

Nous nous sommes attendus aux impacts des taux sériques élevés en AGNE et BHB sur les performances de reproduction pour trois paramètres : TRIA-1, CO et IV-IF. Les trois paramètres avaient une haute hétérogénéité au niveau des résultats, ce qui a nécessité un modèle aux effets aléatoires avec soumission à une méta-régression (des modèles à effet mixte) à l'exception de l'IV-IF. Nous n'avons, cependant, pas constaté une amélioration de l'hétérogénéité pour ce paramètre avec les différents modérateurs inclus. Cette variable peut être fortement affectée par la gestion d'élevage notamment pour la période d'attente volontaire ou la détection d'œstrus.

Néanmoins, les résultats de la méta-régression ont montré un ajustement modéré du risque du TRIA-1 et CO. Le modérateur explicatif pour le TRIA-1 est le type de test (AGNE/BHB). Des taux sériques élevés en AGNE et BHB ont été, en effet, identifiés comme des facteurs de risque pour le TRIA-1. Les vaches qui ont montré des taux circulants élevés en BHB et en AGNE durant les deux premières semaines de lactation ont une probabilité réduite de gestation à la première insémination. L'utilisation d'un test de dosage des AGNE au lieu d'un test pour le BHB est plus significatif pour le TRIA-1. Des concentrations élevées en AGNE se sont avérées une mesure plus précise que celle des corps cétoniques [48]. Plusieurs études ont montré que l'existence de taux élevés en AGNE au post-partum a comme conséquence un plus grand risque pour le TRIA-1 que l'existence de taux élevés en AGNE au pré-partum et

des taux élevés en BHB au post-partum [4, 8, 276, 198]. Les vaches ayant des taux élevés en BHB et AGNE durant la première ou la deuxième semaine post-partum (l'une ou l'autre semaine) ont un taux réduit de CO par rapport à celles ayant des taux élevés en BHB et AGNE une semaine uniquement ( $P < 0.0001$ ). Cela signifie qu'un seul échantillonnage pourrait sous-estimer le risque des taux élevés en AGNE et BHB sur la CO. Les risques sont probablement sous-estimés car ce ne sont pas toutes les vaches avec des taux élevés en AGNE et BHB qui ont été identifiées dans les études. Si le test est réalisé une seule fois par semaine une vache pourrait potentiellement développer et résoudre une CSC entre les intervalles du test [10]. Il apparaît ainsi qu'une recherche sur l'effet de l'ampleur et la durée de l'hyper-acétonémie sur les performances de la reproduction est meilleur par l'utilisation cumulative du BHB et des AGNE.

En dépit de l'hétérogénéité élevée et de l'absence des modérateurs à inclure, les taux élevés en AGNE et BHB ont été associés aux retards de gestation ( $P = 0.028$ ) dans des modèles aux effets aléatoires. La fécondité chez la vache est un résultat de pratiques d'élevage [7, 24] liée intimement à la gestion de l'éleveur notamment en ce qui concerne la période d'attente et la qualité de détection de l'œstrus.

Pour les endométrites, les résultats obtenus suggèrent que des taux élevés en AGNE et BHB sont identifiés comme des facteurs de risque (OR combiné = 1.91;  $P < 0.0001$ ). De même que nos constatations, Raboisson et al [32] ont observé que l'hétérogénéité n'est pas significative et les vaches avec des taux élevés en AGNE et BHB présentent un risque 1.94 fois plus élevé de développer des endométrites. En effet, une concentration élevée en AGNE est nocive au bon fonctionnement des neutrophiles et à la santé utérine [222]. Les taux élevés en AGNE sont aussi directement liés au développement du stress oxydatif et aux réponses inflammatoires non contrôlées [278] à cause de l'immunodépression durant la période du post-partum. De même, il est rapporté que les leucocytes des vaches cétosiques ont des potentiels chimiotactiques inférieurs à ceux des vaches non-céto-siques [151].

Parce que la RP se produit dans les 24 heures après le vêlage, seuls les concentrations en métabolites durant les semaines pré-partum peuvent être considérées comme prédicteurs pour cette maladie [273]. En effet, des taux élevés en AGNE au prépartum sont associés à un risque plus élevé ( $P < 0,0001$  pour le modèle à effet fixe et  $P = 0,0006$  pour le modèle aux effets aléatoires) de la RP.

Il apparaît ainsi, que les vaches mal adaptées au début de la lactation [48] peuvent rencontrer des troubles métaboliques [45] et physiologiques [182] ainsi que de l'hypercétonémie. En dépit des données sur l'association entre le BEN et la CO, TRIA-1, IV-IF et la santé de l'utérus, les mécanismes sous-jacents restent encore à identifier, mais les mécanismes les plus probables seraient liés à un affaiblissement du métabolisme énergétique et à un système immunitaire déprimé.

## 2.5. Conclusions

De l'ensemble des résultats générés nous pouvons retenir que :

1) Les taux sériques élevés en AGNE et BHB au post-partum semblent affecter le TRIA-1 avec des valeurs plus prédictives pour les AGNE que pour le BHB; 2) les taux élevés en AGNE et BHB au péri-partum sont responsables d'une diminution de la cyclicité ovarienne. Cependant un échantillonnage moins fréquent pourrait sous-estimer leur valeur prédictive ; 3) les effets des taux élevés en AGNE et BHB durant la période de transition affectent la santé utérine en augmentant le risque des endométrites et de la RP. Des études ultérieures pourraient évaluer l'effet des taux élevés en AGNE et BHB sur les autres troubles de la reproduction tels que les kystes ovariens.

## **CHAPITRE 3**

# **TAUX ELEVES DE B-HYDROXYBUTYRATE ET/OU DES ACIDES GRAS NON ESTERIFIES AU POST-PARTUM ET LEUR ASSOCIATION AVEC LES METABOLITES PLASMATIQUES, L'ETAT CORPOREL ET LES PERFORMANCES DE REPRODUCTION CHEZ LA VACHE LAITIERE**

### 3.1. Introduction

Le début de lactation est une période cruciale pour la vache laitière au cours de laquelle la plupart des changements métaboliques dramatiques sont susceptibles de se produire [279]. Les vaches incapables de s'adapter à ce moment difficile sont plus disposées à un BEN [48] et mobilisent plus de réserves adipeuses [145] en libérant plus des AGNE [280]. Le foie prend en charge la grande partie des AGNE et il peut les oxyder complètement pour la production d'ATP, les exporter sous forme de lipoprotéines, ou bien les oxyder partiellement en corps cétoniques et en particulier en BHB [73]. Dans la littérature récente, les AGNE et le BHB sont tous les deux utilisés comme marqueurs du bilan énergétique négatif pendant le post-partum [33, 45, 273] ou de la cétose sub-clinique [127, 277], cependant il s'avère que ces deux bio-marqueurs ne peuvent pas être utilisés de façon interchangeable [33]. Lorsque les vaches ont un BEN excessif en terme d'importance, de durée et de timing [45], elles mobilisent des AGNE avec une quantité plus élevée que la capacité hépatique [48] induisant ainsi une stéatose hépatique [43]. En conséquence cette accumulation excessive de graisses dans le foie altère la fonction hépatique [73] avec augmentation considérable des concentrations du BHB [145]. Plusieurs études ont montré que les concentrations élevées en AGNE ou en BHB pendant les périodes pré- et post-partum sont les principaux facteurs de risque pour prédire les troubles de la santé [4, 25] et les performances de production [28, 9, 26] et de reproduction [24, 198]. Dans ces études, les auteurs ont considéré l'élévation de l'un de ces bio-marqueurs comme un indicateur de CSC ou du BEN. Récemment, McCarthy et al [33] ont signalé une faible corrélation entre des concentrations en AGN et en BHB, ce qui suggère que des concentrations élevées d'un des deux métabolites ne doivent pas être extrapolées

pour suggérer des concentrations élevées de l'autre. Dans une méta-analyse réalisée par Abdelli et al [281], les auteurs ont signalé que les vaches ayant des concentrations élevées en AGNE ont été de 32% moins susceptibles de concevoir à la IA1 (PR / IA1) que les vaches ayant des concentrations élevées en BHB au post-partum. Dans la même étude, les auteurs ont également indiqué que l'inclusion du test (AGNE / BHB) comme modérateur dans la méta-régression a réduit l'hétérogénéité de 12% dans les résultats de PR/IA1 [281].

À la lumière des faibles corrélations entre les concentrations en AGNE et en BHB observées dans l'étude de McCarthy et al [33], ainsi que les données de Abdelli et al [281], les résultats de la reproduction paraissent dépendre du test utilisé AGNE ou BHB; Nous supposons que les vaches ne présentant pas une cyclicité ou n'ayant pas conçu à la IA1 ont au moins une concentration élevée de l'un et/ou l'autre des bio-marqueurs au post-partum indiquant une plus grande sévérité du BEN ou de la CSC [282]. L'objectif de cette étude est donc d'évaluer les concentrations élevées en AGNE et BHB au post-partum, combinés ou séparés, par rapport à la réussite à la IA1 (P / AI), de la cyclicité de la vache, la NEC et un nombre de métabolites.

### 3.2. Matériel et méthodes

#### 3.2.1. Animaux

Les données utilisées dans cette étude et les sérums sont obtenues à partir des échantillons prélevés au cours d'une étude publiée pour déterminer l'effet des profils métaboliques sur les performances de reproduction chez les vaches Montbéliarde au post-partum [355]. Brièvement, 50 vaches Montbéliarde de deux fermes de la région de Tizi-Ouzou ont été suivies pendant 6 mois. La production moyenne quotidienne de ces vaches est de 25 kg/j. Pendant la période d'étude, les vaches ont reçu le fourrage vert (le trèfle) et du foin sec en hiver et le fourrage de prairie au printemps associé au foin de vesce d'avoine. Selon la production, la ration de base est complétée individuellement avec du concentré commercial (18% de protéines brutes digestibles), ainsi que des grains de maïs broyé, du tourteau de soja, de l'orge et d'un mélange de vitamines et de minéraux.

### 3.2.2. Prélèvement du sang et estimation de la NEC

Les fermes sont visitées toutes les deux semaines le même jour et au même moment. Les échantillons sanguins en vue du dosage des métabolites énergétiques, protéiques, minéraux et de progestérone (P4) sont prélevés au matin avant la distribution alimentaire entre 15 et 52 jours post-partum (JPP). Le sang est recueilli à partir de la veine coccygienne dans des tubes à vide de 10 ml, l'un contenant de l'héparine au lithium et l'autre sans anticoagulant. Les échantillons sont refroidis immédiatement et centrifugés à 1400x g pendant 10 min dans les 5 heures suivant le prélèvement. Le sérum ou le plasma sont alors prélevés avec une micropipette 1000  $\mu$ L et placés dans un microtube de 2 mL qui est immédiatement conservé à -20°C jusqu'à analyse. Les vaches ont été considérées comme ayant une concentration élevée en AGNE et en BHB si la concentration est  $\geq 0.70$  Mmol/L [198] et  $\geq 1.2$  Mmol/L [24], respectivement. NEC a été évaluée, à chaque collecte de sang et au moment vêlage, sur une échelle de scores allant de 1 à 5 (1 = cachectique; 5 = obèse) avec une précision de  $\frac{1}{2}$  point, en utilisant la technique visuelle développée par Edmonson et al [283]. Deux variables sont ainsi générés de NEC, ainsi, ont une importance : la NEC au vêlage et la perte de NEC pendant le premier mois de lactation.

### 3.2.3. Mesures des métabolites et la progestérone

Le plasma est utilisé pour la détermination des AGNE, BHB, glucose, cholestérol total, triglycérides (TG), urée, protéines totales, aspartate aminotransférase (AST),  $\gamma$ -glutamyltransférase ( $\gamma$ GT), alanine aminotransférase (ALT), calcium, sodium, potassium et le phosphore. Tous les métabolites du sang, à l'exception des AGNE et du BHB, ont été déterminés par un procédé enzymatique dans un auto-analyseur (Cobas 6000, Roche Hitachi, Mannheim, Allemagne) au niveau d'un laboratoire privé utilisant des kits commerciaux. Les coefficients de variation intra et inter-essai étaient <5% pour chaque essai.

La concentration du BHB (mmol / L) a été mesurée à l'aide d'un dispositif portatif (Precision Xceed®, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). La sensibilité et la spécificité de cet appareil chez les bovins sont de 85 à 90% et de 94 à 98%, respectivement [106]. En raison du manque de réactifs, la concentration plasmatique des AGNE est

mesurée une seule fois (au 30 JPP) en utilisant un dispositif portatif (DVM-NEFA ; Veterinary Diagnostics, Newburg, Wisconsin, USA). La sensibilité et la spécificité du test DVM-NEFA est de 84% et 96%, respectivement [120].

La progestérone est mesurée par ELISA (Elecys 2010, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Allemagne) en utilisant un kit ECL de progestérone humaine. Ces kits humains peuvent être utilisés pour la mesure de la P4 dans le sérum bovin. Les coefficients de variation inter et intra-essai sont de 16,6% et 6,7% respectivement.

#### 3.2.4. Détermination de la CO et diagnostic de gestation

Un diagnostic de gestation est réalisé par échographie transrectale chez toutes les vaches 30 jours après l'IA. Les vaches diagnostiquées gestantes sont réexaminées par palpation transrectale 35 jours plus tard. Les données de progestérone ont été dichotomisées en utilisant un seuil de 1 ng / mL pour indiquer la présence d'un corps jaune actif. La cyclicité ovarienne a été vérifiée à 52 JPP.

#### 3.2.5. Analyses statistiques

Des analyses statistiques ont été effectuées par SAS (version 9.1.3, SAS Institute Inc., Cary, NC). Les concentrations plasmatiques des métabolites sont considérées comme variables continues. Chaque variable de ces métabolites a été testée pour la normalité en utilisant le PROC UNIVARIATE (SAS Inst. Inc). Si la variable ne présente pas une distribution normale, des ajustements tels que des transformations logarithmiques, les racines carrées et les carrées sont utilisés pour normaliser les variables.

Les paramètres d'intérêts pour la fertilité sont la cyclicité ovarienne au 52 JPP et PR/AI1. Les résultats normalisés et toutes les autres variables sont analysés comme des mesures répétées en utilisant une procédure de modèle mixte (PROC MIXED, SAS Inst., Cary, NC). Pour estimer l'effet du jour d'échantillonnage sur les mesures, nous avons utilisé le modèle suivant:

$$Y_{xj} = \mu + S_t + \varepsilon_{xj}$$

$Y_{ij}$  est la variable dépendante pour la vache (x) dans l'échantillon (j),  $\mu$  est la moyenne globale,  $S_t$  est l'effet fixe des mesures répétées dans le temps, et  $\varepsilon_{xj}$  est l'erreur. Pour chaque variable analysée, les vaches ont été soumises à trois structures de covariance: composée symétrique (CS), autorégressive d'ordre 1 (ar1) et covariance

non structurée (UN). Les Effets fixes sont le traitement, le jour et leur interaction, alors que l'effet aléatoire sont les vaches.

De plus, un modèle linéaire général mixte a été adapté en utilisant la procédure MIXED de SAS (effet aléatoire de la vache) pour évaluer l'effet du test utilisé (AGNE/BHB) sur la perte de la NEC (dNEC).

La sensibilité et la spécificité du diagnostic, avec des intervalles de confiance de 95% (IC) et l'exactitude des tests de la BHB, des AGNE seuls ou en association ont été calculées pour détecter les vaches non cyclique et non gestante en utilisant Win Episcope 2.0. Une courbe de profil de la NEC et un diagramme en bâton de la perte de la NEC (dNEC) ont été réalisés en utilisant le logiciel Prism 6.07 (GraphPad Software, Inc. La Jolla, CA USA).

### 3.3. Résultats

L'incidence globale de la cétose sub-clinique à 30 JPP est de 30% et 62% pour les vaches ayant un taux élevé en BHB et en AGNE respectivement à 30 JPP. Toutes les vaches, à l'exception d'une, qui ont une concentration élevée en BHB ont montré une élévation des AGNE (93,33%).

#### 3.3.1. Métabolites

Les vaches ayant simultanément des taux élevés en AGNE et en BHB ont tendance à présenter des concentrations élevées de cholestérol de 30 à 52 JPP par rapport aux vaches saines (SAINES). Toutefois, lorsque les AGNE sont les seuls à être élevés, nous n'avons pas observé d'effet significatif sur les concentrations de cholestérol et de triglycérides par rapport aux vaches saines (tableau 8). Les vaches ayant des concentrations élevées en AGNE et BHB simultanément ont eu tendance à présenter des concentrations élevées en urée de 30 et 41 JPP comparativement aux vaches saines et à 52 JPP comparativement aux vaches saines et aux vaches ayant uniquement un taux élevé en AGNE. Les vaches ayant au même moment des AGNE et BHB élevés ont montré une tendance à exprimer des concentrations élevées en AST à 15, 30, 41 JPP et en ALT à 41 JPP et ceci par rapport aux vaches saines et aux vaches ayant seulement des AGNE élevés. Nous avons observé un effet significatif du temps d'échantillonnage sur le glucose, le cholestérol et l'AST. Par contre, il n'existe aucune interaction groupe x temps pour tous les métabolites plasmatiques. De même,

qu'aucun effet significatif ( $p>0.05$ ) n'est observé pour le groupe, le temps d'échantillonnage et les interactions groupe x temps pour  $\gamma$ GT, l'albumine, les protéines totales, calcium, phosphore, potassium, magnésium et sodium.

**Tableau 8** : Comparaison des moyennes des moindres carrés (MMC) et l'erreur-type (ET) des métabolites plasmatiques des vaches ayant des concentrations élevées en AGNE et BHB simultanément (DEUX) ou ayant des concentrations élevées uniquement en AGNE (AGNE-E) et des vaches saines (SAINE) au 30, 41 et 52 JPP.

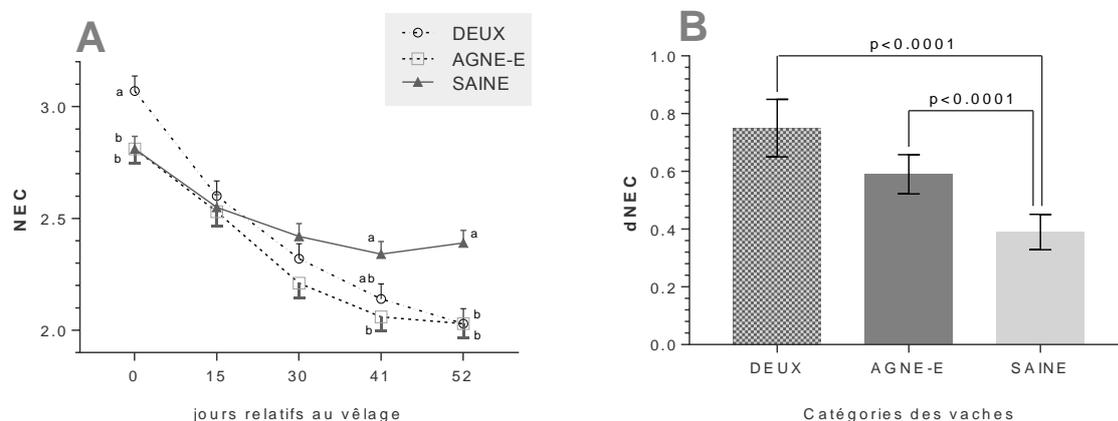
Métabolites	groupe	MMC				ET	P <sup>1</sup>		
		d15	d30	d41	d52		Groupe	Temps	G *T <sup>2</sup>
Glucose	DEUX	0.651	0.652	0.657	0.655	0.031	0.951	0.009	0.988
	AGNE-E	0.664	0.666	0.669	0.668	0.029			
	SAINE	0.656	0.660	0.664	0.663	0.026			
Cholestérol	DEUX	1.743	<b>1.777a</b>	<b>1.792a</b>	<b>1.799a</b>	0.091	0.149	<0.0001	0.657
	AGNE-E	1.589	<b>1.616ab</b>	<b>1.620ab</b>	<b>1.632ab</b>	0.110			
	SAINE	1.495	<b>1.513b</b>	<b>1.525b</b>	<b>1.526b</b>	0.105			
Triglycérides	DEUX	<b>0.216a</b>	<b>0.214a</b>	<b>0.213a</b>	<b>0.215a</b>	0.016	0.083	0.869	0.885
	AGNE-E	<b>0.175ab</b>	<b>0.176ab</b>	<b>0.175ab</b>	<b>0.176ab</b>	0.015			
	SAINE	<b>0.171b</b>	<b>0.169b</b>	<b>0.168b</b>	<b>0.166b</b>	0.014			
Urée	DEUX	0.344	<b>0.351a</b>	<b>0.347a</b>	<b>0.354a</b>	0.026	0.171	0.199	0.422
	AGNE-E	0.306	<b>0.305ab</b>	<b>0.305ab</b>	<b>0.308b</b>	0.031			
	SAINE	0.271	<b>0.275b</b>	<b>0.272b</b>	<b>0.271b</b>	0.033			
AST	DEUX	<b>97.93a</b>	<b>99.21a</b>	<b>104.85a</b>	104.43	5.624	0.519	0.681	0.799
	AGNE-E	<b>85.23b</b>	<b>84.88b</b>	<b>82.14b</b>	96.58	4.646			
	SAINE	<b>91.27ab</b>	<b>84.05b</b>	<b>80.50b</b>	84.39	3.643			
ALT	DEUX	36.973	37.738	<b>38.932a</b>	38.279	2.858	0.373	<0.0001	0.239
	AGNE-E	34.422	34.904	<b>35.199b</b>	35.315	3.495			
	SAINE	39.459	39.963	<b>40.036b</b>	40.572	3.324			

<sup>1</sup>Valeur de p est significative lorsque  $p<0.05$

<sup>2</sup> G\*T : interaction groupe temps

### 3.3.2. Profil et perte du NEC

Pour la NEC, l'ANOVA aux mesures répétées a révélé une tendance à des effets significatifs du groupe ( $P = 0,01$ ), du temps ( $P < 0,0001$ ) et de l'interaction groupe-temps ( $P < 0,0001$ ) (figure 9A). La NEC au moment du vêlage est plus élevée chez les vaches ayant présenté des AGNE et BHB élevés comparativement à celles présentant uniquement des AGNE élevés ou les vaches saines. Cependant, la NEC au 41 JPP est plus élevée chez les vaches saines que chez les vaches ayant des AGNE et BHB élevés simultanément ou avec uniquement des AGNE élevés. De même, les vaches avec des taux élevés simultanément en AGNE et BHB ou uniquement un taux élevé en AGNE perdent plus de NEC pendant le premier mois de lactation que les vaches saines (figure 9.B).



**Figure 9. A :** Moyennes des moindres carrés (MMC) ± l'erreur-type (ET) pour la NEC au vêlage, 15, 30, 41 et 52 JPP (A) et la perte de la NEC (dNEC, moyenne ± ES) pour les vaches qui ont présenté un taux élevé en AGNE et BHB simultanément (DEUX) et celles avec uniquement un taux élevé en AGNE (AGNE-E) et les vaches saines (SAINES). **B :** la perte de la note n'état corporel au premier mois de lactation (dNEC) chez les différentes catégories des vaches.

### 3.3.3. Cyclicité ovarienne

La proportion des vaches ayant un taux sérique de P4 > 1 ng / mL à 52 JPP est de 56% (n = 28). L'utilisation d'un seuil 1.2 Mmol/L de BHB pour prédire les vaches non cycliques à 52 JPP a eu pour résultat une sensibilité élevée (72,4%) et une faible spécificité (33,3%). Cependant, l'utilisation d'un seuil de 0.7 Mmol/L en AGNE a eu une sensibilité faible (45,5%) et une spécificité élevée (75,0%). Lorsque le seuil a été modifié pour les deux bio-marqueurs, nous avons observé une sensibilité de 68,2% (IC 95% = 48,7-87,6), et une spécificité de 70% (IC 95% = 41,6-98,4). La fiabilité des tests a été de 58%, 66% et 69,7% pour le BHB, les AGNE et les deux en association (tableau 9).

Des taux élevés en AGNE sont associés à une réduction de 84,5% (OR = 0,155, p = 0,006) de la cyclicité à 52 JPP. Cependant, aucune différence significative (p = 0,064) entre les vaches saines et les vaches ayant un taux élevé simultanément en AGNE et BHB n'a été enregistrée (tableau 10). Les vaches ayant un taux élevé en AGNE ou en BHB ont la même chance de cyclicité ovarienne à 52 JPP (p = 0,695).

**Tableau 9** : Sensibilité (%), spécificité (%), avec les intervalles de confiance (IC) de 95% et la fiabilité du diagnostic basé sur le BHB, les AGNE ou les deux pour les vaches non cycliques.

