



Institut des Sciences
Vétérinaires- Blida

Université Saad
Dahlab-Blida 1-



Mémoire de Master complémentaire
en sciences vétérinaires

**Évaluation du déficit énergétique en *péripartum* chez les vaches
laitières dans la région de Chlef**

Présenté par

AOUAK Imane & BELKHIR Imene

Devant le jury :

Président(e) :	NABI M.	MCA	Université Blida1
Examinatrice :	SAIDJ D.	MCA	Université Blida1
Promoteur :	GHARBI I.	MCA	Université Blida1

Année : 2020-2021

REMERCEMENTS

Nous tentons en premier à remercier « ALLAH » le tout puissant de nous avoir donné la santé, le courage et de la volonté d'entamer et de terminer ce travail.

Tout d'abord, nous tentons à remercier tout particulièrement notre encadreur Dr GHARBI. I maitre de conférences à l'université Saad Dahleb de Blida pour la qualité de son encadrement, pour sa patience, sa rigueur et sa disponibilité durant notre préparation de ce mémoire, nos sincères remerciements et notre profonde gratitude s'adressent à lui.

Nous exprimons également nos vifs remerciements aux membres de jury Mr NABI. M, Mme NABI HADJ OMAR. K et Mme SAIDJ. D pour avoir accepté de juger notre travail.

Enfin, nos remerciements s'adressent aussi à tous les enseignants de l'ISV BLIDA qui ont contribué à notre formation et à l'élaboration de ce travail.

DEDICACES

C'est avec respect et gratitude que je tiens à exprimer toute ma reconnaissance et ma sympathie à :

Mes chers parents pour la patience et l'encouragement qu'ils ont constamment montrés, que ce travail soit la récompense de tous leurs sacrifices, que dieu les