Test	NO des vaches	Vaches non cycliques	Sensitivité (95% IC)	Spécificité (95% IC)	Fiabilité
<b>BHB</b>	15/50	8/15	36.4% (16.3, 56.5)	75.0% (59.0, 91.0)	58.0%
<b>AGNE</b>	31/50	18/31	81.8% (65.7, 97.9)	53.6% (35.1, 72.0)	66.0%
<b>DEUX</b>	14/50	7/14	70.0% (41.6, 98.4)	69.6% (50.8, 88.4)	69.7%

**Table 10** : Effet des taux élevés en BHB et/ou en AGNE sur la cyclicité ovarienne à 52 JPP.

Valeur	Estimation	ET*	OR	95% IC	P
<b>DEUX vs. SAINE</b>	-1.862	1.098	0.155	0.021-1.120	0.064
<b>AGNE-E vs. SAINE</b>	-2.234	0.816	0.107	0.021-0.529	0.006
<b>DEUX vs. AGNE-E</b>	0.372	0.953	1.451	0.224-9.411	0.695

\*Erreur type

### 3.3.4. Réussite d'IA 1

La PR / AI à la première insémination est de 34,0%. L'utilisation d'un seuil de 1.2 Mmol/L de BHB pour prédire les vaches non gestantes à la première IA a eu pour conséquence une sensibilité faible (46,4%) et une spécificité élevée (90,9%). Cependant, l'utilisation d'un seuil de 0.7Mmol/L pour les AGNE ou les deux ensembles (AGNE et BHB) pour prédire les vaches non gestantes a donné une sensibilité et une spécificité plus élevées. La fiabilité du test est de 66% 84% et 81,8% pour le BHB, les AGNE et les deux ensembles (tableau 11).

Le PR / AI-1 est réduit de 87% (OR = 0,13, P = 0,001) pour chaque Mmol d'augmentation simultanée de BHB et d'AGNE et de 92,6% (OR = 0,074, P = 0,006) pour chaque Mmol des deux marqueurs pris séparément (tableau 12). Cependant, les vaches ayant un BHB élevé avec ou sans AGNE ont la même chance de PR / AI-1 (p = 0,647).

**Tableau 11** : Sensibilité (%), spécificité (%), avec les intervalles de confiance (IC) de 95 % et la fiabilité de diagnostic basé sur le BHB, les AGNE ou les deux pour les vaches non gestantes.

Test	NO des vaches	Vaches non gestantes	Sensitivité (95% IC)	Spécificité (95% IC)	Fiabilité
<b>BHB</b>	15/50	13/15	46.4% (28.0, 64.9)	90.9% (78.9, 102.9)	66.0%
<b>AGNE</b>	31/50	28/31	84.8% (72.6, 97.1)	82.4% (64.2, 100.5)	84.0%
<b>DEUX</b>	14/50	12/14	75.0% (53.8, 96.2)	88.2% (72.9, 103.6)	81.8%

**Tableau 12** : Effet des taux élevés en BHB et/ou en AGNE sur la réussite d'IA-1.

Value	Estimation	ET*	OR	95% IC	P
<b>DEUX vs. SAINE</b>	-2.038	0.651	0.130	0.036-0.467	0.001
<b>AGNE-E vs. SAINE</b>	-2.592	0.950	0.074	0.011-0.482	0.006
<b>DEUX vs. AGNE-E</b>	0.553	1.211	1.739	0.161-18.688	0.647

\*Erreur type

### 3.4. Discussion

Plusieurs études se sont intéressées à l'association entre des taux élevés en AGNE ou en BHB pendant la période de transition et les faibles performances de reproduction chez la vache laitière [24, 276, 198, 140]. L'approche analytique de la présente étude est utilisée pour examiner l'association entre des taux élevés à la fois en AGNE et/ou en BHB au post-partum, la cyclicité ovarienne et la réussite d'IA-1.

Les résultats ont montré que lorsque la concentration en AGNE est élevée, la concentration en BHB n'est pas nécessairement importante, et lorsque la concentration de BHB est élevée, la concentration en AGNE sera fort probablement élevée. En effet, une étude récente a montré que les concentrations en AGNE au postpartum sont faiblement corrélées avec les concentrations de BHB [33]. Des études ont rapporté que le pic de la concentration moyenne des AGNE se produit avant le pic du BHB au post-partum [284, 53].

Au début de la lactation, l'énergie emmagasinée dans les graisses est mobilisée sous forme d'AGNE, dont une partie est absorbée par le foie [24]. L'absorption des AGNE à partir du plasma par le foie est proportionnelle à la concentration plasmatique [77]. Selon Grummer et al [285], l'augmentation de la concentration des AGNE plasmatiques peut conduire à l'augmentation de la céto-genèse par les hépatocytes ce qui explique que presque toutes les vaches qui ont un taux élevé en BHB présentent un taux élevé en AGNE. Cependant, plus de la moitié des vaches ayant des AGNE élevés n'ont pas de BHB élevé. Ceci peut s'expliquer en partie par la capacité individuelle à s'adapter à la mobilisation excessive de la réserve adipeuse [28, 49] et plus précisément à la capacité du foie [76, 77]. Par conséquent, les changements homéorhétiques requis pour obtenir cette mobilisation des graisse semblent être principalement sous contrôle génétique [286].

En effet, la captation hépatique des AGNE est limitée par la capacité du cycle d'acide tricarboxylique (TCA) [280] et lorsque les AGNE dépassent cette capacité, la production des corps cétoniques et le dépôt de triacylglycérol augmentent considérablement [287] provoquant une stéatose hépatique [288]. Cependant, dans l'étude de Reynolds et al [289], les auteurs ont observé que la contribution du carbone d'AGNE à la synthèse du BHB ne peut pas expliquer la totalité du carbone utilisé dans la synthèse des corps cétoniques dans le foie. Dolinsk et al [290] ont montré que la cétose post-partum chez les vaches n'est pas liée à des changements significatifs

dans l'activité des enzymes hépatiques impliquées dans le métabolisme des acides gras.

Dans la présente étude, des concentrations élevées en cholestérol, triglycérides, urée et ASAT ont également été constatées chez les vaches céto-siques qui auraient pu entraîner une mobilisation importante des graisses. Ceci est similaire aux résultats rapportés par Bjerre-Harpøth et al [291]; Ces auteurs ont suggéré que des concentrations élevées de cholestérol et de triglycérides plasmatiques sont le résultat de l'augmentation de la sécrétion de lipoprotéines de très faible densité par le foie. L'ASAT est une enzyme qui devient élevée avec des lésions cellulaires et peut être donc importante chez les vaches atteintes de stéatose hépatique ([280]. Jorritsma et al [37] ont conclu que des taux élevés en AGNE et de faible taux en glucose et d'urée au début de lactation sont des indicateurs significatifs de stéatose hépatique. Il est intéressant de noter qu'aucune différence n'a été observée entre le taux de glucose entre les trois groupes de vaches et ceci contrairement aux résultats antérieurs où le glucose présente une corrélation négative avec le BHB et les AGNE [140]. Dans d'autres études, des concentrations élevées en AGNE ou en BHB n'ont pas influencé la concentration de glucose, mais elles ont induit, plutôt, une résistance à l'insuline [145, 292].

La note d'état corporel est toujours un objet de recherche pour la prévention des changements métaboliques excessifs chez les vaches laitières, il reste un paramètre qui présente une bonne corrélation avec les concentrations élevées en AGNE et en BHB [43, 137]. De façon similaire à la présente étude, d'autres travaux ont rapporté une association de la NEC au vêlage ou la perte de NEC au début de la lactation à un taux élevé en BHB [137, 139, 294, 293, 295]. Dans l'étude en cours, les vaches ayant à la fois des AGNE et BHB élevés ont tendance à avoir une NEC plus élevée au vêlage comparativement aux vaches ayant un taux élevé en AGNE uniquement, cependant cette différence n'est pas évidente pour la perte de NEC pendant le premier mois de lactation. Cela signifie que les vaches de deux groupes ont mobilisé la même quantité d'acides gras au cours du premier mois de lactation, mais les vaches ayant une NEC plus élevée au vêlage ont une capacité hépatique inférieure aux AGNE [141] pour limiter la production de corps cétoniques et notamment le BHB.

Associé à une matière sèche ingérée faible due à une NEC élevée [43, 49] et à une augmentation des besoins en lactose pour la production laitière, l'oxalo-acétate deviendrait probablement une limite pour l'oxydation des AGNE et les corps

cétoniques qui s'accumulent en conséquence [296]. Conformément à cette hypothèse, Compton et al [30]; Shin et al [6]; Vanholder et al [139] ont signalé que les vaches ayant une NEC élevée au vêlage sont plus susceptibles de développer une cétose sub-clinique ou clinique.

Une importance considérable a été accordée pour des taux élevés en AGNE ou BHB au post-partum et leur association avec les résultats de production [4, 24]. Dans la présente étude, un diagnostic basé sur des taux élevés en AGNE au post-partum a présenté plus de fiabilité que le BHB et presque la même fiabilité avec un taux élevé des deux bio-marqueurs lorsqu'ils ont été utilisés comme prédicteurs pour les vaches non cycliques et les vaches non gestantes. Il est constaté plus particulièrement que les AGNE ont été une mesure plus précise pour le BEN que les corps cétoniques [48]. Les AGNE sont également un indicateur plus puissant pour les maladies puerpérales et pour la production laitière que le BHB [273, 297]. Les vaches ayant des taux élevés en AGNE et en BHB simultanément ou un taux uniquement élevé en AGNE avaient un risque réduit de cyclicité à 52 JPP et de gestation à la première IA (Tableaux 10 et 12). En revanche, nous n'avons observé aucun changement significatif entre les vaches de ces deux groupes (AGNE et BHB ou AGNE seuls). Ospina et al [24] ont constaté que, lorsque les deux bio-marqueurs sont dans le même modèle pour prédire la performance reproductive, le BHB n'est pas aussi puissant que les AGNE. Les mêmes résultats ont été rapportés par Dubuc et al [4], où les auteurs ont constaté que les AGNE sont plus étroitement associés à la reprise de l'activité ovarienne que la cétose sub-clinique.

Un effet négatif direct est observé entre des taux élevés en AGNE et en BHB et les performances de reproduction en raison de la relation physiologique entre ces bio-marqueurs et le BEN [24]. En effet, plusieurs études ont rapporté qu'un taux élevé en BHB et en AGNE peut affecter le fonctionnement des cellules folliculaires [207], la maturation des ovocytes [233, 235], le fonctionnement lutéal [298, 299] et le développement embryonnaire précoce [232, 258].

### 3.5. Conclusion

Des résultats générés, nous pouvons retenir que le fait de considérer un taux élevé en AGNE au post-partum comme prédicteur des vaches en cétose sub-clinique peut surestimer les résultats, un taux élevé en BHB au postpartum comme prédicteur peut quant à lui, les sous-estimer. Une NEC excessive au vêlage augmente le risque de cétose, et à mesure que la concentration de BHB augmente, le cholestérol, les triglycérides, l'AST, l'ALT et l'urée augmentent parallèlement. Cependant, un taux élevé en AGNE en post-partum n'a pas affecté ces métabolites. Les vaches avec un taux élevé simultanément en BHB et en AGNE ou un taux élevé en AGNE uniquement au post-partum ont une chance réduite de présenter une cyclicité ovarienne ou une gestation à la première insémination. D'autres études à grande échelle sur terrain sont nécessaires pour évaluer globalement les circonstances du troupeau dans lesquelles un effet négatif des taux élevés en AGNE et en BHB peuvent être associés ou séparés.

## CHAPITRE 4

### EFFET DU PLASMA DE VACHES A DIFFERENTS STATUTS ENERGETIQUES SUR LA MOTILITE SPERMATIQUE ET LA DISTRIBUTION DES SOUS-POPULATIONS SPERMATIQUES DE LA SEMENCE BOVINE DECONGEELEE.

#### 4.1. Introduction

Les recherches actuelles sur la nutrition et la fertilité des bovins se sont essentiellement intéressées à l'ensemble des réponses de la femelle aux événements cellulaires et moléculaires complexes qui contrôlent la production des gamètes, la fécondation et le développement embryonnaire [300]. Les études se sont surtout concentrées sur le début de la lactation où les vaches doivent être inséminées avec dépôt de spermatozoïdes au niveau intra-utérin avant leur rencontre avec l'ovocyte (s) et leur participation à la fécondation [301]. Dans leur trajet du corps utérin vers l'oviducte, les spermatozoïdes doivent surmonter une série de microenvironnements utérins [96] composés d'une combinaison de constituants dérivés du plasma et de molécules sécrétées par l'oviducte et l'épithélium utérin [259] qui interfèrent avec la motilité des spermatozoïdes et leur capacité de fertilisation ultérieure [302]. Ainsi, le maintien de la motilité et de la viabilité des spermatozoïdes pendant un intervalle prolongé après la décongélation est essentiel pour obtenir des taux de gestation élevés [303]. Antérieurement, un certain nombre d'études ont rapporté un effet du sérum ou du plasma sanguin sur la motilité du sperme chez diverses espèces, y compris les bovins [304].

Dans ce sens, Il existe une opinion valable selon laquelle les métabolites plasmatiques sont fréquemment utilisés pour évaluer le statut énergétique et influencer, entre autres facteurs, la fertilité de la vache laitière [279]. En effet, , il y existe des rapports sur les relations entre la fertilité post-partum et plusieurs métabolites plasmatiques chez les vaches laitières [26, 305, 306]. Des études ont rapporté des associations de baisse de la fertilité en présence de certains métabolites plasmatiques reflétant le statut énergétique, comme les AGNE et le BHB [4, 7, 24, 32, 198, 281]. La NEC, qui reflète également l'état énergétique pendant le post-partum, peut être lié à la fertilité des

vaches laitières [24, 49, 307]. De plus, la NEC, à des périodes clés de lactation, ainsi que la perte de NEC au début de la lactation, affectent la fécondité de la vache d'une manière significative [308, 309, 310, 311, 312]. Certaines de ces études ont rapporté l'effet négatif d'une faible NEC autour de l'insémination artificielle (AI) et des taux élevés en AGNE et de BHB sur la fertilité postpartum. Des travaux ont particulièrement rapporté qu'une perte élevée de NEC ainsi que des concentrations élevées en AGNE et en BHB pourraient affecter le bon fonctionnement des cellules folliculaires [207], la maturation des ovocytes [35, 313] et le développement embryonnaire précoce [243, 258]. Cependant, à notre connaissance, aucune étude n'a explicitement mis l'accent sur l'effet de ces facteurs sur la motilité des spermatozoïdes une fois dans l'environnement utérin et qui pourrait expliquer une part des échecs de l'insémination artificielle par action directe sur les spermatozoïdes. L'objectif de cette étude est ainsi de tester l'hypothèse selon laquelle des plasmas sanguins ayant été collectés le jour de l'insémination artificielle à partir de vaches ayant des NEC différentes pourraient affecter la qualité du sperme.

## 4.2. Matériel et méthodes

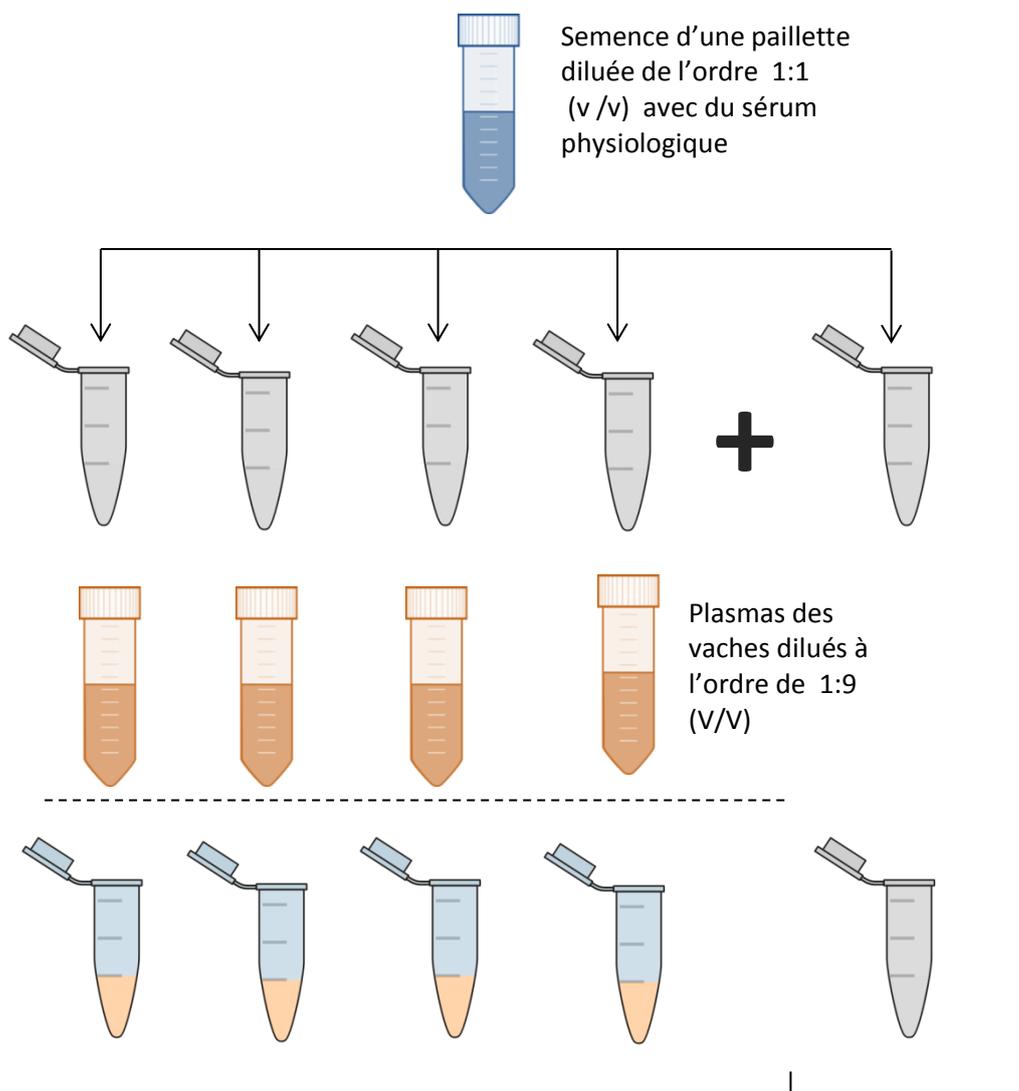
### 4.2.1. Animaux, prélèvement sanguin et analyses

Des prélèvements de sang ont été effectués à partir de 49 vaches de race Holstein et Montbéliarde au moment de l'IA. Les prélèvements ont été effectués à partir de la veine coccygienne dans des tubes sous vide avec anticoagulant (FL médical, Italie). Les prélèvements ont été ensuite réfrigérés immédiatement après la collecte et centrifugés à 733 x g pendant 10 min dans les 4 heures suivant le prélèvement. Les plasmas ont été ensuite stockés à -20°C jusqu'à analyse. Les concentrations de BHB dans le plasma (mmol / L) ont été mesurées à l'aide d'un dispositif portatif (Precision Xceed, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). La sensibilité et la spécificité de ce test sont de 85 à 90% et de 94 à 98%, respectivement [106]. La concentration des AGNE est mesurée en utilisant le test DVM-NEFA (Veterinary Diagnostics, Newburg, Wisconsin, USA). Les vaches sont considérées comme ayant des taux élevés en AGNE et en BHB si les concentrations sont  $\geq 0.70$  Mmol/L [198] et  $\geq 1.2$  Mmol/L [24], respectivement. Simultanément au prélèvement, la NEC a été évaluée sur une échelle de scores allant de 1 à 5 (1 = cachectique; 5 = obèse) avec une précision de ½ point

en utilisant la technique visuelle développée par Edmonson et al [283]. La NEC a été également dichotomisé en deux groupes : NEC élevée  $\geq 3$  et faible  $< 3.0$  [314] [312].

#### 4.2.2. Semence et incubation post-congélation

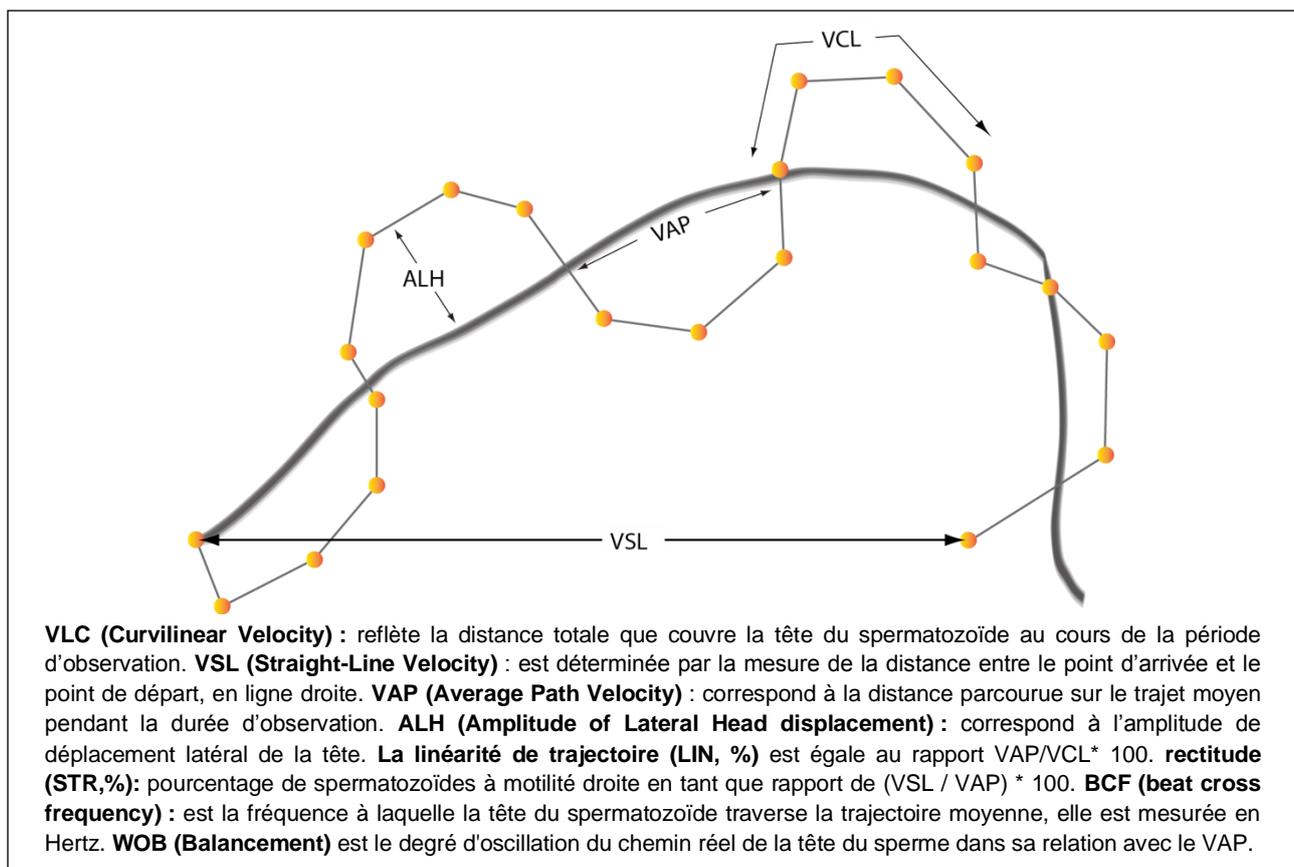
Des paillettes de semence congelées au Centre National de l'Insémination Artificielle et de l'Amélioration Génétique (CNIAAG) - Alger ont été employées pour cette étude. La semence a été congelée en utilisant des procédures standard après dilution avec un dilueur commercial (BioXcell®, IMV technologies, France) et emballée dans des paillettes de 0.25-ml contenant  $20 \times 10^6$  spermatozoïdes par paillette et stockée dans l'azote liquide jusqu'à utilisation. Treize répétitions ont été réalisées en utilisant des paillettes différentes. Chaque paillette a été décongelée dans un bain marie à 37°C pendant 20-30 sec ; le contenu est ensuite dilué 1:1 avec du sérum physiologique (NaCl, 0.9%). Les plasmas recueillis des vaches ont été, également, dilués de l'ordre de 1:9 (V/V) avec du sérum physiologique (figure 10). Le sperme dilué est partagé sur quatre aliquotes et dilué à l'ordre de 1:1 (V/V) avec le plasma précédemment dilué. Pour chaque paillette décongelée, nous avons gardé un aliquote contenant uniquement le sperme dilué comme échantillon témoin. Les échantillons ont été alors incubés à 37°C et la motilité spermatique est évaluée à 5 minutes, à 30 minutes et à 3 heures.



**Figure 10** : protocole de dilution de la semence avec le plasma des vaches.

#### 4.2.3. Evaluation de la motilité spermatique

Les paramètres cinématiques des spermatozoïdes ont été déterminés en utilisant le Sperm-Class Analyzer® (Microptic, Barcelone, Espagne). Ce système est constitué d'un microscope optique à contraste de phase négatif (Nikon, E200) équipé d'une caméra CCD Basler. Le CASA (Computer Assisted Semen Analysis) est un analyseur d'images qui permet d'évaluer de manière automatisée la concentration, la vitalité, la morphologie et surtout les caractéristiques de la mobilité des spermatozoïdes d'un échantillon. Il fournit, donc, une évaluation quantitative et qualitative objective et rapide du sperme [315]. Pour chaque échantillon, deux gouttes de 10 $\mu$ l de sperme bien mélangées sont déposées sur une lame de verre et recouvertes par des lamelles. L'analyse est réalisée au grossissement 10x et Ph- au-dessus d'une platine chauffante intégrée (37°C) dans le microscope. Ce dernier comporte une source lumineuse avec un filtre vert. L'analyse se fait grâce au logiciel, sous l'ongle de SCA Mobilité® ce qui permet de définir de façon objective et répétable les paramètres de mouvement décrits dans la figure 11.



**Figure 11:** Les différents paramètres mesurés pour la motilité spermatique.

#### 4.2.4. Analyses statistiques

Toutes les données enregistrées ont été importées dans une base de données (Excel, 2010) et toutes les analyses statistiques ont été effectuées en utilisant SAS 9.1 (SAS Institute, Cary, NC, USA). Les variables de motilité obtenues par CASA ont été initialement analysées par l'ANOVA à mesures répétées en utilisant des modèles linéaires mixtes de SAS (SAS Inst Inc.) (Les effets fixes ont été les groupes de NEC, BHB et AGNE alors que l'effet aléatoire est l'aliquote). L'ajustement du modèle a été déterminé dans toutes les analyses en choisissant le modèle sur la base de l'information bayésien BIC et le critère d'information d'akaike. Une structure de symétrie composée (CS) et autorégressive (ar1) ont fourni les meilleurs modèles pour toutes les variables.

L'analyse des clusters (PROC FASCLUS de SAS) a été utilisée pour identifier les sous-populations de spermatozoïdes basé sur huit variables générées par le CASA (VCL, VSL, VAP, LIN, STR, WOB, ALH et BCF). L'examen de la normalité de ces variable a été réalisée à l'aide de PROC UNIVARIATE (test de Shapiro-Wilk) et si la variable ne représente pas une distribution normale une transformation à base de racine carré et les logarithmes de base 10 après addition de la valeur 1 est conduite. Le nombre de sous-populations a été déterminé en fonction du pseudo  $\tau^2$ , du pseudo-F et du critère de groupement cubique (CCC).

Pour évaluer l'effet de l'échantillon selon les groupes NEC, BHB et AGNE sur la répartition de trois sous-populations, les données ont été analysées en tant que variables ordinales répétées (5 min, 30 min et 3 h). Ainsi, un modèle multinomial répété à effets mixtes (SP1 et SP2 vs. SP3) et binomial (SP1 contre SP2) a été effectué avec PROC GENMOD (SAS Inst. Inc.) par des équations d'estimation généralisées (GEE). Dans ces modèles, chaque sous-population a été définie comme une réponse avec SP1 = 1, SP2 = 2 et SP3 = 3. Dans un premier temps, une distribution multinomiale (SP1, SP2 et SP3) et une fonction logit cumulative (cumlogit) ont été utilisées pour comparer les probabilités de SP 1 et 2 par rapport à SP3 (en tant que référence) et une fonction logit de la probabilité de la distribution SP2 par rapport à SP1(en tant que référence).

### 4.3. Résultats

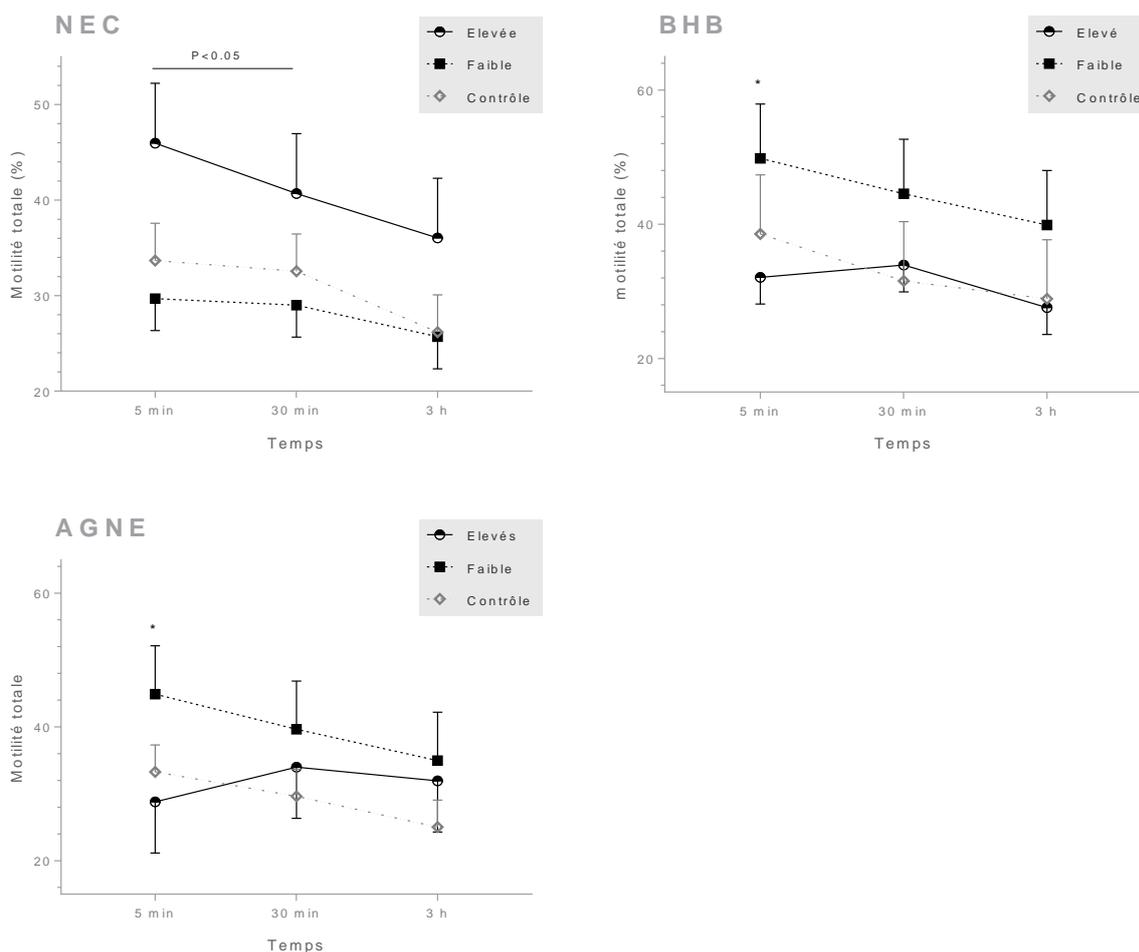
#### 4.3.1. Effet sur la motilité totale des spermatozoïdes

La motilité totale des spermatozoïdes a été fortement influencée par les niveaux de NEC, BHB et AGNE. La motilité spermatique est significativement ( $P = 0,04$ ) élevée dans les médias contenant des plasmas ayant des NEC élevées et faible en AGNE et en BHB (figure 12). Aucune différence significative n'est observée entre le contrôle et les médias contenant des plasmas avec des concentrations faibles ou élevées en AGNE et BHB. Il n'existe ainsi aucun changement significatif de la motilité globale des spermatozoïdes ni dans le temps, ni dans l'interaction groupe et temps (tableau 13).

**Table 13** : Comparaison des moyennes de moindres carrés (MMC) et des erreurs-type (ET) du pourcentage de sperme mobile entre les groupes NEC, BHB et AGNE (élevé, faible et Contrôle) à 5, 30 minutes et 3 heures d'incubation.

paramètres		Temps			ET*	P		
		5 min	30 min	3 h		Groupe	Temps	G*T
<b>NEC</b>	Elevée	<b>45.96<sub>a</sub></b>	<b>40.69<sub>a</sub></b>	36.03	6.26	0.04	0.07	0.90
	Faible	<b>29.69<sub>b</sub></b>	<b>29.00<sub>b</sub></b>	25.69	3.35			
	Contrôle	<b>33.66<sub>ab</sub></b>	<b>32.55<sub>ab</sub></b>	26.17	3.91			
<b>BHB</b>	Elevés	<b>32.11<sub>a</sub></b>	33.93	27.58	3.99	0.03	0.24	0.88
	Faibles	<b>49.82<sub>b</sub></b>	44.56	39.89	8.12			
	Contrôle	<b>38.56<sub>ab</sub></b>	31.57	28.89	8.82			
<b>AGNE</b>	Elevés	<b>28.81<sub>a</sub></b>	33.99	31.95	7.65	0.04	0.41	0.80
	Faibles	<b>44.91<sub>b</sub></b>	39.65	34.98	7.23			
	Contrôle	<b>33.28<sub>ab</sub></b>	29.64	25.03	4.03			

\*Erreur type



**Figure 12 :** Motilité spermatisque (%) (MMC  $\pm$  ET) à 5, 30 minutes et 3 heures d'incubation pour la NEC, le BHB et les AGNE.

#### 4.3.2. Description des sous-populations de spermatozoïdes

La procédure FASTCLUS a permis de détecter trois sous-populations de spermatozoïdes motiles à partir des données cinématiques obtenues par le CASA. Les statistiques résumées de ces sous-populations sont présentées dans le tableau 14 et les interprétations qualitatives de ces données sont les suivantes:

4.3.2.1. La sous-population 1 (SP1) représente les spermatozoïdes à vitesses moyennes (VCL, VSL et VAP), et la rectitude (STR), la linéarité (LIN), ALH et le BCF relativement faibles comparativement aux sous-populations 2. Cependant, les valeurs de WOB ont été similaires à la sous-population 2 ( $P > 0,05$ ). Cette sous-population comprenait 32,74% de la population totale.

4.3.2.2. La sous-population 2 (SP2) est la moins abondante, représentant 9,91% de la population totale. Cette sous-population regroupait les spermatozoïdes rapides et

progressifs avec des valeurs élevées en VCL, VSL, LIN et STR (les spermatozoïdes de ce groupe avaient également des trajectoires évasées avec des valeurs d'ALH et BCF élevées). Elle est considérée comme étant la meilleure sous-population.

4.3.2.3. La sous-population 3 (SP3) était la plus abondante, elle est constituée de 57,35% de la population totale, les spermatozoïdes de cette sous-population sont peu mobiles et non progressifs. Cette sous-population a montré les plus faibles valeurs de VCL, VSL, VAP, LIN et STR et avec des trajectoires non évasées (faibles ALH et BCF).

**Tableau 14** : Moyennes ( $\pm$  erreur type) des paramètres cinématiques définissant les trois sous-populations (SP1, SP2 et SP3) identifiées dans les échantillons de sperme post-décongelé de taureau.

Paramètres cinématiques	Sous-population		
	SP 1	SP2	SP3
n (%)	3141 (32.74)	949 (9.91)	5514 (57.35)
VCL ( $\mu\text{m/s}$ )	138.73 $\pm$ 0.98a	232.19 $\pm$ 2.06b	45.07 $\pm$ 0.40 c
VSL ( $\mu\text{m/s}$ )	40.813 $\pm$ 0.28a	78.248 $\pm$ 0.88b	12.118 $\pm$ 0.12c
VAP ( $\mu\text{m/s}$ )	69.349 $\pm$ 0.29a	121.819 $\pm$ 0.86b	22.498 $\pm$ 0.15c
LIN (%)	0.34 $\pm$ 0.003a	0.36 $\pm$ 0.005b	0.31 $\pm$ 0.003c
STR (%)	0.61 $\pm$ 0.004a	0.66 $\pm$ 0.006b	0.47 $\pm$ 0.004c
WOB (%)	0.54 $\pm$ 0.002a	0.54 $\pm$ 0.003a	0.59 $\pm$ 0.003b
ALH ( $\mu\text{m}$ )	3.696 $\pm$ 0.026a	5.691 $\pm$ 0.052b	1.512 $\pm$ 0.011c
BCF(Hz)	11.409 $\pm$ 0.096a	13.358 $\pm$ 0.2b	4.424 $\pm$ 0.055c

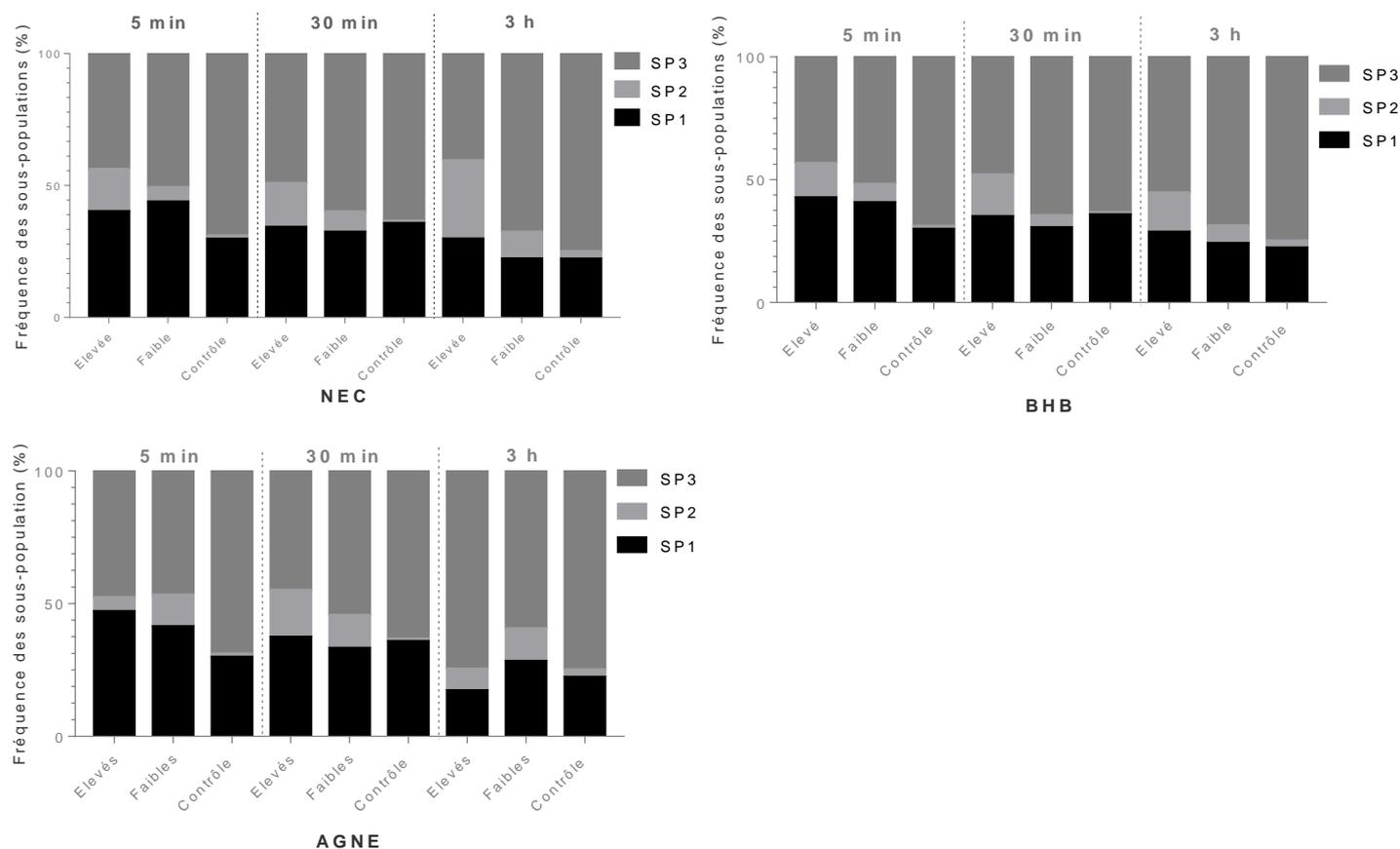
Différentes lettres (a, b et c) indiquent des différences significatives entre les sous-populations (P <0,05).

#### 4.3.3. Répartition des sous-populations par rapport aux niveaux des NEC, du BHB, des AGNE et du groupe contrôle

Comme le montre clairement la Figure 13, la répartition des trois sous-populations est affectée par les différentes catégories de médias (élevé, faible et contrôle). Les sous-populations variaient dans un intervalle large entre les groupes tandis qu'elles variaient dans un intervalle étroit entre les temps.

##### 4.3.3.1. SP1 et 2 versus SP3

Les résultats de modèles multinomiaux incluant toutes les sous-populations sont indiquées dans le tableau 15. SP1 et SP2 semblent augmenter au détriment de SP3 de 1,33 à 1,79 fois (OR = 2,33, 2,65 et 2,79,  $P < 0,0001$ ) dans les médias contenant des plasmas par rapport au contrôle et de même pour les catégories élevées et faibles par rapport au contrôle. En ce qui concerne la comparaison entre les catégories et le contrôle, les odds ration 'OR' nous montrent un effet de la NEC, du BHB élevés et des AGNE faibles sur les occurrences de SP1 et SP2 au détriment de SP3 et par rapport au groupe contrôle. Cependant, ces différences ne sont pas évidentes lorsqu'on compare les groupes de NEC, BHB faibles, et AGNE élevés par rapport le groupe contrôle ( $p > 0,05$ ). En ce qui concerne la comparaison entre les catégories de NEC, BHB et AGNE, nous n'avons observé aucune différence significative entre les catégories élevées et faible pour l'apparition de SP1 et 2 par rapport à SP3.



**Figure 13 :** Répartition des fréquences relatives (%) des spermatozoïdes mobiles, classés comme sous-population SP1, SP2 ou SP3 dans différents milieux plasmatiques selon les niveaux élevés et faibles de NEC, BHB et AGNE et le groupe contrôle à 5, 30 minutes et 3 heures.

**Table 15 :** Effet des catégories de la NEC, du BHB, des AGNE et du contrôle sur la probabilité d'apparition des sous-populations de spermatozoïdes (SP1 et SP2 vs. SP3)

Facteur	Valeur	Estimation	ET*	OR	95% IC	P
<b>NEC</b>	Elevée et faible vs. Contrôle	1.02	0.39	2.79	1.27-6.09	0.01
	Elevée vs. faible	0.27	0.24	1.31	0.81-2.10	0.26
	Elevée vs. Contrôle	0.64	0.25	1.91	1.16-3.14	0.01
	faible vs. Contrôle	0.37	0.21	1.45	0.96-2.20	0.07
<b>BHB</b>	Elevé and faible vs. Contrôle	0.97	0.37	2.65	1.26-5.57	0.01
	Elevé vs. faible	0.41	0.21	1.51	0.98-2.32	0.05
	Elevé vs. Contrôle	0.69	0.24	2.00	1.23-3.24	0.004
	faible vs. Contrôle	0.28	0.18	1.32	0.91-1.90	0.13
<b>AGNE</b>	Elevés and faibles vs. Contrôle	0.85	0.42	2.33	1.02-5.33	0.04
	Elevés vs. faibles	-0.27	0.28	0.75	0.43-1.32	0.32
	Elevés vs. Contrôle	0.28	0.28	1.33	0.76-2.31	0.31
	faibles vs. Contrôle	0.56	0.22	1.75	1.13-2.70	0.01

\*Erreur type

#### 4.3.3.2. SP2 versus SP1

Comme le montre le tableau 16, SP2 semble augmenter au désavantage de SP1 de 15,19 à 18,06 fois (OR = 17,68, 16,19 et 19,06;  $P < 0,0001$ ) dans les médias contenant du plasma par rapport au contrôle. En ce qui concerne la comparaison entre les catégories et le contrôle, des différences significatives de probabilité d'avoir SP2 ont été observées entre les catégories élevées et faibles par rapport au contrôle. En comparant les occurrences SP2 au détriment de SP1 entre les catégories, nous avons observé une tendance à une augmentation de SP2 de 57% (OR = 1,57,  $p = 0,04$ ) dans des milieux contenant du plasma provenant de vaches ayant une NEC élevée comparé à une NEC faible. Cette sous-population est plus importante de 72% (OR = 1,72,  $p = 0,01$ ) dans des milieux contenant du plasma provenant de vaches avec BHB élevé par rapport à des BHB faibles. Ces différences ne sont pas évidentes en comparant les médias contenant du plasma provenant de vaches ayant des AGNE élevés et faibles ( $p = 0,63$ ).

**Table 16** : Effet des catégories NEC, BHB, AGNE et du contrôle sur la probabilité d'apparition des sous-populations de spermatozoïdes (SP1 vs. SP2)

Facteurs	Valeur	Estimation	ET*	OR	95% IC	P
<b>NEC</b>	Elevée et faible vs. Contrôle	2.87	0.64	17.68	4.97-62.84	<0.0001
	Elevée vs. faible	0.45	0.22	1.57	1.01-2.45	0.04
	Elevée vs. Contrôle	1.66	0.34	5.28	2.67-10.41	<0.0001
	faible vs. Contrôle	1.20	0.33	3.34	1.72-6.50	0.0004
<b>BHB</b>	Elevé et faible vs. Contrôle	2.78	0.65	16.19	4.53-57.91	<0.0001
	Elevé vs. faible	0.54	0.23	1.72	1.09-2.73	0.01
	Elevé vs. Contrôle	1.66	0.34	5.29	2.71-10.32	<0.0001
	faible vs. Contrôle	1.11	0.34	3.06	1.54- 6.07	0.001
<b>AGNE</b>	Elevés et faibles vs. Contrôle	2.94	0.68	19.06	5.02-72.28	<0.0001
	Elevés vs. faibles	-0.08	0.30	0.91	0.50-1.67	0.77
	Elevés vs. Contrôle	1.42	0.39	4.17	1.92-9.05	0.0003
	faibles vs. Contrôle	1.51	0.35	4.56	2.29-9.06	<0.0001

\*Erreur type

#### 4.4. Discussion

La motilité est considérée comme un paramètre important pour l'évaluation de la qualité du sperme congelé-décongelé chez les bovins [316] en raison de son impact sur la fertilité masculine et la réussite de l'insémination artificielle [317]. Cependant, la motilité et les paramètres cinématiques ne peuvent être considérés comme une indication solide de la capacité de fertilisation sans la prise en considération de leur interaction avec les microenvironnements dans lesquels ils se déplacent [302].

Au cours des deux dernières décennies, le CASA est largement accepté comme fournissant une mesure rapide et objective des paramètres cinématiques individuels du sperme [316, 318] dans de grands ensembles de données avec des distributions multinomiales ou binomiales en relation avec la présence des sous-populations discrètes de spermatozoïdes [319]. Des études antérieures soutiennent que la définition des sous-populations avant l'analyse statistique reste plus puissante que les approches classiques qui considèrent une seule population globale [319, 320]. La présence de sous-populations distinctes de spermatozoïdes mobiles suggère que c'est une conséquence attendue de l'interaction entre le sperme et son microenvironnement [321]. Dans la présente étude il ressort, d'après des résultats de la motilité individuelle, différentes sous-populations qui peuvent représenter les spermatozoïdes dans différentes catégories en fonction de leurs états physiologiques comme signalé par Abaigar et al [322]. Des résultats similaires ont été rapportés par Rubio-guillènet al [323] et Naït Mouloud et al [304]. Sur les trois sous-populations, SP2 représente la plus faible proportion de spermatozoïdes (moins de 10%) quel que soit le milieu d'activation. Cette sous-population se caractérise par une vitesse et une rectitude globales élevées. La sous-population 3 représente une forte proportion de spermatozoïdes avec une faible vitesse globale et une faible rectitude. Quant à la sous-population 1, elle est caractérisée par une vitesse globale intermédiaire et une rectitude moyenne (tableau 14). Ainsi, la SP 2 représente les spermatozoïdes les plus rapides et les plus progressifs et est considérée comme la meilleure. De nombreux auteurs suggèrent que la SP2 est la plus appropriée pour faire partie de la population fécondante [323, 324, 325].

Dans l'étude actuelle, la motilité globale était plus élevée dans les milieux contenant du plasma obtenu à partir de vaches ayant une NEC élevée comparativement à la catégorie faible. La mobilité est également plus faible dans les milieux contenant du BHB et des AGNE élevés. Ces résultats d'impact sur la motilité spermatique sont

en accord avec ceux rapportés pour la fertilité et les corrélations positives de cette dernière avec les NEC élevées [309, 311, 312], et négatives avec les taux élevés en BHB et AGNE [7, 32, 198, 281]. Ceci suggère qu'une partie de la faible fertilité post-partum liée à l'altération métabolique de l'oviducte [258] et de l'utérus [326] affecte en retour la motilité spermatique. Les résultats n'ont montré aucune différence significative entre les catégories élevées et le contrôle d'une part, et entre les catégories faibles et le contrôle d'autre part.

Pendant les premiers mois de lactation, les vaches sont dans un bilan énergétique négatif (NEB), ce qui provoque une mobilisation excessive des lipides avec une libération d'une quantité importante en AGNE [49]. Les AGNE libérés sont repris par le foie, où ils peuvent être oxydés complètement pour fournir de l'énergie ou partiellement pour produire les corps cétoniques et notamment le BHB [330] qui sont transportés pour être utilisés ailleurs dans le corps [279]. Cela implique que les environnements, utérin et oviductale, peuvent être modifiés par des troubles métaboliques affectant en conséquence la motilité spermatique. Dans un contexte similaire, Kamalakannan et al [331] ont signalé que la faible fertilité associée à l'acidocétose diabétique des femmes suggère certainement un environnement intra-utérin hostile. D'autres études ont montré que lorsque le BHB est administré aux brebis gestantes, ce dernier est retrouvé au niveau utérin [260]. En outre, il existe des preuves qu'une perte excessive de NEC au début de la lactation est associée au stress oxydatif [278, 232, 333]. La genèse de ces espèces oxygénées activées (EOA) peut être augmentée au cours de cette période [334, 335] qui peuvent se retrouver au niveau utérin [334]. Des études récentes ont montré que les EOA peuvent contribuer à des lésions membranaires et de l'ADN [336] du sperme humain et de la souris [337] affectant en conséquence la motilité totale des spermatozoïdes [337, 338].

Les résultats de cette étude ont montré qu'il existe plus de probabilités d'avoir SP1 et SP2 à au détriment de SP3 en situation d'une NEC élevée et de faibles concentrations en AGNE. La SP2, qui regroupe les spermatozoïdes rapides et vigoureux, est plus élevée de 57% ( $p = 0,04$ ) que les SP1 dans les plasmas de vaches avec une NEC élevée.

Les résultats ont montré également que la SP2 est augmentée de 72% ( $p = 0,01$ ) dans les sérum avec un BHB élevé, ceci a été rapporté antérieurement où il a été montré que les spermatozoïdes épидидymaires bovins ont la capacité de diminuer la consommation d'oxygène tout en augmentant leur motilité dans les milieux contenant

du BHB [264]. Plus récemment, Takei et al [339] ont indiqué que le sperme de souris maintenait une motilité vigoureuse pendant plus de 60 minutes en présence du BHB. Endo et al [234] ont indiqué, également, que le taux de pénétration du sperme dans les médias contenant des concentrations élevées en BHB est significativement plus élevé comparé aux médias contenant un BHB faible ou nul.

Les spermatozoïdes de mammifères doivent métaboliser les substrats énergétiques extracellulaires pour produire de l'ATP pendant une longue période pour accomplir la fécondation [341, 342]. Chez le coq, une différence entre les spermatozoïdes qui présentent une motilité élevée ou faible est attribuée à des différences phénotypiques dans les taux de synthèse de l'ATP [343]. Dans ce contexte, il est signalé que les corps cétoniques améliorent l'efficacité métabolique en augmentant la synthèse de l'ATP dans des modèles animaux [344]. Cette augmentation de l'efficacité métabolique a fait l'objet d'études approfondies dans le sperme de bélier par O'Shea et Voglmayr [345].

#### 4.5. Conclusion

L'incubation du sperme de taureau décongelé avec des plasmas provenant de vaches ayant différents statuts énergétiques a montré que la motilité globale est influencée par l'état métabolique des milieux. Cette motilité est améliorée dans les milieux provenant de vaches ayant une NEC élevée et reste altérée dans les milieux ayant des concentrations élevées en BHB et en AGNE. De même, la rapidité et la vigueur des spermatozoïdes sont meilleures dans les milieux contenant du plasma provenant de vaches avec une NEC et un BHB élevés. Les résultats de l'étude actuelle étayent l'hypothèse selon laquelle une partie de la faible fertilité post-partum des vaches laitières peut être liée à un impact de milieu utérin sur la qualité du sperme après insémination artificielle.

## DISCUSSION GENERALE

Cette étude vise à explorer l'impact de l'état alimentaire des vaches laitières, matérialisé à travers la NEC et les troubles métaboliques qui l'accompagne, notamment les AGNE et le BHB. Ainsi, les principaux objectifs poursuivis dans cette étude se sont concentrés sur l'évaluation des effets des AGNE et du BHB sur les occurrences des troubles liés à la reproduction et les performances de la reproduction, notamment la cyclicité ovarienne et la réussite d'IA-1. L'accent a été mis sur l'effet séparé ou combiné de ces bio-marqueurs.

Comme il a été rapporté dans le chapitre 1, la détection des AGNE et du BHB à un certain taux chez une vache au début de lactation peut être considéré comme physiologique. Ces deux bio-marqueurs font partie d'un processus biologique de l'adaptation de la vache face à une énorme demande de l'énergie au niveau mamelle afin d'exprimer son potentiel génétique. Cependant, l'élévation de ces deux bio-marqueurs au-delà de certains seuils est un indicateur d'une mauvaise adaptation de la vache au début de la lactation [45, 48, 136]. Les seuils de ces bio-marqueurs sont définis par rapport aux performances de la vache [28] et sont considérés comme élevés quand ils dépassent généralement 0.7 Mmol/L [24] et 1.2 Mmol/L [28] pour le BHB et les AGNE, respectivement. Dans la littérature récente, plusieurs études ont montré une relation négative entre des taux élevés au péri-partum de ces bio-marqueurs et la cyclicité ovarienne [4, 198], la réussite d'IA-1 [7, 10, 198], l'intervalle vêlage-insémination fécondante [7, 10], les endométrites [6, 10, 31, 268, 273] et la rétention placentaire [271, 274, 273]. La considération des résultats de ces études dans une méta-analyse conduite dans le chapitre 2 a révélé que des taux élevés en AGNE et en BHB au péri-partum ont réduit la chance de cyclicité ovarienne par 12%, augmenté l'intervalle vêlage-insémination fécondante, augmenté le risque d'endométrites par 91% et la rétention placentaire par 47 %, signes d'une altération de l'environnement utérin, notamment pour les deux derniers troubles (endométrites, rétention placentaire). Deux paramètres ont été soumis à une méta-régression et qui ont montré une diminution de l'hétérogénéité inter ou intra-études. Ces deux paramètres sont la cyclicité ovarienne et la réussite d'IA-1, ainsi, les vaches qui ont des taux élevés en BHBA et AGNE durant la première ou la deuxième semaine postpartum (l'une ou l'autre semaine) ont un taux réduit de CO par rapport à celles

ayant des taux élevés uniquement durant une semaine ( $P < 0.0001$ ). Cela montre que la fréquence d'échantillonnages (une seule fois seulement) peut sous-estimer le risque sur la CO. Ceci met l'accent sur la nécessité d'une recherche sur l'effet d'ampleur et la durée de l'hyper-acétonémie sur les performances de reproduction en considérant l'exposition cumulative à des taux élevés en BHB et AGNE.

L'utilisation du modérateur 'test' (c'est-à-dire BHB ou AGNE) a réduit l'hétérogénéité de 17%. Ainsi, les vaches ayant un taux élevé en AGNE ont moins de chance de concevoir à la première insémination de 30 % par rapport à celles ayant un taux élevé en BHB ( $OR = 0.69$ ,  $p < 0.001$ ) signifiant que le niveau de l'intervention de ces deux biomarqueurs est différent. En effet, une étude récente a montré une faible corrélation entre les concentrations en AGNE et de BHB [33]. Néanmoins, plusieurs auteurs considèrent que l'élévation de l'un de ces bio-marqueurs est un indicateur de CSC et du BEN [4, 24, 32], même si plusieurs études ont montré que des taux élevés en AGNE au post-partum sont plus liés à un grand risque pour TR-1IA que des taux élevés en BHB [24, 4, 198, 276]. Dans le chapitre 3 nous avons exploré les effets combinés ou séparés des taux élevés en AGNE et BHB sur la CO et la réussite d'IA-1 tout en les reliant à la NEC et à d'autres métabolites énergétiques, protéiques et minéraux. Nous avons constaté que le fait de considérer un taux élevé en AGNE comme prédicteur de la cétose sub-clinique, peut surestimer les résultats. Contrairement, en considérant un taux élevé en BHB comme prédicteur pour le BEN peut sous-estimer les résultats. Les résultats ont ainsi montré que les vaches qui ont une cétose sub-clinique ont plus de probabilités d'avoir des taux élevés en AGNE. Cependant, les vaches en BEN n'ont pas obligatoirement des taux élevés en BHB. Les vaches céto-siques ont été caractérisées par des taux élevés en AST, ALT et en urée par rapport à celles en BEN. Toutefois, les vaches en BEN (AGNE élevés) et céto-siques (BHB élevé) ont des taux élevés en cholestérol et en triglycérides par rapport aux vaches saines. Par définition, la cétose de type II "maladie de la vache grasse" est caractérisée par une altération du fonctionnement hépatique dû à l'accumulation excessive de triglycérides au niveau du foie "stéatose hépatique". Selon le plan biochimique, des taux élevés en AGNE, BHB, AST, ALT et de faibles glycémies [6] sont considérés comme des marqueurs de stéatose hépatique. Dans nos résultats, nous n'avons trouvé aucune différence entre les vaches (vaches saines vs. Vaches ayant des taux élevés en BHB) en fonction des taux glycémiques. Ceci pourrait être lié à la variation de la glycémie chez les ruminants. Le taux sanguin de glucose est affecté par plusieurs facteurs et il est, en

effet, un paramètre instable chez les ruminants [43]. Conformément à la littérature, nous avons constaté que les vaches ayant une NEC excessive au vêlage ont des taux élevés en BHB par rapport à celles ayant un taux élevé en AGNE ou les vaches saines. Toutefois, nous n'avons constaté aucune différence significative pour la perte de NEC entre les vaches cétosiques et les vaches ayant un taux élevé en AGNE. Cela signifie que les deux catégories de vaches ont mobilisé presque la même quantité en AGNE mais que les foies des "vaches grasses" n'ont pas réussi à métaboliser la grande quantité en AGNE mobilisés. Des études récentes ont essayé d'expliquer la prédisposition des vaches grasses à la stéatose hépatique et ont montré une corrélation entre une NEC excessive au vêlage et une amplification des voies pro-inflammatoires hépatiques [215, 296, 364]. À l'instar de la stéatose hépatique non alcoolique (NASH) chez l'homme 'obèse', les vaches grasses sont prédisposées à la stéatose hépatique par une quantité d'insuline importante. Chez l'homme, après plusieurs années d'évolution, la capacité sécrétrice du pancréas s'épuise en diminuant le taux d'insulinémie [347].

Dans le chapitre 3, nous avons constaté que les vaches cétosiques et les vaches ayant des taux élevés en AGNE ont une faible chance de concevoir à la première insémination par rapport aux vaches saines avec une réduction de 35 % ( $p=0.001$ ) et 5 % ( $p=0.006$ ), respectivement. Ces résultats sont différents de ceux rapportés au chapitre 1 où nous avons enregistré une plus faible réussite d'IA-1 chez les vaches ayant des taux élevés en AGNE par rapport des vaches cétosiques. Ceci peut être expliqué par le fait que dans le chapitre 3, les vaches cétosiques ont à la fois des taux élevés en BHB et en AGNE. Aucune différence n'est observée entre les vaches cétosiques et les vaches ayant des taux élevés en AGNE.

Au cours de cette dernière décennie, plusieurs travaux sont consacrés sur les taux élevés en BHB et en AGNE et leurs associations avec les performances de la vache au péri-partum. Dans plusieurs de ces travaux, la démarche conceptuelle des auteurs est fondée sur la relation existant entre ces bio-marqueurs et le BEN [7, 24, 28, 10, 273, 198]. D'autres approches consistaient sur l'étude des relations existant entre ces bio-marqueurs et le CSC [30, 29, 32, 127]. Toutefois, tous les auteurs sont unanimes que l'élévation de ces bio-marqueurs est issue d'une mauvaise adaptation biologique de la vache au péri-partum. Cette mal-adaptation suggère la mobilisation des réserves graisseuses avec une libération d'une quantité considérable en AGNE. Le foie prend

en charge une bonne partie de ces AGNE et les traite en 4 voies majeures : **1)** en les transformant en énergie, **2)** en corps cétoniques, **3)** en les recyclant en VLDL ou **4)** en les stockant sous forme de triglycérides. Néanmoins, lorsque le foie est 'inondé' par les AGNE, ces capacités enzymatiques d'une part, et les ressources glucoformatrices d'autre part, seront dépassées, et il ne restera alors que les voies **3** et **4** pour le métabolisme des AGNE avec production d'une quantité importante de BHB et/ou de triglycérides. Ainsi, une élévation en AGNE seuls reflète une mauvaise adaptation au BEN, alors qu'une élévation simultanée des AGNE et BHB reflète une mauvaise adaptation au BEN et une incapacité hépatique.

L'altération de l'état corporel avec l'élévation de ses bio-marqueurs au post-partum et leur association avec les performances de reproduction a fait l'objet de plusieurs études. Les auteurs ont montré l'effet des taux élevés en AGNE et BHB sur la sécrétion hormonale, la qualité ovocytaire et le développement embryonnaire [241, 35, 13, 232, 233, 207, 298]. Cependant l'impact, sur la qualité du sperme, de l'état alimentaire de la vache via ses altérations biochimiques reste à ce jour non exploré. Dans le chapitre 4 nous avons exploré cette éventualité en étudiant l'impact de plasmas de vaches ayant des NEC différentes sur la qualité du sperme. Cela, est considéré comme une simulation du comportement des gamètes une fois dans les voies génitales femelles. Les effets sur la mobilité spermatique sont similaires à ceux de la fertilité de la vache au post-partum. En effet la réussite de IA-1 reste plus faible chez les vache ayant des taux élevés en BHB/AGNE (chapitre 2 et 3) et de faible NEC [309, 311, 312], résultats complètement identiques à ceux de la mobilité spermatique avec de faibles valeurs chez les vaches ayant une NEC faible et des BHB/AGNE élevés au moment de la première insémination. Ainsi, une partie des faibles réussites d'IA-1 serait liée à un effet direct sur les spermatozoïdes dans l'environnement utérin. Cependant, des taux élevés en BHB ont affecté positivement la rapidité et vigueur des spermatozoïdes. Ceci peut être expliqué par la capacité des spermatozoïdes à diminuer la consommation d'oxygène tout en augmentant la motilité dans les milieux contenant BHB comme révélé dans la littérature (Lardy et al cité par [234, 264, 339]).

## CONCLUSION GENERALE ET RECOMMANDATIONS

L'objet global du présent travail était d'explorer l'impact de l'état alimentaire, matérialisé par des altérations biochimiques, essentiellement AGNE et BHB, sur les performances de reproduction dans la spéculation laitière. L'ensemble des résultats, aussi bien ceux menés sur la femelle que ceux menés sur la qualité des spermatozoïdes, ont révélé que:

- 1) La considération du seul BHB au post-partum comme prédicteur de vaches avec BEN peut sous-estimer les résultats, alors que les AGNE seuls peuvent les surestimer.
- 2) Les taux élevés en BHB sont à l'origine de l'augmentation des concentrations plasmatiques de cholestérol, triglycérides, AST, ALT et l'urée, indicateurs d'une atteinte hépatique. Des taux élevés en AGNE restent néanmoins non-associés à ces métabolites.
- 3) Une NEC excessive au vêlage est à l'origine de l'augmentation à la fois des concentrations en AGNE et en BHB et expose les vaches à la stéatose hépatique.
- 4) Des taux élevés en AGNE et BHB au post-partum sont associés à la réduction de la réussite d'IA, mais avec une meilleure association des AGNE. Ces deux bio-marqueurs sont également associés à une diminution de la cyclicité ovarienne. Cependant, une analyse au lieu de deux (deux semaines successives) pourrait sous-estimer les résultats.
- 5) Des taux élevés en AGNE et BHB durant la période de transition sont associés à la santé utérine en augmentant le risque d'endométrites et de rétention placentaire.
- 6) Une partie de la faible réussite d'IA-1 serait liée à des impacts directs sur la cellule spermatique une fois dans les voies génitales femelles.

Ainsi les faibles NEC et en conséquence les concentrations élevées en AGNE et BHB représentent un risque au niveau des élevages laitiers affectant à terme la rentabilité économique. Une stratégie de dépistage, d'intervention et de prévention s'avère indispensable à l'échelle individuelle et à l'échelle de troupeau, nous préconisons ci-

après des perspectives et recommandations à considérer pour une meilleure prise en charge des élevages laitiers :

Les vaches grasses au vêlage, hautes productrices sont susceptibles de présenter un BEN et/ou une CSC. Identifier ces vaches est, donc, un premier pas vers une gestion efficace. Ainsi, réaliser des mesures de BHB en utilisant des méthodes semi-quantitative ou quantitative disponibles dans le marché humain est fortement recommandé. Le coût et la difficulté de dosage des AGNE au niveau du troupeau imposent le développement d'un dispositif basé sur les systèmes. Des programmes de suivi et de gestion de la période de transition peuvent utilement inclure les concentrations en AGNE durant la semaine précédant le vêlage et le BHB et les AGNE durant les premières semaines après vêlage.

## PERSPECTIVES

Vue les résultats de ce présent travail et notamment les résultats de chapitre 2 et 4, nous proposons comme perspectives :

- 1) Des enquêtes exhaustives pourront être menées pour évaluer la dynamique et les facteurs de risque de NEB et CSC dans nos élevages. Il faudrait pour cela partir d'une base de données établie en collaboration avec les éleveurs et certains établissements (ONIL, DSA ...etc.) qui nous permettrait d'aboutir à un plan d'analyse complet;
- 2) Développement d'un dispositif de dosage des AGNE et qui peut être utilisé 'au chevet de la vache'. Pour ce faire, il suffit d'établir une collaboration entre les laboratoires faisant l'électronique, microfluidiques et bien sûr un laboratoire vétérinaire ;
- 3) A l'instar de syndrome des ovaires poly kystiques 'OPK' très répandue chez les femmes diabétiques. Il conviendrait, donc, de faire des études approfondies en évaluant les effets des taux élevés en BHB sur l'occurrence des kystes ovariens chez les vaches laitières au post-partum ;
- 4) Faire des études in vitro sur les effets des taux élevés en AGNE et BHB sur la motilité spermatique et le pouvoir fécondant des spermatozoïdes en évitant toutes autres interactions biologiques qui peut être produites avec le plasma;
- 5) Faire une méta-analyse sur l'efficacité thérapeutique de certains produits utilisés dans le traitement des cétooses et qui représentent une variation importante de leur efficacité dans plusieurs travaux.

## APPENDICE A

### LISTE D'ABREVIATION

- %** : pourcent ;  
**+LR** : positive likelihood ratio.  
**°C** : degré Celsius;  
**ABHD5** : Alpha-beta hydrolase domain-containing 5;  
**Ac** : Acétone ;  
**AcAc** : Acéto-acétate;  
**ACAT** : Acetyl-CoA acetyl transferase;  
**ACC1** : acetyl-CoA carboxylase1;  
**Acétyl-CoA** : acétyl-coenzyme A ;  
**ACS** : Acyl-CoA Synthetase ;  
**ADN** : acide désoxyribonucléique ;  
**AGNE** : acides gras non estérifiés  
**AGNE-E** : AGNE-élevés :  
**AGNE-post** : AGNE élevés au post-partum  
**ALH** : Lateral Displacement Of Sperm Head;  
**ALT** : alanine aminotransférase ;  
**AMPK** : adénosine monophosphate kinase;  
**AOPP** : Advanced Oxidised Protein Products;  
**ApoB100** : apolipoprotéine B 100;  
**ar1** : autoregressive de l'ordre 1;  
**AST** : aspartate aminotransférase ;  
**ATGL** : adipose triglyceride lipase;  
**ATP** : adénosine triphosphate;  
**AUC** : Area under ROC curve  
**BDH1** : BHB déshydrogénase 1;  
**BEN** : bilan énergétique négatif ;  
**BHB** :  $\beta$ -hydroxybutyrate ;  
**BHB-E** : BHB élevé  
**BHB-post** : BHB élevé au post-partum ;  
**Ca** : calcium ;  
**CA** : Canada ;  
**CASA** : Computer Assisted Semen Analysis ;  
**CAT** : Acylcarnitine Translocase;  
**CCC** : critère de groupement cubique ;  
**ChREBP** : Carbohydrate Response Element Binding Protein;  
**CNIAAG** : Centre National de l'Insémination Artificielle et de l'Amélioration Génétique ;  
**CO** : cyclicité ovarienne ;  
**Coh** : étude de cohorte ;  
**CPT I** : Carnitine Palmitoyl Transférase I;  
**CPT II** : Carnitine Palmitoyl Transférase II ;  
**CS** : symétrie compose;  
**CSC** : cétose sub-clinique;  
**DEUX** : AGNE et BHB élevés ;  
**dNEC** : perte de la NEC ;  
**DSA** : Direction de Service Agricole ;  
**EOA** : Espèces Oxygénées Activées;  
**Eob** : Étude observationnelle ;  
**ES** : Erreur Standard ;  
**ET** : Ecart-type ;  
**Et** : essai clinique ;  
**EU** : Europe ;  
**FSH** : follicle stimulating hormone;  
**GEE** : équations d'estimation généralisées ;  
**GH** : hormone de croissance (Growth Hormone) ;  
**Glut4** : transporteur de glucose 4;  
**GnRH** : Gonadotropin-releasing hormone;  
**h** : heure  
**HGMCS2** : 3-hydroxy- 3-méthylglutaryl-CoA synthase 2;  
**HMGCL** : 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA lyase;  
**HR** : Hazard Ratio;  
**I<sup>2</sup>** : indice d'hétérogénéité ;  
**IA** : insémination artificielle ;  
**IA1** : première insémination artificielle ;  
**IC 95%** : intervalle de confiance à 95% ;  
**IGF-I** : Insulin-like Growth Factor I;  
**IgM** : Immunoglobuline M ;  
**IL1** : interleukin-1;  
**IL6** : interleukin-6;  
**IV-IAF** : intervalle vêlage- insémination artificielle fécondante;  
**JAVP** : jours avant le vêlage présumé ;  
**JPP** : jours postpartum;  
**K** : Potassium;  
**LH** : luteinising hormone ;

**LHS**: lipase hormono-sensible;  
**LIN**: Linearity ;  
**LPL** : Lipo-Protéine Lipase ;  
**Mg** : Magnésium ;  
**Min**: minute;  
**mmol/L** : millimole/litre ;  
**MSI**: matière sèche totale ingérée  
**Na** : Sodium ;  
**NAD**: nicotinamide adénine dinucléotide;  
**NEC** : Note d'état corporel ;  
**ONIL** : Office National Interprofessionnel du Lait et Produits Laitiers ;  
**OR** : Odds Ratio ;  
**OS**: stress oxydatif;  
**P** : Phosphore ;  
**P4**: progesterone ;  
**PK**: Pyruvate Kinase;  
**PMN**: polymorphonucléaires;  
**PPRA  $\gamma$**  : Peroxisome-Proliferator-Activated- $\gamma$  ;  
**PPRA-  $\alpha$** : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- ;  
**PROC** : procédure ;  
**RE**: réticulum endoplasmique ;  
**ROS**: Reactive Oxygen Species ;  
**RP** : rétention placentaire ;  
**RQUICKI** : Quantitative Insulin Sensitivity Check Index;  
**RR**; Risque Relatif;  
**SAINE**: vaches saines  
**SK** :Corée du Sud ;  
**SNC**: Système Nerveux Central;  
**SP1** : sous-population 1 ;  
**SP2** : sous-population 2 ;  
**SP3** : sous-population 3 ;  
**SPP**: semaines postpartum;  
**SREBP1c**: Sterol Regulatory Element-Binding Protein-1c;  
**STR**: Righteousness movement ;  
**TG**: triglycérides;  
**TNF- $\alpha$** : facteur de nécrose tumorale- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ );  
**TR1IA** : taux de réussite à la première insémination ;  
**US** : États-Unis ;  
**V/V** : Volume : volume ;

**VAP** :Average path velocity;  
**VCL** : Curvilinear velocity;  
**VLDL**: very low density lipoproteins;  
**VSL** :Straight line velocity ;  
**WOB**: Balancing ;  
 **$\gamma$ GT** :  $\gamma$ -glutamyltransférase;  
 **$\chi^2$**  : Q-test de Cochran ;  
 **$\mu$** : microliter;  
 **$\mu$ m** : micromètre.

## LA LISTE DES REFERENCES

1. Dobson, H., Smith, R. F., Knight, C. H., Sheldon, I. M., "The High-producing Dairy Cow and its Reproductive Performance Defining the Problem with respect to Milk Yield", *Reproduction in domestic animals*, vol. 42 (Suppl.2), (2007), 17–23.
2. Silvia, W. J., "Addressing the decline in reproductive performance of lactating dairy cows: a researcher's perspective", *Vet. Sci. Tomorrow*, vol. 3 (May), (2003), 1–5.
3. Esposito, G., Irons, P. C., Webb, E. C., Chapwanya, A., "Interactions between negative energy balance, metabolic diseases, uterine health and immune response in transition dairy cows", *Animal Reproduction Science*, vol. 144 (3–4), (2014), 60–97.
4. Dubuc, J., Duffield, T. F. F., Leslie, K. E. E., Walton, J. S. S., LeBlanc, S. J. J., "Risk factors and effects of postpartum anovulation in dairy cows", *Journal of Dairy Science*, vol. 95, no 4, (2012), 1845–1854.
5. Ribeiro, E. S., Lima, F. S., Greco, L. F., Bisinotto, R. S., Monteiro, A. P. A., Favoreto, M., Ayres, H., Marsola, R. S., Martinez, N., Thatcher, W. W., Santos, J. E. P., "Prevalence of periparturient diseases and effects on fertility of seasonally calving grazing dairy cows supplemented with concentrates", *Journal of Dairy Science*, vol. 96, no 1, (2013), 1–16.
6. Shin, E. K., Jeong, J. K., Choi, I. S., Kang, H. G., Hur, T. Y., Jung, Y. H., Kim, I. H., "Relationships among ketosis, serum metabolites, body condition, and reproductive outcomes in dairy cows", *Theriogenology*, vol. 84, no 2, (2015), 252–260.
7. Walsh, R. B., Walton, J. S., Kelton, D. F., LeBlanc, S. J., Leslie, K. E., Duffield, T. F., "The effect of subclinical ketosis in early lactation on reproductive performance of postpartum dairy cows", *Journal of dairy science*, vol. 90, no 6, (2007), 2788–2796.
8. Ospina, P. A., Nydam, D. V, Stokol, T., Overton, T. R., "Evaluation of nonesterified fatty acids and  $\beta$ -hydroxybutyrate in transition dairy cattle in the northeastern United States: Critical thresholds for prediction of clinical diseases", *Journal of Dairy Science*, vol. 93, no 2, (2010), 546–554.
9. Chapinal, N., Carson, M. E., Leblanc, S. J., Leslie, K. E., Godden, S., Capel, M., Santos, J. E. P., "The association of serum metabolites in the transition period with milk production and early-lactation reproductive performance", *Journal of Dairy Science*, vol. 95, no 3, (2012), 1301–1309.
10. McArt, J. A. A., Nydam, D. V., Oetzel, G. R., "Epidemiology of subclinical ketosis in early lactation dairy cattle", *Journal of dairy science*, vol. 95, no 9, (2012), 5056–5066.
11. Grohn Y.T., Rajala-Schultz, P. J., "Epidemiology of reproductive performance in dairy cows", *Animal Reproduction Science*, vol. 60–61, (2000), 605–614.

12. Sartori, R., Bastos, M., Wiltbank, M., "Factors affecting fertilisation and early embryo quality in single-and superovulated dairy cattle", *Reproduction, fertility, and development*, vol. 22, no 1, (2010), 151–158.
13. Hoeck, V. Van, Sturmey, R. G., Bermejo-alvarez, P., Rizos, D., Gutierrez-, A., Leese, H. J., Bols, P. E. J., Leroy, J. L. M. R., "Elevated Non-Esterified Fatty Acid Concentrations during Bovine Oocyte Maturation Compromise Early Embryo Physiology", *PloS one*, vol. 6, no 8, (2011), 1–8.
14. Bamber, L., Shook, G., Wiltbank, C., Santos, J., "Genetic parameters for anovulation and pregnancy loss in dairy cattle", *Journal of Dairy Science*, vol. 92, (2009), 5739–5753.
15. Pereira, M. H. C., Wiltbank, M. C., Vasconcelos, J. L. M., "Expression of estrus improves fertility and decreases pregnancy losses in lactating dairy cows that receive artificial insemination or embryo transfer", *Journal of Dairy Science*, vol. 99, no 3, (2016), 2237-2247.
16. Bauman, D. E., Currie, W. B., "Partitioning of nutrients during pregnancy and lactation: a review of mechanisms involving homeostasis and homeorhesis", *Journal of dairy science*", vol. 63, no 9, (1980), 1514–1529.
17. Butler, W. R., Smith, R. D., "Interrelationships Between Energy Balance and Postpartum Reproductive Function in Dairy Cattle", *Journal of Dairy Science*, vol. 72, no 3, (1989), 768–783.
18. Gröhn, Y. T., Erb, H. N., McCulloch, C. E., Saloniemi, H. S., "Epidemiology of Metabolic Disorders in Dairy Cattle: Association Among Host Characteristics, Disease, and Production", *Journal of Dairy Science*, vol. 72, no 7, (1989), 1876–1885.
19. Loeffler, S. H., De Vries, M. J., Schukken, Y. H., De Zeeuw, A. C., Dijkhuizen, A. A., De Graaf, F. M., Brand, A., "Use of AI technician scores for body condition, uterine tone and uterine discharge in a model with disease and milk production parameters to predict pregnancy risk at first AI in holstein dairy cows", *Theriogenology*, vol. 51, no 7, (1999), 1267–1284.
20. Reist, M., Koller, A., Busato, A., Kupfer, U., Blum, J. W., "First ovulation and ketone body status in the early postpartum period of dairy cows", *Theriogenology*, vol. 54, no 5, (2000), 685–701.
21. Heuer, C., van Straalen, W. M., Schukken, Y. H., Dirkzwager, A., Noordhuizen, J. P. T. M., "Prediction of energy balance in a high yielding dairy herd in early lactation: model development and precision" *Livest. Prod. Sci.*, vol. 65, no 1, (2000), 91–105.
22. Westwood, C. T., Lean, I. J., Garvin, J. K., "Factors Influencing Fertility of Holstein Dairy Cows: A Multivariate Description", *Journal of Dairy Science*, vol. 85, no 12, (2002), 3225–3237.
23. Walsh, R. B., Kelton, D. F., Duffield, T. F., Leslie, K. E., Walton, J. S., LeBlanc, S. J., "Prevalence and Risk Factors for Postpartum Anovulatory Condition in Dairy Cows", *Journal of Dairy Science*, vol. 90, no 1, (2007), 315–324.

24. Ospina, P. A., Nydam, D. V, Stokol, T., Overton, T. R., " Association between the proportion of sampled transition cows with increased nonesterified fatty acids and beta-hydroxybutyrate and disease incidence, pregnancy rate, and milk production at the herd level", *Journal of dairy science*, vol. 93, no 8, (2010), 3595–3601.
25. Ospina, P. A., Nydam, D. V, Stokol, T., Overton, T. R., "Evaluation of nonesterified fatty acids and beta-hydroxybutyrate in transition dairy cattle in the northeastern United States: Critical thresholds for prediction of clinical diseases", *Journal of dairy science*, vol. 93, no 2, (2010), 546–554.
26. Bicalho, M. L. S., Marques, E. C., Gilbert, R. O., Bicalho, R. C.," The association of plasma glucose, BHBA, and NEFA with postpartum uterine diseases, fertility, and milk production of Holstein dairy cows", *Theriogenology*, vol. 88, (2017), 270–282.
27. Herdt, T. H.," Ruminant Adaptation to Negative Energy Balance: Influences on the Etiology of Ketosis and Fatty Liver ", *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* , vol. 16, no 2, (2000), 215–230.
28. Duffield, T. F., Lissemore, K. D., McBride, B. W., Leslie, K. E.," Impact of hyperketonemia in early lactation dairy cows on health and production", *Journal of Dairy Science*, vol. 92, no 2, (2009), 571–580.
29. Seifi, H. A., Leblanc, S. J., Leslie, K. E., Duffield, T. F., "Metabolic predictors of post-partum disease and culling risk in dairy cattle", *The Veterinary Journal*, vol. 188, no 2, (2011), 216–220.
30. Compton, C., Young, L., McDougall, S., "Subclinical ketosis in post-partum dairy cows fed a predominantly pasture-based diet: defining cut-points for diagnosis using concentrations of beta-hydroxybutyrate in blood and determining prevalence", *New Zealand Veterinary Journal*, vol. 169 (February 2015), 1–33.
31. Suthar, V. S., Canelas-Raposo, J., Deniz, A., Heuwieser, W., "Prevalence of subclinical ketosis and relationships with postpartum diseases in European dairy cows", *Journal of dairy science*, vol. 96, no 5, (2013), 2925–2938.
32. Raboisson, D., Mounié, M., Maigné, E., "Diseases, reproductive performance, and changes in milk production associated with subclinical ketosis in dairy cows: a meta-analysis and review", *Journal of dairy science*, vol. 97, no 12, (2014), 7547–7563.
33. McCarthy, M. M., Mann, S., Nydam, D. V., Overton, T. R., McArt, J. A. A.," Short communication: Concentrations of nonesterified fatty acids and  $\beta$ -hydroxybutyrate in dairy cows are not well correlated during the transition period", *Journal of Dairy Science*, vol. 98, no 9, (2015), 6284–6290.
34. Baquedano, E., Ruiz-lopez, A. M., Sustarsic, E. G., Herpy, J., List, E. O., Chowen, J. A., Frago, L. M., Kopchick, J. J., "The Absence of GH Signaling Affects the Inflammation in Male Mice", *Neuroendocrinology*, vol. 155, (2014), 4856–4867.
35. Leroy, J. L. M. R., Vanholder, T., Opsomer, G., Van Soom, A., De Kruif, A., "The

- in vitro development of bovine oocytes after maturation in glucose and  $\beta$ -hydroxybutyrate concentrations associated with negative energy balance in dairy cows", *Reproduction in Domestic Animals*, vol. 41, no 2, (2006), 119–123.
36. Bényei, B.; Komlósi, I., Pécsi, A., Kulcsár, M., Huzsvai, M., Huszeni, L.N., Barros, C. W. C., Gyula, H., "Plasma progesterone , metabolic hormones and beta-hydroxybutyrate in holstein-friesian cows", *Acta Veterinaria Hungarica*, vol. 59, no 4, (2011), 485–495.
  37. Jorritsma, R., César, M. L., Hermans, J. T., " Effects of non-esterified fatty acids on bovine granulosa cells and developmental potential of oocytes in vitro", *Animal Reproduction Science*, vol. 81, (2004), 225–235.
  38. Leroy, J. L. M. R., Vanholder, T., Mateusen, B., Christophe, A., Opsomer, G., Kruif, A. De, Genicot, G., Soom, A. V., "Non-esterified fatty acids in follicular fluid of dairy cows and their effect on developmental capacity of bovine oocytes in vitro", *Reproduction*, vol. 130, (2004), 485–495.
  39. Leroy, J. L. M. R., Vanholder, T., Van Kneysel, A. T. M., Garcia-Ispuerto, I., Bols, P. E. J., "Nutrient Prioritization in Dairy Cows Early Postpartum: Mismatch Between Metabolism and Fertility?", *Reproduction in Domestic Animals*, vol. 43 (Suppl.2), (2008), 96–103.
  40. Leroy, J. L. M. R., Valckx, S., Sturmey, R., Bossaert, P., Hoeck, V. Van, Bols, P. E. J., "Maternal metabolic health and oocyte quality : the role of the intrafollicular environment", *Animal Reproduction*, vol. 9, (2012), 777–788.
  41. Aardema, H., Tol, H. T. A., Van Brouwers, J. F., Gadella, B. M., Roelen, B. A. J., " Cumulus cells protect the bovine oocyte against lipotoxicity by converting saturated into unsaturated fatty acids using stearoyl-CoA-desaturase during in vitro maturation A comparative analysis of the protein composition of the oviductal and uterine fluids in cattle during the periovulatory phase by 2D fluorescence difference gel electrophoresis", *Proceedings of the 30th Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology Society (SBTE)*, Foz do Iguaçu, PR, Brazil, (2016), 632–670.
  42. Sutton-Mcdowall, M. L., Wu, L. L. Y., Purdey, M., Andrew, D., Goldys, E. M., Macmillan, K. L., Thompson, J. G., Robker, R. L., " Non-esterified fatty acid-induced endoplasmic reticulum stress in cattle cumulus oocyte complexes alters cell metabolism and developmental competence 1 Running Title: NEFA induced ER-stress in cattle oocytes", *Biology of Reproduction*, vol. 94, no 1, (2015), 1–9.
  43. Roche, J. R., Bell, A. W., Overton, T. R., Loor, J. J., " Nutritional management of the transition cow in the 21st century-a paradigm shift in thinking", *Animal Production Science*, vol. 53, no 9, (2013), 1000–1023.
  44. Drackley, J. K., Cardoso, F. C., "Prepartum and postpartum nutritional management to optimize fertility in high-yielding dairy cows in confined TMR systems", *Animal*, vol. 8 (s1), (2014), 5–14.
  45. Ospina, P. A., McArt, J. A., Overton, T. R., Stokol, T., Nydam, D. V., "Using nonesterified fatty acids and  $\beta$ -hydroxybutyrate concentrations during the

- transition period for herd-level monitoring of increased risk of disease and decreased reproductive and milking performance, *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, vol. 29, no 2, (2013), 387–412.
46. Van Knegsel, A.T.M., Van Den Brand, H., Dijkstra, J., Tamminga, S., Kemp, B., "Effect of dietary energy source on energy balance , production , metabolic disorders and reproduction in lactating dairy cattle" , *Reprod. Nutr. Dev*, vol. 45, (2005), 665–688.
  47. Mulligan, F. J., Doherty, M. L., " Production diseases of the transition cow", *The Veterinary Journal*, V. 176, no 1, (2008), 3–9.
  48. McArt, J. A. A., Nydam, D. V., Oetzel, G. R., Overton, T. R., Ospina, P. A., "*Elevated non-esterified fatty acids and  $\beta$ -hydroxybutyrate and their association with transition dairy cow performance*", *The Veterinary Journal*, vol. 198, no 3, (2013), 560-570.
  49. Roche, J. R., Kay, J. K., Friggens, N. C., Loor, J. J., Berry, D. P., "Assessing and managing body condition score for the prevention of metabolic disease in dairy cows", *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, vol. 29, no 2, (2013), 323–336.
  50. Friggens, N. C., Sauvant, D., Martin, O., " Vers des définitions opérationnelles de la robustesse s ' appuyant sur des faits biologiques . L ' exemple de la nutrition", *INRA Productions Animales*, vol. 23, no 1, (2010), 1–10.
  51. Large, V., Peroni, O., Letexier, D., Ray, H., Beylot, M., "Metabolism of lipids in human white adipocyte", *Diabetes & metabolism*, v30, no 4, (2004), 294–309.
  52. Lafontan, M., Langin, D., "Régulation neuro-humorale de la lipolyse : aspects physiologiques et physiopathologiques", *médecine/sciences*, vol. 14, (1998), 865–876.
  53. Janovick, N. A., Boisclair, Y. R., Drackley, J. K., " Prepartum dietary energy intake affects metabolism and health during the periparturient period in primiparous and multiparous Holstein cows " , *Journal of Dairy Science*, vol. 94, no 3, (2011), 1385–1400.
  54. Roche, J. R., Macdonald, K. A., Schütz, K. E., Matthews, L. R., Verkerk, G. A., Meier, S., Loor, J. J., " Calving body condition score affects indicators of health in grazing dairy cows", *Journal of Dairy Science*, vol. 96, no 9, (2013), 5811–5825.
  55. Nielsen, T. S., Jessen, N., Jørgensen, J. O. L., Møller, N., Lund, S., "Dissecting adipose tissue lipolysis : molecular regulation and implications for metabolic disease", *Journal of Molecular Endocrinology*, vol. 52, (2014), 199–222.
  56. Ducharme, N. A., Bickel, P. E., "Minireview : Lipid Droplets in Lipogenesis and Lipolysis", *Endocrinology*, vol. 149, no 3, (2008), 942–949.
  57. Wei, Z. Y., Hang, S., " Effects of nuclear receptor FXR on the regulation of liver lipid metabolism in patients with non-alcoholic fatty liver disease", *Hepatol Int*, vol. 4, (2010), 741–748.

58. Locher, L., Häussler, S., Laubenthal, L., Singh, S. P., Winkler, J., Kinoshita, a, Kenéz, Á., Rehage, J., Huber, K., Sauerwein, H., Dänicke, S., "Effect of increasing body condition on key regulators of fat metabolism in subcutaneous adipose tissue depot and circulation of nonlactating dairy cows", *Journal of dairy science*, vol. 98, no 2, (2015), 1057–1068.
59. Sanders, M. A., Zhang, H., Mladenovic, L., Tseng, Y. Y., Granneman, J. G., "Molecular Basis of ABHD5 Lipolysis Activation", *Scientific Reports*, vol. 7, (2017), 1–13.
60. Sanders, M. A., Zhang, H., Mladenovic, L., Tseng, Y. Y., Granneman, J. G., "Molecular Basis of ABHD5 Lipolysis Activation", *Scientific Reports*, vol. 7, (2017), 1–13.
61. Drackley, J. K., "Biology of Dairy Cows During the Transition Period : the Final Frontier ?", *Journal of Dairy Science*, vol. 82, (1999), 2259–2273.
62. Yuen, J., Chong, E., Riddle, C., Yuen, K. C. J., "Influence of glucocorticoids and growth hormone on insulin sensitivity in humans", *Diabetic Medicine*, V.30, no 6, (2013), 651–663.
63. Corbit, K. C., Camporez, J. P. G., Tran, J. L., Wilson, C. G., Lowe, D. A., Nordstrom, S. M., Ganeshan, K., Perry, R. J., Shulman, G. I., Jurczak, M. J., Weiss, E. J., "Adipocyte JAK2 mediates growth hormone – induced hepatic insulin resistance, *JCI.Insight* , vol. 2, no 3, (2017), 1–14.
64. Peckett, A. J., Wright, D. C., Riddell, M. C., "The effects of glucocorticoids on adipose tissue lipid metabolism", *Metabolism*, vol. 60, no 11, (2011), 1500–1510.
65. Yuen, J., Chong, E., Riddle, C., Yuen, K. C. J., "Influence of glucocorticoids and growth hormone on insulin sensitivity in humans", *Diabetic Medicine*, vol. 20, no 6, (2013), 651–663.
66. Bauman, D. E., Perfield, J. W., De-Veth, M. J., Lock, A. L., "New perspectives on lipid digestion and metabolism in ruminants". *Proc. Cornell Nutr. Conf.*, (2003), 175–189.
67. Cuvelier, C., Cabaraux, J. F., Dufrasne, I., Istasse, L., Hornick, J. L., "Transport sanguin et métabolisme hépatique des acides gras chez le ruminant", *Annales de Medecine Veterinaire*, vol. 149, no 2, (2005), 117–131.
68. Adewuyi, A. A., Gruys, E., van Eerdenburg, F. J. C. M., "Non esterified fatty acids (NEFA) in dairy cattle", A review., *The Veterinary quarterly*, V.27, no 3, (2005), 117–126.
69. Adewuyi, A. A., Gruys, E., "Non esterified fatty acids (NEFA) in dairy cattle. A review", *Veterinary Quarterly*, vol. 27, no 3, (2017), 117–126.
70. Reddy, J. K., Rao, M. S., "Lipid Metabolism and Liver Inflammation . II . Fatty liver disease and fatty acid oxidation", *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, vol. 290, no 5, (2006), 852–858.
71. Wanders, R. J. A., Ferdinandusse, S., Brites, P., Kemp, S., "Review : Peroxisomes, lipid metabolism and lipotoxicity", *Biochimica et Biophysica Acta*,

- V.1801, no 3, (2010), 272–280.
72. Laffel, L., "Ketone bodies: a review of physiology, pathophysiology and application of monitoring to diabetes", *Diabetes/metabolism research and reviews*, vol. 15, no 6, (1999), 412–426.
  73. Li, P., Li, X. B., Fu, S. X., Wu, C. C., Wang, X. X., Yu, G. J., Long, M., Wang, Z., Liu, G. W., "Alterations of fatty acid  $\beta$ -oxidation capability in the liver of ketotic cows", *Journal of Dairy Science*, vol. 95, no 4, (2012), 1759–1766.
  74. Nguyen, P., Leray, V., Diez, M., Serisier, S., Bloc, J. Le, Siliart, B., Dumon, H., "Liver lipid metabolism", *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, vol. 92, (2008), 272–283.
  75. Rojas-morales, P., Tapia, E., Pedraza-chaverri, J., " $\beta$ -Hydroxybutyrate: A signaling metabolite in starvation response?", *Cellular Signalling*, vol. 28, no 8, (2016), 917–923.
  76. Cotter, D. G., Schugar, R. C., Wentz, A. E., D'Avignon, D. A., Crawford, P. A., "Successful adaptation to ketosis by mice with tissue-specific deficiency of ketone body oxidation", *American Journal of physiology - Endocrinology and metabolism*, vol. 304, no 4, (2013), E363-74.
  77. White, H. M., "The Role of TCA Cycle Anaplerosis in Ketosis and Fatty Liver in Periparturient Dairy Cows", *Animals*, vol. 5, no 3, (2015), 793–802.
  78. Xu, X., Park, J., Lee, A., "Transcriptional Control of Hepatic Lipid Metabolism by SREBP and ChREBP", *Semin Liver Dis*, vol. 33, no 4, (2013), 301–311.
  79. Piazza, S., Diez, M., " Mise au point: L ' alimentation du furet ( *Mustela furo* ) : rationnement pratique et pathologie nutritionnelle Ferrets ( *Mustela furo* ) feeding : Rationing and nutritional disease", *Pratique medicale et chirurgicale de l'animal de compagnie*, vol. 45, no 2, (2010), 41–52.
  80. Bezerra, L. R., Neto, C. B. D. O., Araújo, M. J. De, Edvan, R. L., "Major Metabolic Diseases Affecting Cows in Transition Period", *International Journal of Biology*, vol. 6, no 3, (2014), 85–94.
  81. Drackley, J. K., Beaulieu, A. D., Elliott, J. P., "Responses of Milk Fat Composition to Dietary Fat or Nonstructural Carbohydrates in Holstein and Jersey Cows ", *Journal of Dairy Science*, vol. 84, no 5, (2001), 1231–1237.
  82. Zachut, M., Honig, H., Striem, S., Zick, Y., Moallem, U., "Periparturient dairy cows do not exhibit hepatic insulin resistance , yet adipose-specific insulin resistance occurs in cows prone to high weight loss", *Journal of Dairy Science*, vol. 96, no 9, (2013), 5656–5669.
  83. Benhamed, F., Poupeau, A., Postic, C., " Diabète : approches thérapeutiques émergentes Le facteur de transcription", *médecine/sciences*, vol. 29, (2013), 765–771.
  84. Baraille, F., Planchais, J., Dentin, R., Guilmeau, S., Postic, C., " Integration of ChREBP-Mediated Glucose Sensing into Whole Body Metabolism", *Physiology*, vol. 30, (2015), 428–437.

85. Penner, G. B., Steele, M. A., Aschenbach, J. R., McBride, B. W., "RUMINANT NUTRITION SYMPOSIUM: Molecular adaptation of ruminal epithelia to highly fermentable diets", *Journal of Animal Science*, vol. 89, no 4, (2011), 1108–1119.
86. Baldwin, R. L., McLeod, K. R., Klotz, J. L., Heitmann, R. N., "Rumen Development , Intestinal Growth and Hepatic Metabolism In The Pre- and Postweaning Ruminant ", *Journal of Dairy Science*, vol. 87, (June 2003), (2004), E55–E65.
87. Newman, J. C., Verdin, E., "Ketone bodies as signaling metabolites, *Trends in Endocrinology & Metabolism*, Trends in Endocrinology & Metabolism, vol. 25, no 1,(2013), 42–52.
88. Burgess, S. C., Leone, T. C., Wende, A. R., Croce, M. A., Chen, Z., Sherry, A. D., Malloy, C. R., Finck, B. N., " Diminished Hepatic Gluconeogenesis via Defects in Tricarboxylic Acid Cycle Flux in Peroxisome Proliferator-activated Receptor  $\gamma$  Coactivator-1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ )-deficient Mice",*The Journal of Biology Chemistry*, vol. 281, no 28, (2006), 19000–19008.
89. Yamada, T., Zhang, S., Katz, A., " $\beta$ -Hydroxybutyrate inhibits insulin-mediated glucose transport in mouse oxidative muscle", *Am J Physiol Endocrinol Metab*, vol. 299, (2010), 364–373.
90. Cooke, R. F., Del Rio, N. S., Caraviello, D. Z., Bertics, S. J., Ramos, M. H., Grummer, R. R., "Supplemental Choline for Prevention and Alleviation of Fatty Liver in Dairy Cattle", *Journal of dairy science*, vol. 90, no 5, (2007), 62–71.
91. Petit, H. V, Palin, M. F., Doepel, L.," Hepatic Lipid Metabolism in Transition Dairy Cows Fed Flaxseed", *J. Dairy Sci.*, vol. 90, no 10, (2007), 4780–4792.
92. Byrne, C. D., Olufadi, R., Bruce, K. D., Cagampang, F. R., Ahmed, M. H.," Metabolic disturbances in non-alcoholic fatty liver disease", *Clinical Science*, vol. 116, (2009), 539–564.
93. Nozaki, Y., Fujita, K., Yoneda, M., Wada, K., Shinohara, Y., Takahashi, H., Kirikoshi, H., Inamori, M., Kubota, K., Saito, S., Mizoue, T., Masaki, N., Nagashima, Y., Terauchi, Y., Nakajima, A., " Long-term combination therapy of ezetimibe and acarbose for non-alcoholic fatty liver disease ", *Journal of Hepatology*, vol. 51, no 3, (2009), 548–556.
94. Drackley, J. K., "Biology of dairy cows during the transition period: The final frontier?", *Journal of Dairy Science*, vol. 82, no 11, (1999), 2259–2273.
95. Ruoff, J., Bertulat, S., Burfeind, O., Heuwieser, W., "Associations of  $\beta$  -hydroxybutyrate , cholesterol , triglycerides and high-density lipoproteins to non-esterified fatty acids pre- and postpartum", *Journal of Dairy Research*, vol. 83, (2016), 447–452.
96. Loor, J. J., Everts, R. E., Bionaz, M., Dann, H. M., Morin, D. E., Oliveira, R., Rodriguez-Zas, S. L., Drackley, J. K., Lewin, H.," Nutrition-induced ketosis alters metabolic and signaling gene networks in liver of periparturient dairy cows", *Physiological genomics*, vol. 32, no 1, (2007), 105–116.
97. Overton, T. R., Drackley, J. K., Beaulieu, A. D., Emmert, L. S., Clark, J. H., Overton, T. R., Drackley, J. K., Ottemann-abbamonte, C. J., Beaulieu, A. D.,

- Emmert, L. S., Clark, J. H., "Substrate utilization for hepatic gluconeogenesis is altered by increased glucose demand", *Journal of Animal Science*, vol. 77, (1999), 1940–1951.
98. Trevisi, E., Amadori, M., Cogrossi, S., Razzuoli, E., Bertoni, G., "Metabolic stress and inflammatory response in high-yielding, periparturient dairy cows", *Research in Veterinary Science*, vol. 93, no 2, (2012), 695–704.
  99. Ohtsuka, H., Koiwa, M., Hatsugaya, A., Kudo, K., Hoshi, F., "Relationship between Serum TNF Activity and Insulin Resistance in Dairy Cows Affected with Naturally Occurring Fatty Liver, *Internal Medicine Relationship*", vol. 63, no 9, (2001), 1021–1025.
  100. Bradford, B. J., Mamedova, L. K., Minton, J. E., Drouillard, J. S., Johnson, B. J., "Daily Injection of Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Increases Hepatic Triglycerides and Alters Transcript Abundance of Metabolic Genes in Lactating Dairy Cattle", *The Journal of Nutrition*, vol. 139, no 8, (2009), 1451–1456.
  101. Enjalbert, F., Nicot, M. C., Bayourthe, C., Moncoulon, R., "Ketone Bodies in Milk and Blood of Dairy Cows: Relationship between Concentrations and Utilization for Detection of Subclinical Ketosis", *Journal of Dairy Science*, vol. 84, no 3, (2001), 583–589.
  102. Geishauser, T., Leslie, K., Tenhag, J., Bashiri, A., "Evaluation of Eight Cow-Side Ketone Tests in Milk for Detection of Subclinical Ketosis in Dairy Cows", *Journal of Dairy Science*, vol. 83, (2000), 296–299.
  103. Oetzel, G. R., "Herd-Level Ketosis – Diagnosis and Risk Factors Garrett ", In *Preconference Seminar 7C: Dairy Herd Problem Investigation Strategies: Transition Cow Troubleshooting AMERICAN*, American Association Of Bovine Practitioners, Ed.; Vancouver, BC, Canada, (2015), 67–91.
  104. Iwersen, M., Falkenberg, U., Voigtsberger, R., Forderung, D., Heuwieser, W., "Evaluation of an electronic cowside test to detect subclinical ketosis in dairy cows", *Journal of Dairy Science*, vol. 92, (2009), 2618–2624.
  105. Iwersen, M., Pichler, M., Roland, L., Fidschuster, B., Schwendenwein, I., Drillich, M., "Comparison of 2 electronic cowside tests to detect subclinical ketosis in dairy cows and the influence of the temperature and type of blood sample on the test results", *Journal of Dairy Science*, V.96, no 12, (2013), 7719–7730.
  106. Voyvoda, H., Erdogan, H., "Research in Veterinary Science Use of a hand-held meter for detecting subclinical ketosis in dairy cows", *Research in Veterinary Science*, vol. 89, (2010), 344–351.
  107. Pineda, A., Cardoso, F. C., "Technical note: Validation of a handheld meter for measuring  $\beta$ -hydroxybutyrate concentrations in plasma and serum from dairy cows", *Journal of Dairy Science*, vol. 98, no 12, (2015), 8818–8824.
  108. Panousis, N., Brozos, C., Karagiannis, I., Giadinis, N. D., Lafi, S., Kritsepi-konstantinou, M., "Research in Veterinary Science Evaluation of Precision Xceed  $\text{O}$  meter for on-site monitoring of blood  $\beta$ -hydroxybutyric acid and glucose concentrations in dairy sheep", *Research in Veterinary Science*, vol. 93, no 1,

- (2012), 435–439.
109. Dubuc, J., Buczinski, S., "Short communication : evaluation of the accuracy of an electronic on-farm test to quantify blood  $\beta$ -hydroxybutyrate concentration in dairy goats", *Journal of Dairy Science*, vol. 96, no 7, (2013), 4505–4507.
  110. Bresciani, F., Pietra, M., Corradini, S., Giunti, M., Fracassi, F., "Science Accuracy of capillary blood 3-  $\beta$  -hydroxybutyrate determination for the detection and treatment of canine diabetic ketoacidosis", *J. Vet. Sci*, vol. 15, no 2, (2014), 309–316.
  111. Voulgari, C., Tentolouris, N., " The Performance of a Glucose-Ketone Meter in the Diagnosis of Diabetic Ketoacidosis in Patients with Type 2 Diabetes in the Emergency Room", *Diabetes Technology & Therapeutics*, vol. 12, no 7, (2010), 529–535.
  112. Denis-Robichaud, J., Dubuc, J. Lefebvre, D., DesCôteaux, L., " Accuracy of milk ketone bodies from flow-injection analysis for the diagnosis of hyperketonemia in dairy cows", *Journal of Dairy Science*, V.97, no 6, (2014), 3364–3370.
  113. Mair, B., Drillich, M., Kanz, P., Borchardt, S., Meyer, L., Schwendenwein, I., Iwersen, M., "Glucose concentration in capillary blood of dairy cows obtained by a minimally invasive lancet technique and determined with three different hand-held devices", *Veterinary Research*, vol. 12, (2016), 1–11.
  114. Weng, X., Zhao, W., Neethirajan, S., Duffield, T., " Microfluidic biosensor for  $\beta$ -Hydroxybutyrate ( $\beta$ HBA) determination of subclinical ketosis diagnosis", *Journal of nanobiotechnology*, vol. 13, no 1, (2015), 1–8.
  115. Krempaský, M., Maskal'ová, I., Bujňák, L., Vajda, V., "Ketone bodies in blood of dairy cows: Prevalence and monitoring of subclinical ketosis", *Acta Veterinaria Brno*, vol. 83, no 4, (2014), 411–416.
  116. Tatone, E. H., Gordon, J. L., Hubbs, J., Leblanc, S. J., Devries, T. J., Duffield, T. F., "A systematic review and meta-analysis of the diagnostic accuracy of point-of-care tests for the detection of hyperketonemia in dairy cows", *Preventive Veterinary Medicine*, vol. 130, (2016), 18–32.
  117. Townsend, J., "In *Cowside Tests for Monitoring Metabolic Disease*; Conference", T.-S. D. N., Ed., (2011), 55–60.
  118. Rollin, F., " In *Tools for a prompt cow-side diagnosis: what can be implemented by the bovine practitioner?*", CONGRESS, W. B., Ed., France, (2006), 1–11.
  119. Commun, L., Forgeat, G., Bertrand, E., Alves De Oliveira, L., "Transition des vaches laitières : de nouveaux outils pour mesurer le déficit énergétique , avant et après vêlage", *Journées Nationales GTV*, (2014), 881–890.
  120. Leslie, K., Duffield, T., Leblanc, S., " Monitoring and Managing Energy Balance in the Transition Dairy Cow", *Minnesota Dairy Health Conference*, (2004), 101–107.
  121. Stokol, T., Nydam, D. V., " Effect of hemolysis on nonesterified fatty acid and  $\beta$ -hydroxybutyrate concentrations in bovine blood", *Journal of veterinary*

- diagnostic investigation, vol. 18, no 5, (2006), 466-469.
122. Oetzel, G. R., "Monitoring and testing dairy herds for metabolic disease, *Vet Clin Food Anim*", vol. 20, (2004), 651–674.
  123. Van Saun, R. J., "Indicators of dairy cow transition risks : Metabolic profiling revisited", *Tierärztliche Praxis Großtiere*, V.44, (2016), 118–125.
  124. Dehkordi, M. K., Hafshejani, T. T., "Critical Thresholds of Nonesterified Fatty Acids and  $\beta$ -hydroxybutyrate in Transition Dairy Cows for Prediction of First Service Conception Rate", *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, vol. 22, no 2, (2016), 191–195.
  125. Giuliodori, M., Lacau-mengido, I. M., " Clinical endometritis in an Argentinean herd of dairy cows : Risk factors and reproductive efficiency", *Journal of Dairy Science*, vol. 96, (2012), 1-9 .
  126. Lomander, H., Gustafsson, H., Svensson, C., Ingvarsen, K. L., Frössling, J., " Test accuracy of metabolic indicators in predicting decreased fertility in dairy cows", *Journal of Dairy Science*, vol. 95, no 12, (2012), 7086–7096.
  127. Asl, A. N., Nazifi, S., Ghasrodashti, A. R., Olyae, A., " Prevalence of subclinical ketosis in dairy cattle in the Southwestern Iran and detection of cutoff point for NEFA and glucose concentrations for diagnosis of subclinical ketosis", *Preventive Veterinary Medicine*, vol. 100, no 1, (2011), 38–43.
  128. Chapinal, N., Leblanc, S. J., Carson, M. E., Leslie, K. E., Godden, S., Capel, M., Santos, J. E. P., Overton, M. W., Duffield, T. F., " Herd-level association of serum metabolites in the transition period with disease, milk production, and early lactation reproductive performance", *Journal of Dairy Science*, vol. 95, (2012), 5676–5682.
  129. Roberts, T., Chapinal, N., Leblanc, S. J., Kelton, D. F., Dubuc, J., Duffield, T. F., "Metabolic parameters in transition cows as indicators for early-lactation culling risk", *Journal of dairy science*, vol. 95, no 6, (2012), 3057–3063.
  130. Yasui, T., Mccann, K., Gilbert, R. O., Nydam, D. V, Overton, T. R., "Associations of cytological endometritis with energy metabolism and inflammation during the periparturient period and early lactation in dairy cows", *J. Dairy Sci*, vol. 97, no 5, (2014), 1–8.
  131. Mostafavi, M., Seifi, H. A., Mohri, M., Jamshidi, A., "Optimal thresholds of metabolic indicators of hepatic lipidosis in dairy cows", *Revue Méd. Vét*, vol. 164, (2013), 564–571.
  132. Kumari, S., Prasad, S., Patbandha T. K., Pathak, R., Kumaresan A., Boro C. P., Manimaran, A., Mohanty, T. K., "Metabolic indicators for retention of fetal membranes in Zebu and crossbred dairy cattle", *Animal Production Science*, vol. 56, no 7, (2011), 1-8.
  133. Sun, Y., Wang, B., Shu, S., Zhang, H., Xu, C., Wu, L., Xia, C., "Critical thresholds of liver function parameters for ketosis prediction in dairy cows using receiver operating characteristic ( ROC ) analysis", *Veterinary Quarterly*, vol. 335, no 3, (2015), 37–41.

134. Basiri, N., Safi, S., Norouziyan, I., Foroushani, A. R., " Evaluation of biochemical parameters for the prediction of left displaced abomasum in dairy cows using the logistic regression model", *Comp Clin Pathol*, vol. 22, (2013), 431–439.
135. Seifi, H. A., LeBlanc, S. J., Leslie, K. E., Duffield, T. F., " Metabolic predictors of post-partum disease and culling risk in dairy cattle", *Veterinary Journal*, vol. 188, no 2, (2011), 216–220.
136. LeBlanc, S., " Monitoring metabolic health of dairy cattle in the transition period", *The Journal of reproduction and development*, vol. 56 *Suppl*, (2010), S29-S35.
137. Bernabucci, U., Ronchi, B., Lacetera, N., Nardone, A., "Influence of Body Condition Score on Relationships Between Metabolic Status and Oxidative Stress in Periparturient Dairy Cows", *Journal of Dairy Science*, vol. 88, no 6, (2017), 2017–2026.
138. Bewley, J. M., Schutz, M. M., " Review : An Interdisciplinary of Body Condition Scoring for Dairy Cattle", *The Professional Animal Scientist*, vol. 24, no 6, (2008), 507–529.
139. Vanholder, T., Papen, J., Bemers, R., Vertenten, G., Berge, A. C. B., " Risk factors for subclinical and clinical ketosis and association with production parameters in dairy cows in the Netherlands", *Journal of Dairy Science*, vol. 98, no 2, (2015), 880–888.
140. Shin, E., Jeong, J., Choi, I., Kang, H., "Relationships among ketosis , serum metabolites , body condition , and reproductive outcomes in dairy cows", *Theriogenology*, vol. 84, no 2, (2015), 252–260.
141. Pires, J. A. A., Delavaud, C., Faulconnier, Y., Pomiès, D., Chilliard, Y., "Effects of body condition score at calving on indicators of fat and protein mobilization of periparturient Holstein-Friesian cows", *Journal of Dairy Science*, vol. 96, no 10, (2013), 6423–6439.
142. Stengärde, L., Tråvén, M., Emanuelson, U., Holtenius, K., Hultgren, J., Niskanen, R., " Metabolic profiles in five high-producing Swedish dairy herds with a history of abomasal displacement and ketosis", *Acta Veterinaria Scandinavica*, vol. 11, no 1, (2008), 1–11.
143. Vargová, M., Petrovič, V., Konvičná, J., Kadaši, M., Zaleha, P., Kováč, G., " Hormonal profile and body condition scoring in dairy cows during pre partum and post partum periods", *ACTA VET. BRNO*, 84, (2015), 141–151.
144. Bradford, B. J., Allen, M. S., "Negative energy balance increases periprandial ghrelin and growth hormone concentrations in lactating dairy cows", *The Journal of Nutrition*, vol. 34, (2008), 196–203.
145. Schulz, K., Frahm, J., Meyer, U., Kersten, S., Reiche, D., Rehage, J., Dänicke, S., " Effects of prepartal body condition score and peripartal energy supply of dairy cows on postpartal lipolysis , energy balance and ketogenesis : an animal model to investigate subclinical ketosis", *Journal of Dairy Research* , vol. 81, (2014), 257–266.
146. Vecchi, I., Sabbioni, A., Bigliardi, E., Morini, G., "Relationship between body fat

- and body condition score and their effects on estrous cycles of the Standardbred maiden mare", *Vet Res Commun*, vol. 34, (2010), S41–S45.
147. Zeng, W., Pirzgalska, R. M., Pereira, M. M. A., Martins, G. G., Friedman, J. M., Domingos, A. I., Zeng, W., Pirzgalska, R. M., Pereira, M. M. A., Kubasova, N., Barateiro, A, "Sympathetic Neuro-adipose Connections Mediate Article Sympathetic Neuro-adipose Connections Mediate Leptin-Driven Lipolysis", *Cell*, vol. 163, no 1, (2015), 84–94.
  148. Wang, M., Lee, Y., Unger, R. H., " Novel Form of Lipolysis Induced by Leptin", *The Journal Of Biological Chemistry*, vol. 274, no 25, (1999), 17541–17544.
  149. Unger, R. H., Clark, G. O., Scherer, P. E., Orci, L., " Biochimica et Biophysica Lipid homeostasis , lipotoxicity and the metabolic syndrome", *BBA - Acta Molecular and Cell Biology of Lipids*, vol. 1801, no 3, (2010), 209–214.
  150. Oikawa, S., Oetzel, G. R., " Decreased Insulin Response in Dairy Cows Following a Four-Day Fast to Induce Hepatic Lipidosis", *Journal of Dairy Science*, vol. 89, no 8, (2006), 2999–3005.
  151. Holtenius, P., Holtenius, K., "A model to estimate insulin sensitivity in dairy cows", *Acta Veterinaria Scandinavica*, vol. 3, (2007), 3–5.
  152. Bossaert, P., Leroy, J. L. M. R., Vliegheer, S. De, Opsomer, G, " Interrelations Between Glucose-Induced Insulin Response , Metabolic Indicators , and Time of First Ovulation in High-Yielding Dairy Cows", *Journal of Dairy Science*, vol. 91, no 9, (2008), 3363–3371.
  153. Lemor, A., Hosseini, A., Sauerwein, H., Mielenz, M., "Transition period-related changes in the abundance of the mRNAs of adiponectin and its receptors , of visfatin , and of fatty acid binding receptors in adipose tissue of high-yielding dairy cows", *Domestic Animal Endocrinology*, vol. 37, (2009), 37–44.
  154. De-Koster, J. D., Opsomer, G., "Insulin Resistance in Dairy Cows, *Veterinary Clinics of NA: Food Animal Practice*", *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, vol. 29, no 2, (2013), 299–322.
  155. De Koster, J., Van den Broeck, W., Hulpio, L., Claeys, E., Van Eetvelde, M., Hermans, K., Hostens, M., Fievez, V., Opsomer, G., "Influence of adipocyte size and adipose depot on the in vitro lipolytic activity and insulin sensitivity of adipose tissue in dairy cows at the end of the dry period", *Journal of Dairy Science*, vol. 99, no 3, (2016), 2319–2328.
  156. Mann, S., Abuelo, A., Nydam, D. V., Leal Yepes, F. A., Overton, T. R., Wakshlag, J. J., " Insulin signaling and skeletal muscle atrophy and autophagy in transition dairy cows either overfed energy or fed a controlled energy diet prepartum", *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, vol. 186, no 4, (2016), 513–525.
  157. Baruselli, P. S., Vieira, L. M., Filho, M. F. S., Mingoti, R. D., Ferreira, R. M., Chiaratti, M. R., Oliveira, L. H., Sales, J. N., Sartori, R, "Associations of insulin resistance later in lactation on fertility of dairy cows", *Theriogenology*, vol. 86, no 1, (2016), 263-269.

158. Fiore, E. A., Arfuso, F. B., Colitti, M. C., Giancesella, M. A., Giudice, E. D., Piccione, G. B., Morgante, M. A., "Expression of selected genes related to energy mobilisation and insulin resistance in dairy cows", *Animal Production Science*, vol. 57, no 6, (2017), 1007-1013.
159. Kerestes, M., Faigl, V., Kulcsár, M., Balogh, O., Földi, J., Fébel, H., Chilliard, Y., Huszenicza, G., "Periparturient insulin secretion and whole-body insulin responsiveness in dairy cows showing various forms of ketone pattern with or without puerperal metritis", *Domestic Animal Endocrinology*, vol. 37, (2009), 250–261.
160. Oliveira, L. H., Nascimento, A. B., Jr, P. L. J. M., Guardieiro, M. M., Wiltbank, M. C., Sartori, R., "Development of insulin resistance in dairy cows by 150 days of lactation does not alter oocyte quality in smaller follicles", *Journal of Dairy Science*, vol. 99, no 11, (2016), 9174–9183.
161. Casañas, M. A. A., Schäff, C. T., Albrecht, E., Hammon, H. M., Kuhla, B., Röntgen, M., Nürnberg, G., "Short communication : Free fatty acid receptors FFAR1 and FFAR2 during the peripartal period in liver of dairy cows grouped by their postpartum plasma  $\beta$ -hydroxybutyrate concentrations", *Journal of Dairy Science*, vol. 100, no 4, (2017), 3287–3292.
162. Moreira, F., Risco, C., Pires, M. F. A., Ambrose, J. D., Drost, M., DeLorenzo, M., Thatcher, W. W., " Effect of body condition on reproductive efficiency of lactating dairy cows receiving a timed insemination", *Theriogenology*, vol. 53, no 6, (2000), 1305–1319.
163. Marchand-brustel, Y. Le, Gual, P., Gonzalez, T., " Fatty acid-induced insulin resistance : role of insulin receptor substrate 1 serine phosphorylation in the retroregulation of insulin signalling", *Biochemical Society Transactions*, vol. 31, no 6, (2003), 1152–1156.
164. Xue, B., Wang, L. Z., Yan, T., " Agriculture , Ecosystems and Environment Methane emission inventories for enteric fermentation and manure management of yak , buffalo and dairy and beef cattle in China from 1988 to 2009", *Agriculture, Ecosystems and Environment*, vol. 195, (2014), 202–210.
165. Balogh, O., Szepes, O., Kovacs, K., Kulcsar, M., Reiczigel, J., Alcazar, J. A., Keresztes, M., Febel, H., Bartyik, J., Fekete, S. G., Fesus, L., Huszenicza, G., " Interrelationships of growth hormone Alu I polymorphism , insulin resistance , milk production and reproductive performance in Holstein-Friesian cows", *Veterinari Medicina*, vol. 53, no 11, (2008), 604–616.
166. Youssef, M. A., El-ashker, M. R., Younis, M. S., " The effect of subclinical ketosis on indices of insulin sensitivity and selected metabolic variables in transition dairy cattle", *Comparative Clinical Pathology* , vol. 26, no 2, (2017), 329–334.
167. Xu, C., Shu, S., Xia, C., Wang, B., Zhang, H., Jun, B., " Investigation on the Relationship of Insulin Resistance and Ketosis in Dairy Cows", *Journal of Veterinary Science and Technology*, vol. 5, no 2, (2014), 2–5.
168. Pedernera, M., Celi, P., García, S. C., Salvin, H. E., Barchia, I., Fulkerson, W. J., " Effect of diet , energy balance and milk production on oxidative stress in

- early-lactating dairy cows grazing pasture", *The Veterinary Journal*, vol. 186, no 3, (2010), 352–357.
169. Shi, X., Li, D., Deng, Q., Li, Y., Sun, G., Yuan, X., "NEFAs activate the oxidative stress-mediated NF- $\kappa$ B signaling pathway to induce inflammatory response in calf hepatocytes", *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, vol. 145, (2014), 103–112.
  170. Song X., Li N., Gu J., Fu S., Peng Z., Zhao C., Zhang Y., Li X., Wang Z., Li X., L. G., "  $\beta$ -hydroxybutyrate induces bovine hepatocyte apoptosis via an ROS-p38 signaling pathway", *Journal of Dairy Science*, vol. 99, (2016), 9184–9198.
  171. Du X., Shi Z., Peng Z., Zhao C., Zhang Y., Wang Z., Li x., Liu G., L. X., " Acetoacetate induces hepatocytes apoptosis by the ROS-mediated MAPKs pathway in ketotic cows", *Journal of Cellular Physiology*, vol. 232, no 12, (2017), 3296–3308.
  172. Song, Y., Li, X., Li, Y., Li, N., "Non-esterified fatty acids activate the ROS – p38 – p53 / Nrf2 signaling pathway to induce bovine hepatocyte apoptosis in vitro", *Apoptosis* , vol. 19, (2014), 984–997.
  173. Sordillo, L. M., Raphael, W., "Significance of metabolic stress, lipid mobilization, and inflammation on transition cow disorders", *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, vol. 29, no 2, (2013), 267–278.
  174. Sordillo, L. M., Mavangira, V., "The nexus between nutrient metabolism , oxidative stress and inflammation in transition cows", *Animal Production Science*, vol. 54, no 9, (2014), 1204–1214.
  175. Farman, M., Nandi, S., Kumar, V. G., Tripathi, S. K.," Effect of Metabolic Stress on Ovarian Activity and Reproductive Performance of Dairy Cattle : A Review", *Iranian Journal of Applied Animal Science*, vol. 6, no 1, (2016), 1–7.
  176. Maalouf, M., Sullivan, P. G., Davis, L., Kim, D. Y., Cord, S., Injury, B., " Ketones inhibit mitochondrial production of reactive oxygen species production following glutamate excitotoxicity by increasing nadh oxidation", *Neuroscience*, vol. 145, (2007), 256–264.
  177. Julio-amilpas, A., Montiel, T., Soto-tinoco, E., Gerónimo-olvera, C., Massieu, L, " Protection of hypoglycemia-induced neuronal death by  $\beta$  -hydroxybutyrate involves the preservation of energy levels and decreased production of reactive oxygen species", *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, vol. 35, no 5, (2015), 1–10.
  178. Santschi, D. E., Lacroix, R., Durocher, J., Duplessis, M., Moore, R. K., Lefebvre, D. M., "Prevalence of elevated milk  $\beta$ -hydroxybutyrate concentrations in Holstein cows measured by Fourier-transform infrared analysis in Dairy Herd Improvement milk samples and association with milk yield and components", *Journal of Dairy Science*, vol. 99 , no 11, (2016), 9263–9270.
  179. Gordon, J. L., Duffield, T. F., Herdt, T. H., Kelton, D. F., Neuder, L., Leblanc, S. J., "Effects of a combination butaphosphan and cyanocobalamin product and insulin on ketosis resolution and milk production", *Journal of Dairy Science*, vol.

- 100, no 4, (2017), 2954–2966.
180. Enjalbert, F., Nicot, M., Bayourthe, C., Moncoulon, R., Supe, N., Inge, L., " Duodenal Infusions of Palmitic , Stearic or Oleic Acids Differently Affect Mammary Gland Metabolism of Fatty Acids in Lactating Dairy Cows", *J. Nutr.*, vol. 128, no 9, (1998), 1525–1532.
  181. Seifi, H. A., LeBlanc, S. J., Vernooy, E., Leslie, K. E., Duffield, T. F., "Effect of Isoflupredone Acetate With or Without Insulin on Energy Metabolism, Reproduction, Milk Production, and Health in Dairy Cows in Early Lactation", *Journal of Dairy Science*, vol. 90, no 9, (2007), 4181–4191.
  182. Ingvarsten, K. L., Moyes, K., "Nutrition , immune function and health of dairy cattle", *animal* , vol. 7, no 1, (2013), 112–122.
  183. Gross, J., Dorland, H. A. Van, Bruckmaier, R. M., Schwarz, F. J., " Performance and metabolic profile of dairy cows during a lactational and deliberately induced negative energy balance with subsequent realimentation", *Journal of Dairy Science*, vol. 94, no 4, (2011), 1820–1830.
  184. Ster, C., Loisel, M., Lacasse, P., " Effect of postcalving serum nonesterified fatty acids concentration on the functionality of bovine immune cells", *Journal of Dairy Science*, vol. 95, no 2, (2012), 708–717.
  185. Burton, J. L., Madsen, S. A., Chang, L., Weber, P. S. D., Buckham, K. R., Dorp, R. Van, Hickey, M., Earley, B., "Gene expression signatures in neutrophils exposed to glucocorticoids: A new paradigm to help explain “ neutrophil dysfunction ” in parturient dairy cows", vol. 105, (2005), 197–219.
  186. Lacetera, N., Scalia, D., Franci, O., Bernabucci, U., Ronchi, B., Nardone, A., Short Communication: Effects of Nonesterified Fatty Acids on Lymphocyte Function in Dairy Heifers", *Journal of Dairy Science*, vol. 87, no 4, (2004), 1012–1014.
  187. Renner, L., Kersten, S., Duevel, A., Schuberth, H., Dänicke, S., " Effects of cis-9,trans-11 and trans-10,cis-12 Conjugated Linoleic Acid, Linoleic Acid, Phytanic Acid and the Combination of Various Fatty Acids on Proliferation and Cytokine Expression of Bovine Peripheral Blood Mononuclear Cells", *Nutrients*, vol. 5, no 7 ,(2013), 2667–2683.
  188. Kabara, E., Sordillo, L. M., Holcombe, S., Contreras, G. A., " Adiponectin links adipose tissue function and monocyte inflammatory responses during bovine metabolic stress, *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*", 37 (1), (2014), 49–58.
  189. Suriyasathaporn, W., Heuer, C., Noordhuizen-Stassen, E. N., Schukken, Y. H., " Hyperketonemia and the impairment of udder defense: A review", *Veterinary Research*, vol. 31, no 4, (2000), 397–412.
  190. Scalia, D., Lacetera, N., Bernabucci, U., Demeyere, K., Duchateau, L., Burvenich, C., "In Vitro Effects of Nonesterified Fatty Acids on Bovine Neutrophils Oxidative Burst and Viability ", *Journal of Dairy Science*, vol. 89, no 1, (2006), 147–154.

191. Zarrin, M., Wellnitz, O., Dorland, H. A. Van, Bruckmaier, R. M., " Induced hyperketonemia affects the mammary immune response during lipopolysaccharide challenge in dairy cows", *Journal of Dairy Science*, vol. 97, no 1, (2014), 330–339.
192. Holtenius, K., Agena, S., Delavaud, C., Chilliard, Y, " Effects of Feeding Intensity During the Dry Period . 2 . Metabolic and Hormonal Responses", *Journal of Dairy Science*, vol. 86, no 3, (2003), 883–891.
193. Zhang, G., Dervishi, E., Dunn, S. M., Mandal, R., Liu, P., Han, B., Wishart, D. S., Ametaj, B. N, "Metabotyping reveals distinct metabolic alterations in ketotic cows and identifies early predictive serum biomarkers for the risk of disease", *Metabolomics*, vol. 13, no 4, (2017), 43.
194. Rhyu, H., Cho, S., " The effect of weight loss by ketogenic diet on the body composition , performance-related physical fitness factors and cytokines of Taekwondo athletes", vol. 10, no 5, (2014), 326–331.
195. Wright, C., Simone, N. L., " Obesity and tumor growth : inflammation , immunity , and the role of a ketogenic diet", *Clinical Nutrition And Metabolic Care*, vol. 19, (2016), 1–6.
196. Lussier, D. M., Woolf, E. C., Johnson, J. L., Brooks, K. S., Blattman, J. N., Scheck, A. C.," Enhanced immunity in a mouse model of malignant glioma is mediated by a therapeutic ketogenic diet", *BMC Cancer*, vol. 16, (2016), 1–10.
197. Rho, J. M.," How Does The Ketogenic Diet Induce Anti-Seizure Effects?", *Neuroscience Letters*, vol. 637, (2017), 4–10.
198. Ribeiro, E. S., Lima, F. S., Greco, L. F., Bisinotto, R. S., Monteiro, A. P. A., Favoreto, M., Ayres, H., Marsola, R. S., Thatcher, W.W., Santos, J.E.P., "Prevalence of periparturient diseases and effects on fertility of seasonally calving grazing dairy cows supplemented with concentrates", *Journal of Dairy Science*, vol. 96, no 9, (2013), 5682–5697.
199. Lucy, M. C.,"Functional Differences in the Growth Hormone and Insulin-like Growth Factor Axis in Cattle and Pigs : Implications for Post-partum Nutrition and Reproduction The Somatotropic Axis in Post-partum Cattle", *Reproduction in Domestic Animals*, vol. 43, (2008), 31–39.
200. Williams, L. M., Williams, L. M., "Hypothalamic dysfunction in obesity and brain signalling", *Symposium III: Brain signalling and onward communications Hypothalamic dysfunction in obesity Proceedings of the Nutrition Society*, No. September, (2012), 1-13.
201. Adenosine, A., Mayer, C. M., Belsham, D. D., "Palmitate Attenuates Insulin Signaling and Induces Endoplasmic Reticulum Stress and Apoptosis in Hypothalamic Neurons : Rescue of Monophosphate-Activated Protein Kinase Activation", *Endocrinology* , vol. 151, (2010), 576–585.
202. Jaillard, T., Roger, M., Galinier, A., Guillou, P., Benani, A., Leloup, C., Casteilla, L., Penicaud, L., Lorsignol, A., " Hypothalamic Reactive Oxygen Species Are Required for Insulin-Induced Food Intake Inhibition, *Diabetes* , vol. 58, (2009),

- 1544–1549.
203. Nanda, A. S., Ward, W. R., Dobson, H., "Lack of LH response to oestradiol treatment in cows with cystic ovarian disease and effect of progesterone treatment or manual rupture", *Research in Veterinary Science*, vol. 51, (1991), 180–184.
  204. Dobson, H., Nanda, A. S., Wirral, S., "Reliability of cyst diagnosis and effect of energy status on LH", *Theriogenology*, vol. 37, no 2, (1991), 465-472.
  205. Vanholder, T., Leroy, J. L. M. R., Van Soom, A., Coryn, M., De Kruif, A., Opsomer, G., "Effects of  $\beta$ -OH butyrate on bovine granulosa and theca cell function in vitro", *Reproduction in Domestic Animals*, vol. 41, no 1, (2006), 39–40.
  206. Rhodes, M. E., Talluri, J., Harney, J. P., Frye, C. A., "Ketogenic diet decreases circulating concentrations of neuroactive steroids of female rats", *Epilepsy & Behavior*, vol. 7, (2005), 231–239.
  207. Vanholder, T., Leroy, J., Dewulf, J., Duchateau, L., Coryn, M., Kruif, A. De, Opsomer, G., "Hormonal and Metabolic Profiles of High-yielding Dairy Cows Prior to Ovarian Cyst formation or First Ovulation Post Partum", *Reproduction in Domestic Animals*, vol. 40, no 5, (2005), 460–467.
  208. Mu, Y., Yanase, T., Nishi, Y., Tanaka, A., "Saturated FFAs , Palmitic Acid and Stearic Acid , Induce Apoptosis in Human Granulosa Cells", *Endocrinology*, vol. 142, no 8, (2001), 3590–3597.
  209. Lu Z.H., Mu Y.M., Wang B. A., Li X.L., Lu J.M., Li J.Y., Pan C.T., "Saturated free fatty acids, palmitic acid and stearic acid, induce apoptosis by stimulation of ceramide generation in rat testicular Leydig cell", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 303, (2003), 1002–1007.
  210. Amsterdam, A., Dantes, A., Selvaraj, N., Aharoni, D., "Apoptosis in steroidogenic cells : Structure-function analysis", *Steroids*, vol. 62, (1997), 207–211.
  211. Leroy, J. L. M. R., Vanholder, T., Delanghe, J. R., Opsomer, G., "Metabolic changes in follicular fluid of the dominant follicle in high-yielding dairy cows early post partum", *Theriogenology*, vol. 62, no 6, (2004), 1131–1143.
  212. Jorritsma, R., Groot, M. W. De, Vos, P. L. A. M., Kruif, T. A. M., "Acute fasting in heifers as a model for assessing the relationship between plasma and follicular fluid NEFA concentrations", *Theriogenology*, vol. 60, (2003), 151–161.
  213. Schneider, A., Corrêa, M. N., Butler, W. R., "Association between growth hormone receptor Alu I polymorphism and fertility of Holstein cows", *Theriogenology*, vol. 80, no 9, (2013), 1061–1066.
  214. Dupont, J., Scaramuzzi, R. J., Reverchon, M, "The effect of nutrition and metabolic status on the development of follicles , oocytes and embryos in ruminants", *animal*, vol. 8, no 7, (2014), 1031–1044.
  215. Kawashima, C., Munakata, M., Shimizu, T., Miyamoto, A., Kida, K., "Relationship between the degree of insulin resistance during late gestation and postpartum

- performance in dairy cows and factors that affect growth and metabolic status of their calves", *Journal of Veterinary Medical Science*, vol. 78, no 5, (2016), 739-745 .
216. Karamouti, M., Kollia, P., Ph, D., Kallitsaris, A, "Growth hormone , insulin-like growth factor I , and leptin interaction in human cultured lutein granulosa cells steroidogenesis", *Fertility and Sterility*, vol. 90, no 2, (2008), 1444-1450 .
  217. Yung, M. C., Vandehaar, M. J., Fogwell, R. L., Sharma, B. K., Yung, M. C., Vandehaar, M. J., Fogwell, R. L., Sharma, B. K. E., "Effect of energy balance and somatotropin on insulin-like growth factor I in serum and on weight and progesterone of corpus luteum in heifers", *J Anim Sci*, vol. 74, (1996), 2239–2244.
  218. Spicer, L. J., Aad, P. Y, " Insulin-Like Growth Factor ( IGF ) 2 Stimulates Steroidogenesis and Mitosis of Bovine Granulosa Cells Through the IGF1 Receptor : Role of Follicle-Stimulating Hormone and IGF2 Receptor ", *Biology of Reproduction*, vol. 77 , (2007), 18–27.
  219. Butler, W. R., " Energy balance relationships with follicular development , ovulation and fertility in postpartum dairy cows", *Livestock Production Science*, vol. 83, (2003), 211–218.
  220. Cheong, S. H., Filho, O. G. S., Absalón-medina, V. A., Pelton, S. H., Butler, W. R., Gilbert, R. O, "Metabolic and Endocrine Differences between Dairy Cows that Do or Do Not Ovulate First Postpartum Dominant Follicles", *Biology of Reproduction*, vol. 94, no 1, (2015), 1-11.
  221. Davoren, J. B., Kasson, B. G., Li, C. H. A. O., Hsueh, A. J. W., "Specific Insulin-Like Growth Factor (IGF) I- and II-Binding Sites on Rat Granulosa Cells: Relation to IGF Action", *Endocrinology*, vol. 119, no 5, (1986), 2155–2162.
  222. Hammon, D. S., Evjen, I. M., Dhiman, T. R., Goff, J. P., Walters, J. L., " Neutrophil function and energy status in Holstein cows with uterine health disorders", vol. 113, (2006), 21–29.
  223. Martinez, N., Risco, C. A., Lima, F. S., Bisinotto, R. S., Greco, L. F., Ribeiro, E. S., Maunsell, F., Galvão, K, " Evaluation of peripartal calcium status , energetic profile , and neutrophil function in dairy cows at low or high risk of developing uterine disease", *Journal of Dairy Science*, vol. 95, no12, (2012), 7158–7172.
  224. Jeon, S. J., Cunha, F., Ma, X., Martinez, N., Vieira-neto, A., Daetz, R., Bicalho, R. C., Lima, S., Santos, J. E. P., Jeong, C., Galv, K. N, "Uterine Microbiota and Immune Parameters Associated with Fever in Dairy Cows with Metritis", *PloSone*, vol. 11, (2016), 1–17.
  225. Contreras, G. A., Raphael, W., Mattmiller, S. A., Gandy, J., Sordillo, L. M., " Nonesterified fatty acids modify inflammatory response and eicosanoid biosynthesis in bovine endothelial cells", *Journal of Dairy Science*, vol. 95, no 9, (2012), 5011–5023.
  226. Sheldon, I. M., Wathes, D. C., Dobson, H., "The management of bovine reproduction in elite herds", *The Veterinary Journal*, vol. 171, (2006), 70–78.

227. Yuan, K., Mendonça, L. G. D., Hulbert, L. E., Mamedova, L. K., Muckey, M. B., Shen, Y., Elrod, C. C., Bradford, B. J., "Yeast product supplementation modulated humoral and mucosal immunity and uterine inflammatory signals in transition dairy cows", *Journal of Dairy Science*, vol. 98, no 5, (2015), 3236-3246.
228. Dervishi, E., Zhang, G., Hailemariam, D., Ali, S., Deng, Q., Dunn, S. M., Ametaj, B. N., "Alterations in innate immunity reactants and carbohydrate and lipid metabolism precede occurrence of metritis in transition dairy cows", *Research in Veterinary Science*, vol. 104, (2016), 30–39.
229. Huszenicza, G.Y., Kulcsár, M., Kóródi, P., Bartyik, J., Rudas, P., Ribiczei-Szabó, P., Nikoli Judith, A.N.A., Amanc, H., Ivanov, I., Gvozdi, Dhuszenicza, G.Y., Kulcsár, M., Kóródi, P., Bartyik, J., Rudas, P., Ribiczei-Szabó, P., Nikoli Judith, A.N.A., Amanc, H., I. I., G. D., "Adrenocortical And Thyroid Function, Hormone And Metabolite Profiles And The Onset Of Ovarian Cyclicity In Dairy Cows Suffering From Various Forms Of Ketosis", *Acta Veterinaria (Beograd)*, vol. 56, no 1, (2006), 25–36.
230. Forde, N., Duffy, G. B., Mcgettigan, P. A., Browne, J. A., Mehta, J. P., Kelly, A. K., Sandra, O., Loftus, B. J., Crowe, M. A., Fair, T., Roche, J. F., Lonergan, P., Evans, A. C. O., Forde, N., Gb, D., Pa, M., Ja, B., Jp, M., Sandra, O., Bj, L., Ma, C., Fair, T., Jf, R., Lonergan, P., Aco, E., "Evidence for an early endometrial response to pregnancy in cattle: both dependent upon and independent of interferon tau", *Physiol Genomics*, vol. 44, (2012), 799–810.
231. Lonergan, P., Fair, T., Forde, N., Rizos, D., "Embryo development in dairy cattle", *Theriogenology*, vol. 86, no 1, (2016), 270–277.
232. Leroy, J., Vanholder, T., Kneysel, A. T. M. Van, Bols, P. E. J., "Nutrient Prioritization in Dairy Cows Early Postpartum: Mismatch Between Metabolism and Fertility? From Phylogenetically Driven to Genetically Enforced Nutrient Prioritization: The Consequences on Metabolism", *Reprod Dom Anim*, vol. 43, (2008), 96–103.
233. Leroy, J., Vanholder, T., Opsomer, G., Soom, A. Van, De Kruif, A., "The In Vitro Development of Bovine Oocytes after Maturation in Glucose and  $\beta$ -Hydroxybutyrate Concentrations Associated with Negative Energy Balance in Dairy Cows", *Reprod Dom Anim*, vol. 41, (2006), 119–123.
234. Endo, R., Ishii, A., Nakanishi, A., Nabenishi, H., Ashizawa, K., Tsuzuki, Y., "Effect of the Addition of  $\beta$ -Hydroxybutyrate to Chemically Defined Maturation Medium on the Nuclear Maturation, Sperm Penetration and Embryonic Development of Porcine Oocytes In vitro", *Asian-Aust. J. Anim. Sci*, vol. 23, no 11, (2010), 1421–1426.
235. Tsuzuki, Y., Ikeuchi, K., Nabenishi, H., Ashizawa, K., Frqfhwudwlrqv, Y., Dqg, P., "Effect of  $\beta$ -hydroxybutyrate Added to Maturation Medium on Nuclear Maturation of Pig Oocytes", *Journal of Mammalian Ova Research*, vol. 26, no 3, (2009), 153–158.
236. Kim, J. Y., Kinoshita, M., Ohnishi, M., Fukui, Y., "Lipid and fatty acid analysis of fresh and frozen – thawed immature and in vitro matured bovine oocytes", *Reproduction*, vol. 122, (2001), 131–138.

237. Fair, T., Murphy, M., Rizos, D., Moss, C., Martin, F., Boland, M. P., Lonergan, P., "Analysis of Differential Maternal mRNA Expression in Developmentally Competent and Incompetent Bovine Two-Cell Embryos", *Molecular Reproduction And Development*, vol. 144 , (2004), 136–144.
238. Rizos, D., Maillo, V., Lonergan, P., "In vitro embryo culture models “mimicking” physiological conditions", *Proceedings of the 30th Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology Society (SBTE); Foz do Iguaçu, PR, Brazil*, (2016), 355–374.
239. Marei, W.F., Wathes, D.C., Fouladi-Nashta, A.A, " Differential effects of linoleic and alpha-linolenic fatty acids on spatial and temporal mitochondrial distribution and activity in bovine oocytes", *Reproduction, Fertility and Development* , vol. 24, (2012), 679–690.
240. Leroy, J. L. M. R., Vanholder, T., Mateusen, B., Christophe, A., Opsomer, G., Kruif, A. De, Genicot, G., Van-Soom, A," Non-esterified fatty acids in follicular fluid of dairy cows and their effect on developmental capacity of bovine oocytes in vitro", *Reproduction* , vol. 130, (2005), 485-495.
241. Desmet, K. L. J., Marei, W. F., Merckx, E., Bols, P. E. J., Leroy, J. L. M. R, " Effect of non-esterified fatty acids during sperm capacitation or IVF on developmental competence of bovine oocytes", *BMC Genomics*, vol. 13, no 3, (2016), 634.
242. Fouladi-Nashta, A. A., Gutierrez, C. G., Gong, J. G., Garnsworthy, P. C., Webb, R., Le, L., Kingdom, U, " Impact of Dietary Fatty Acids on Oocyte Quality and Development in Lactating Dairy Cows ", *Biology of Reproduction*, vol. 17, (2007), 9–17.
243. Leroy, J., Opsomer, G., Soom, A. Van, Goovaerts, I. G. F., Bols, P. E. J, " Reduced Fertility in High-yielding Dairy Cows: Are the Oocyte and Embryo in Danger? Part I The Importance of Negative Energy Balance and Altered Corpus Luteum Function to the Reduction of Oocyte and Embryo Quality in High-yielding Dairy Cows, *Reprod Dom Anim*, vol. 43, (2008), 612–622.
244. Rizzo, A., Roscino, M. T., Binetti, F., Sciorsci, R. L, " Review Article Roles of Reactive Oxygen Species in Female Reproduction", *Reprod Dom Anim*, vol. 47, (2012), 344–352.
245. Fujii, J., Luchi, Y., Okada, F., " Fundamental roles of reactive oxygen species and protective mechanisms in the female reproductive system", *Reproductive Biology and Endocrinology*, vol. 43, (2005), 1–10.
246. Celi, ., Merlo, M., Da Dalt, L ., Stefani, A., Barbato ,O., Gabai, G., "Relationship between late embryonic mortality and the increase in plasma advanced oxidised protein products ( AOPP ) in dairy cows", *Reproduction, Fertility and Development* , vol. 23, (2011), 527–533.
247. Ocaia Quero, J.. Moreno Mill, M. M., Valera Cordoba, M., Rodero Franganillo, A," The influence of different types of media supplement on the melotlc matura'hon of bovine oocytes in vitro", *Theriogenology*, vol. 41, (1994), 405–411.

248. Ali, A," Effect of the Absence or Presence of Various Protein Supplements on Further Development of Bovine Oocytes During In Vitro Maturation", *Biology Of Reproduction*, vol. 66, (2002), 901–905.
249. Kalousov, M., Skrha, J., "Advanced glycoxidation end products in chronic diseases — clinical chemistry and genetic background", *Mutation Research*, vol. 579, (2005), 37–46.
250. Santulli, P., Borghese, B., Lemaréchal, H., Leconte, M., Millischer, A., Batteux, F., Chapron, C., Borderie, D., " Increased Serum Oxidative Stress Markers in Women with Uterine Leiomyoma", *ploSOne*, vol. 8, no 8 (2013), 1–10.
251. Senosy, W. S., Izaike, Y., Osawa, T, " Influences of Metabolic Traits on Subclinical Endometritis at Different Intervals Postpartum in High Milking Cows", *Reprod Dom Anim*, vol. 47, no 4, (2012), 666–674.
252. Sata, R., Tsujii, H., Abe, H., Yamashita, S., " Fatty Acid Composition of Bovine Embryos Cultured in Serum- Free and Serum-Containing Medium during Early Embryonic", *Journal of Reproduction and Development*, vol. 45, no 1, (1999), 97–103 .
253. Abe, H., Sendai, Y., Satoh, T., Hoshi, H., "Bovine oviductspecific glycoprotein: A potent factor for maintenance of viability and motility of bovine spermatozoa in vitro", *Molecular Reproduction and Development*, vol. 42, no 2, (1995), 226–232.
254. Drury, M.I., Frci, M., Alphonsus, T., Greene, M., Mrcog, D. M., "Pregnancy complication by clinical diabetes mellitus, obstetric and gynecology", vol. 49, no 5, (1977), 519–522.
255. Montoro, M. N., Myers, V. P., Mestman, J. H., Yunhua, X., Anderson, B. G., Golde, S. H, " Outcome of pregnancy in diabetic ketoacidosis", *American Journal Of Perinatology*, vol. 10, no 1, (1993), 17–20.
256. Gomez, E., Duque, P.,Diaz, E., Facal, N., Antolin, I., Hidalgo, D. C., "Effects of acetoacetate and D - b -hydroxybutyrate on bovine in vitro embryo development in serum-free medium", vol. 57, *Theriogenology*, (2002), 1551–1562.
257. Sandra, O, Constant, F., Carvalho, A.V., Eozénou, C., Valour, D., Mauffré, V., Hue, I., "Maternal organism and embryo biosensing: insights from ruminants, *Journal of Reproductive Immunology*", vol. 108, (2015), 105–113.
258. Desmet, K. L. J., Van Hoeck, V., Gagné, D., Fournier, E., Thakur, A., O'Doherty, A. M., Walsh, C. P., Sirard, M. A., Bols, P. E. J., Leroy, J. L. M. R., "Exposure of bovine oocytes and embryos to elevated non-esterified fatty acid concentrations: integration of epigenetic and transcriptomic signatures in resultant blastocysts", *BMC Genomics*, vol. 17, no 1, (2016), 1004.
259. Hugentobler, S. A., Humpherson, P. G., Leese, H. J., Sreenan, J. M., Morris, D. G., "Energy Substrates in Bovine Oviduct and Uterine Fluid and Blood Plasma During the Oestrous Cycle", *Molecular Reproduction And Development*, vol. 75, (2008), 496–503.
260. Miodovnik, M., Skillman, C. A., Hertzberg, V., Harrington, D. J., Clark, K. E., "Effect of maternal hyperketonemia in hyperglycemic pregnant ewes and their

- fetuses", *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, vol. 154, no 2, (1986), 394–401.
261. Suarez, S. S, " Regulation of sperm storage and movement in the mammalian oviduct, *International Journal of Developmental Biology*, vol. 52, no (5–6), (2008), 455–462.
  262. Meara, C. M. O., Hanrahan, J. P., Prathalingam, N. S., Owen, J. S., Donovan, A., Fair, S., Ward, F., Wade, M., Evans, A. C. O., Lonergan, P., "Relationship between in vitro sperm functional tests and in vivo fertility of rams following cervical artificial insemination of ewes with frozen-thawed semen", *Theriogenology*, vol. 69, (2008), 513–522.
  263. Mcknight, K., Hoang, H. D., Prasain, J. K., Brown, N., Vibbert, J., Hollister, K. A., Moore, R., Ragains, J. R., Reese, J., Miller, M. A, " Supplementary Materials for Neurosensory Perception of Environmental Cues Modulates Sperm Motility Critical for Fertilization", *Science*, vol. 344, (2014), 754- 757.
  264. Vanitallie, T. B., Nufert, T. H, "Ketones: Metabolism's Ugly Duckling", *Nutrition Reviews*, vol. 61, no 10, (2003), 327–341.
  265. Mansour, N., Lahnsteiner, F., Berger, B., "Metabolism of intratesticular spermatozoa of a tropical teleost fish (*Clarias gariepinus*)", *Comparative Biochemistry and Physiology*, vol. 135, (2003), 285–296.
  266. Ingvarsten, K. L., "Feeding- and management-related diseases in the transition cow Physiological adaptations around calving and strategies to reduce feeding-related diseases" , *Animal Feed Science and Technology*, vol. 126, (2006), 175–213.
  267. Zhang, Z., Liu, G., Wang, H., Li, X., Wang, Z., "Detection of subclinical ketosis in dairy cows", *Pakistan Veterinary Journal*, vol. 32, no 2, (2012), 156–160.
  268. Dubuc, J., Duffield, T. F., Leslie, K. E., Walton, J. S., Leblanc, S. J, "Randomized clinical trial of antibiotic and prostaglandin treatments for uterine health and reproductive performance in dairy cows", *Journal of dairy science*, vol. 94, no 3, (2011), 1325–1338.
  269. Huedo-medina, T. B., Sa, J., Botella, J., " Assessing Heterogeneity in Meta-Analysis: Q Statistic or I 2 Index ?", *Psychological Methods* , vol. 11, no 2, (2006), 193–206.
  270. Viechtbauer, W., " Conducting Meta-Analyses in R with the metafor Package", *Journal of Statistical Software*, 36 (3), (2010), 1–48.
  271. Leblanc, S. J., Herdt, T. H., Seymour, W. M., Duffield, T. F., Leslie, K. E, " Peripartum Serum Vitamin E , Retinol , and Beta-Carotene in Dairy Cattle and Their Associations with Disease", *Journal of Dairy Science*, vol. 87, no 3, (2004), 609–619.
  272. Quiroz-rocha, G. F., Leblanc, S. J., Duffield, T. F., Wood, D., Leslie, K. E., Jacobs, R. M., " Reference limits for biochemical and hematological analytes of dairy cows one week before and one week after parturition", *Can Vet J*, vol. 50, (2009), 383–388.

273. Chapinal N, Carson M, Duffield TF, capel M, Godden S, Overton, Santos EP, L. S, "The association of serum metabolites with clinical disease during the transition period", *Journal of Dairy Science*, vol. 94, (2011), 4897–4903.
274. Quiroz-Rocha, G. F., LeBlanc, S. J., Duffield, T. F., Jefferson, B., Wood, D., Leslie, K. E., Jacobs, R. M., " Short communication: Effect of sampling time relative to the first daily feeding on interpretation of serum fatty acid and beta-hydroxybutyrate concentrations in dairy cattle", *Journal of dairy science*, vol. 93, no 5, (2010), 2030–2033.
275. Schwarzer, G., Carpenter, J. R., Rücker, G., " *Meta-Analysis with R*", first edition, Springer, Ed.; (2015), pp 256.
276. Garverick, H. a, Harris, M. N., Vogel-Bluel, R., Sampson, J. D., Bader, J., Lamberson, W. R., Spain, J. N., Lucy, M. C., Youngquist, R. S., "Concentrations of nonesterified fatty acids and glucose in blood of periparturient dairy cows are indicative of pregnancy success at first insemination", *Journal of dairy science*, vol. 96, no 1, (2013), 181–188.
277. Oetzel, G. R., " Understanding the Impact of Subclinical Ketosis, 24th Ruminant Nutrition Symposium", (2015), 15–26.
278. Sordillo, L. M., Raphael, W., "Significance of Metabolic Stress, Lipid Mobilization, and Inflammation on Transition Cow Disorders", *Veterinary Clinics of NA: Food Animal Practice*, vol. 29, no 2, (2013), 267–278.
279. Wathes, D. C., Fenwick, M., Cheng, Z., Bourne, N., Llewellyn, S., Morris, D. G., Kenny, D., Murphy, J., Fitzpatrick, R., " Influence of negative energy balance on cyclicity and fertility in the high producing dairy cow", *Theriogenology*, vol. 68 (SUPPL. 1), (2007), 232–241.
280. Bobe, G., Young, J. W., Beitz, D. C, " Invited review: pathology, etiology, prevention, and treatment of fatty liver in dairy cows", *Journal of dairy science*, vol. 87, no10, (2004), 3105–3124.
281. Abdelli, A., Raboisson, D., Ibrahim, B., Kalem, A., Kaidi, R., Iguer-ouada, M., "Elevated non-esterified fatty acid and  $\beta$ -hydroxybutyrate in transition dairy cows and their association with reproductive performance and disorders: A meta-analysis", *Theriogenology*, vol. 93, (2017), 99-104.
282. Mulligan, F. J., Grady, L., Rice, D. A., Doherty, M. L., " A herd health approach to dairy cow nutrition and production diseases of the transition cow", *Animal Reproduction Science*, vol. 96, no (3–4), (2006), 331–353.
283. Edmonson, A. J., Lean, I. J., Weaver, L. D., Farver, T., Webster, G., "A Body Condition Scoring Chart for Holstein Dairy Cows", *Journal of Dairy Science*, vol. 72, no 1, (1989), 68–78.
284. Hammon, H. M., Stürmer, G., Schneider, F., Tuchscherer, A., Blum, H., Engelhard, T., Genzel, A., Staufenbiel, R., Kanitz, W., "Performance and metabolic and endocrine changes with emphasis on glucose metabolism in high-yielding dairy cows with high and low fat content in liver after calving", *Journal of dairy science*, vol. 92, no 4, (2009), 1554–1566.

285. Grummer, R. R., "Nutritional and management strategies for the prevention of fatty liver in dairy cattle", *The Veterinary Journal*, vol. 176, no 1, (2008), 10–20.
286. Mcnamara, J. P., Hillers, J. K., "Adaptations in lipid metabolism of bovine adipose tissue in lactogenesis and lactation", *Journal of Lipid Research*, vol. 27, (1986), 150–157.
287. Weber, M., Locher, L., Huber, K., Rehage, J., Tienken, R., Meyer, U., Dänicke, S., Webb, L., Sauerwein, H., Mielenz, M., " Longitudinal changes in adipose tissue of dairy cows from late pregnancy to lactation. Part 2: The SIRT-PPARGC1A axis and its relationship with the adiponectin system", *Journal of dairy science*, vol. 99, no 2, (2016), 1560–1570.
288. Gerspach, C., Imhasly, S., Gubler, M., Naegeli, H., Ruetten, M., Laczko, E., "Altered plasma lipidome profile of dairy cows with fatty liver disease", *Research in Veterinary Science*, vol. 110, (2017), 47–59.
289. Reynolds, C. K., Aikman, P. C., Lupoli, B., Humphries, D. J., Beever, D. E., " Splanchnic Metabolism of Dairy Cows During the Transition From Late Gestation Through Early Lactation", *Journal of Dairy Science*, vol. 86, no 4, (2003), 1201–1217.
290. Dolinsky, V. W., Gilham, D., Hatch, G. M., Agellon, L. B., Lehner, R., Vance, D. E, Regulation of triacylglycerol hydrolase expression by dietary fatty acids and peroxisomal proliferator-activated receptors", *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1635, (2003), 20–28.
291. Bjerre-Harpøth ,V., Friggens, N. C., Thorup, V. M., Larsen, T., Damgaard, B. M., Moyes, K. L. I., "Metabolic and production profiles of dairy cows in response to decreased nutrient density to increase physiological imbalance at different stages of lactation", *Journal of Dairy Science*, vol. 95, no 5, (2012), 2362–2380.
292. Akbari, H., Hadian, M., Boston, R. C., "Experimental hyperlipidemia induces insulin resistance in sheep", *Domestic Animal Endocrinology*, vol. 53, (2015), 95–102.
293. Koeck, A., Jamrozik, J., Schenkel, F. S., Moore, R. K., Lefebvre, D. M., Kelton, D. F., Miglior, F, "Genetic analysis of milk  $\beta$ -hydroxybutyrate and its association with fat-to-protein ratio, body condition score, clinical ketosis, and displaced abomasum in early first lactation of Canadian Holsteins", *Journal of Dairy Science*, vol. 97, no 11, (2014), 7286–7292.
294. Kaufman, E. I., Leblanc, S. J., McBride, B. W., Duffield, T. F., Devries, T. J., " Association of rumination time with subclinical ketosis in transition dairy cows", *J. Dairy Sci*, vol. 99, no 7, (2016), 5604–5618.
295. Roche, J. R., Meier, S., Heiser, A., Mitchell, M. D., Walker, C. G., Crookenden, M. A., Riboni, M. V., Loor, J. J., Kay, J. K., " Effects of precalving body condition score and prepartum feeding level on production , reproduction , and health parameters in pasture-based transition dairy cows", *Journal of Dairy Science*, vol. 98, no 10, (2015), 7164–7182.
296. Akbar, H., Grala, T. M., Riboni, M. V., Cardoso, F. C., Verkerk, G., Mcgowan, J.,

- Macdonald, K., "Body condition score at calving affects systemic and hepatic transcriptome indicators of inflammation and nutrient metabolism in grazing dairy cows", *Journal of Dairy Science*, vol. 98, no 2, (2015), 1019–1032.
297. Huzzey, J. M., Nydam, D. V, Grant, R. J., Overton, T. R., " Associations of prepartum plasma cortisol , haptoglobin , fecal cortisol metabolites , and nonesterified fatty acids with postpartum health status in Holstein dairy cows", *Journal of Dairy Science*, vol. 94, no 12, (2011), 5878–5889.
298. Taylor, V. J., Beever, D. E., Bryant, M. J., Wathes, D. C., "Metabolic profiles and progesterone cycles in first lactation dairy cows", *Theriogenology*, vol. 59, no 7, (2003), 1661–1677.
299. Rooke, J. A., Ewen, M., Mackie, K., Staines, M. E., Mcevoy, T. G., Sinclair, K. D., "Effect of ammonium chloride on the growth and metabolism of bovine ovarian granulosa cells and the development of ovine oocytes matured in the presence of bovine granulosa cells previously exposed to ammonium chloride", *Animal Reproduction Science* , vol. 84, (2004), 53–71.
300. Robinson, J. J., Ashworth, C. J., Rooke, J. A., Mitchell, L. M., McEvoy, T. G., " Nutrition and fertility in ruminant livestock", *Animal Feed Science and Technology*, vol. 126, no (3–4), (2006), 259–276.
301. Roca J, Vazquez JM, Gil MA, Cuello C, I Parrilla, M. E., "Challenges in Pig Artificial Insemination ", *Reprod Dom Anim*, vol. 41, (Suppl.2), (2006), 43–53.
302. Mcknight, K., . Hoang, H.D., Prasain, J.K., Brown, N., Vibbert, N., Hollister, K.A., Moore, R., Ragains, J.R., Reese, J., Miller, M.A., " Neurosensory Perception of Environmental Cues Modulates Sperm Motility Critical for Fertilization", *Science*, vol. 344, (2014), 754-757.
303. Ledesma, A., Fern??ndez-Alegre, E., Cano, A., Hozbor, F., Mart??nez-Pastor, F., Cesari, A., "Seminal plasma proteins interacting with sperm surface revert capacitation indicators in frozen-thawed ram sperm", *Animal Reproduction Science*, vol. 173, (2016), 35–41.
304. Mouloud, M. N., Ouennoughi, F., Yaiche, L., Kaidi, R., Iguer-ouada M., "Effects of female bovine plasma collected at different days of the estrous cycle on epididymal spermatozoa motility", *Theriogenology*, vol. 91, (2017), 44-54.
305. Tillard, E., Humblot, P., Faye, B., Lecomte, P., Dohoo, I., Bocquier, F, "Postcalving factors affecting conception risk in Holstein dairy cows in tropical and sub-tropical conditions", *Theriogenology*, vol. 69, no 4, (2008), 443–457.
306. Jeong, J. K., Choi, I. S., Kang, H. G., Hur, T. Y., Jung, Y. H., Kim, I. H., "A Relationship between serum metabolites, body condition, peri- and postpartum health and resumption of postpartum cyclicity in dairy cows", *Livestock Science*, vol. 81, (2015), 31–37.
307. Carvalho, P. D., Souza, A. H., Amundson, M. C., Hackbart, K. S., Fuenzalida, M. J., Herlihy, M. M., " Relationships between fertility and postpartum changes in body condition and body weight in lactating dairy cows", *Journal of Dairy Science*, vol. 97, no 6, (2014), 3666–3683.

308. Bryant, J., López-Villalobos, N., Holmes, C., Pryce, J., " Simulation modelling of dairy cattle performance based on knowledge of genotype, environment and genotype by environment interactions: Current status", *Agricultural Systems*, vol. 86, no 2, (2005), 121–143.
309. Domecq, J. J., Skidmore, a L., Lloyd, J. W., Kaneene, J. B., " Relationship Between Body Condition Scores and Conception at First Artificial Insemination in a Large Dairy Herd of High Yielding Holstein Cows", *J. Dairy Sci.*, vol. 80, no 1, (1997), 113–120.
310. Beam, S. W., Butler, W. R., "Energy Balance, "Metabolic Hormones, and Early Postpartum Follicular Development in Dairy Cows Fed Prilled Lipid", *Journal of Dairy Science*, vol. 81, no 1, (1998), 121–131.
311. Buckley, F., Sullivan, K. O., Mee, J. F., Evans, R. D., Dillon, P., " Relationships Among Milk Yield , Body Condition , Cow Weight , and Reproduction in Spring-Calved Holstein-Friesians", *J. Dairy Sci*, vol. 86, (2003), 2308–2319.
312. Santos, J. E. P., Rutigliano, H. M, "Risk factors for resumption of postpartum estrous cycles and embryonic survival in lactating dairy cows", *J. Dairy Sci* , vol. 110, (2009), 207–221.
313. Taylor, V. J., Beever, D. E., Bryant, M. J., Wathes, D. C., "Metabolic profile les and progesterone cycles in first lactation dairy cow"s, *Theriogenology*, vol. 59, (2003), 1661-1677.
314. Loeffler, S. H., de Vries, M. J., Schukken, Y. H, " The effects of time of disease occurrence, milk yield, and body condition on fertility of dairy cows", *Journal of dairy science*, vol. 82, vol. 12, (1999), 2589–2604.
315. Hakima, N., Sermondade, N., Sifer, C, " Causes spermatiques et échecs de fécondance : quelles explorations autres que le spermogramme ? Can specialized sperm analysis predict fertilization ability?", *Gynecologie Obstetrique et Fertilité*, vol. 40, vol. 9, (2012), 543–548.
316. Contri, A., Valorz, C., Faustini, M., Wegher, L., Carluccio, A., " Effect of semen preparation on casa motility results in cryopreserved bull spermatozoa", *Theriogenology*, vol. 74, no 3, (2010), 424–435.
317. Quintero-moreno, A., Rigau, T., Rodri, J. E., " Regression analyses and motile sperm subpopulation structure study as improving tools in boar semen quality analysis", vol. 61, (2004), 673–690.
318. Agarwal, A., Sharma, R. K., Nelson, D. R., "New semen quality scores developed by principal component analysis of semen characteristics", *Journal of andrology*, vol. 24, no 3, (2003), 343–352.
319. Larroze, S ., Pickford, D.B., Holt, W.V., " Validation of computer-assisted sperm-motility analysis in the amphibian *Silurana tropicalis*", *Reproduction, Fertility and Development*, vol. 27, (2015), 1049–1056.
320. Bravo, J. A., Montanero, J., Calero, R., Roy, T. J., "Identification of sperm subpopulations with defined motility characteristics in ejaculates from Ile de France rams", *Animal Reproduction Science*, vol. 129, no (1–2), (2011), 22–29.

321. Kanuga, M. K., Drew, R. E., Wilson-Leedy, J. G., Ingermann, R. L., " Subpopulation distribution of motile sperm relative to activation medium in steelhead (*Oncorhynchus mykiss*)", *Theriogenology*, vol. 77, no 5, (2012), 916–925.
322. Abaigar, T., Cano, M., Pickard, A. R., Holt, W. V., "Use of computer-assisted sperm motility assessment and multivariate pattern analysis to characterize ejaculate quality in Mohor gazelles ( *Gazella dama mhorr* ): effects of body weight , electroejaculation technique and short-term semen storage", *Reproduction*, vol. 122, (2001), 265–273.
323. Rubio-Guille, J., Gonzalez, D., Garde, J.J., Estes, M.C., Fernandez-Santos, M.R., Rodriguez- JE, N. M., "Effects of Cryopreservation on Bull Spermatozoa Distribution in Morphometrically Distinct Subpopulations", *Reprod Dom Anim* , vol. 42, (2007), 354–357.
324. Ferraz, M. A. M. M., Morató, R., Yeste, M., Arcarons, N., Pena, A. I., Tamargo, C., Hidalgo, C. O., Muiño, R., Mogas, T., "Theriogenology Evaluation of sperm subpopulation structure in relation to in vitro sperm – oocyte interaction of frozen-thawed semen from Holstein bulls", *Theriogenology*, vol. 81, no 8, (2014), 1067–1072.
325. Ahmed, N., Kathiresan, D., Ahmed, F. A., Lalrintluanga, K., Mayengbam, P., Gali, J. M., " Pattern of induced estrus and conception rate following Ovsynch and Ovsynch based gonadotropin-releasing hormone treatments initiated on day 6 of estrous cycle in repeat breeding crossbred cows", *Veterinary World*, vol. 9, (2016), 342–345.
326. Wathes, D. C., Cheng, Z., Bourne, N., Taylor, V. J., Coffey, M. P., Brotherstone, S., " Differences between primiparous and multiparous dairy cows in the inter-relationships between metabolic traits, milk yield and body condition score in the periparturient period", *Domestic Animal Endocrinology*, vol. 33, no 2, (2007), 203–225.
327. Senger, P. L., McCutchan, J. F., Hillers, J. K., "Influence of blood serum from bulls and heifers on head-to-head agglutination and acrosomal maintenance in bovine spermatozoa", *Biology of reproduction*, vol. 25, no 2, (1981), 433–437.
328. Chen, Y., Foote, R. H., Brockett, C. C., "Effect of sucrose, trehalose, hypotaurine, taurine, and blood serum on survival of frozen bull sperm", *Cryobiology*, vol. 30, (1993), 423–431.
329. Brown, D., Senger, L., " Influence of homologous blood serum on motility and head-to-head agglutination in nonmotile ejaculated bovine spermatozoa", *Biology of reproduction*, vol. 23, (1980), 271–275.
330. Buch, L. H., Sørensen, C., Lassen, J., Christensen, L. G., Sørensen, K., " Factors affecting the exchange of genetic material between nordic and Holstein populations", *J. Dairy Sci*, vol. 92, (2009), 4023–4034.
331. Kamalakannan, D., Baskar, V., Barton, D. M., Abdu, T. A. M., " Diabetic ketoacidosis in pregnancy", *Postgrad Med J*, vol. 79, (2003), 454–457.

332. Bernabucci, U., Ronchi, B., Lacetera, N., Nardone, A., "Markers of oxidative status in plasma and erythrocytes of transition dairy cows during hot season", *Journal of dairy science*, vol. 85, no 9, (2002), 2173–2179.
333. Turk, R., Podpečan, O., Mrkun, J., Kosec, M., Flegar-Meštrić, Z., Perkov, S., Starič, J., Robić, M., Belić, M., Zrimšek, P., "Lipid mobilisation and oxidative stress as metabolic adaptation processes in dairy heifers during transition period", *Animal Reproduction Science*, vol. 141, no (3–4), (2013), 109–115.
334. Sordillo, L. M., Contreras, G. a, Aitken, S. L., "Metabolic factors affecting the inflammatory response of periparturient dairy cows", *Animal health research reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases*, vol. 10, no 1, (2009), 53–63.
335. Sharma, N., Singh, N. K., Singh, O. P., Pandey, V., Verma, P. K., "Oxidative Stress and Antioxidant Status during Transition Period in Dairy Cows", *Asian-Aust. J. Anim. Sci*, vol. 24, no 4, (2011), 479–484.
336. Sariözkan, S., Tuncer, P. B., Büyükleblebici, S., Bucak, M. N., Cantürk, F., Eken, A., "Antioxidative effects of cysteamine, hyaluronan and fetuin on post-thaw semen quality, DNA integrity and oxidative stress parameters in the Brown Swiss bull", *Andrologia*, vol. 47, no 2, (2015), 138–147.
337. Guvvala, P. R., Sellappan, S., Parameswaraiyah, R. J., "Impact of arsenic(V) on testicular oxidative stress and sperm functional attributes in Swiss albino mice", *Environmental Science and Pollution Research*, vol. 23, no 18, (2016), 18200–18210.
338. Agarwal, A., Makker, K., Sharma, R., "Clinical Relevance of Oxidative Stress in Male Factor Infertility: An Update", *American Journal of Reproductive Immunology*, vol. 59, (2008), 2–11.
339. Takei, G. L., Miyashiro, D., Mukai, C., Okuno, M., "Glycolysis plays an important role in energy transfer from the base to the distal end of the flagellum in mouse sperm", *Journal of Experimental Biology*, (2014), p. jeb. 090985.
340. Primakoff, P., Myles, D. G., "Penetration , Adhesion , and Fusion in Mammalian Sperm-Egg Interaction", *Science*, vol. 296, (2014), 2183- 2185.
341. Murphy, S. J., Roldan, E. R. S., Yanagimachi, R., "Effects of Extracellular Cations and Energy Substrates on the Acrosome Reaction of Precapacitated Guinea Pig Spermatozoa", *Gamete Research* , vol. 14, (1986), 1-10.
342. Mukai, C., Okuno, M., "Glycolysis Plays a Major Role for Adenosine Triphosphate Supplementation in Mouse Sperm Flagellar Movement", *Biology Of Reproduction*, vol. 71,(2004), 540–547.
343. Froman, D. P., Kirby, J. D., "Sperm Mobility: Phenotype in Roosters (*Gallus domesticus*) Determined by Mitochondrial Function ", *Biology of Reproduction*, vol. 72, (2005), 562–567.
344. Veech, R. L., "The therapeutic implications of ketone bodies: The effects of ketone bodies in pathological conditions: Ketosis, ketogenic diet, redox states, insulin resistance, and mitochondrial metabolism, Prostaglandins Leukotrienes

- and Essential Fatty Acids", Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids, vol. 70, no 3, (2004), 309–319.
345. O'Shea, T., Voglmayr, J. K, " Metabolism of glucose, lactate, and acetate by testicular and ejaculated spermatozoa of the ram", Biol Reprod, vol. 2, no 2, (1970), 326–332.
  346. Kass, M., Ariko, T., Samarütel, J., Ling, K., Jaakson, H., " Long-term oral drenching of crude glycerol to primiparous dairy cows in early lactation", Animal Feed Science and Technology, vol. 184, no (1–4), (2013), 58–66.
  347. Fabbrini, E., Sullivan, S., Klein, S., " REVIEWS Obesity and Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Biochemical, Metabolic, and Clinical Implications", Hepatology, vol. 51, no 2, (2010), 679–689.
  348. Mulliniks, J., Voy,B., Whitlock ,B., Howard, S., Edwards, S., "Injection of  $\beta$ -hydroxybutyrate in the lateral ventricle suppresses luteinizing hormone release in castrated male lambs", The FASEB Journal , vol. 29, no 1, (2015), 711-755.
  349. Voy, B., Mulliniks, J., Whitlock, B., Howard, S., Edwards, S., Davitt, J., Stanton, M., Das, S., "Influence of Beta-Hydroxybutyrate on Gene Expression of Hypothalamus and Pituitary Tissues in Castrated Male Lambs", The FASEB Journal, vol. 29, no 1, (2015), 75 -85.
  350. Cope, E. R., Voy, B. H., B. K. Whitlock, J. D. Hobbs, Z. D. McFarlane, S. D., Mulliniks, J., " Effect of exogenous  $\beta$ -hydroxybutyrate in the lateral ventricle on circulating serum metabolites and luteinizing hormone in castrated lambs", Joint Annual Meeting, American Society of Animal Science. Salt Lake City, UT, (2016), pp 53.
  351. Sirotkin, A. V., Makarevich, A. V., Hetenyi, L., "Effect of growth hormone and inhibitors of protein kinase a on IGF-I, oxytocin and progesterone release by cultured bovine granulosa cells,"Annales d'Endocrinologie, vol. 61, no 2, (2000), 154–158.
  352. Sirotkin, A. V., "Direct action of growth hormone on bovine ovarian cells: effects on estradiol, oxytocin, vasopressin release by granulosa cells and on oocyte maturation and cleavage in vitro", Annales d'Endocrinologie, vol. 57, no 3, (1996) 219–224.
  353. Schwarzer, G., "Meta: meta-Analysis with R. R package version 1.1-8. 2010". <http://CRAN.R-project.org/package=meta>
  354. Viechtbauer, W., "Metafor: meta-analysis package for R. R package version 1.0-1; 2010", <http://CRAN.R-project.org/package=metafor>
  355. Kalem, .A., Hanzen, C., Abdelli, A ., Kaidi, R., Body condition score, some nutritional parameters in plasma, and subsequent reproductive performance of Montbéliarde cows in Algeria, Livestock Research for Rural Development, vol. 29, no 1, (2017), pp14. <http://www.lrrd.org/lrrd29/1/kale29002.htm>

356. van Soest, P. J., Intermediary metabolism. In P. J. van Soest (Ed.), *Nutritional ecology of the ruminant* (2nd edition). Ithaca and London: Cornell University Press, (1994), pp. 312–324.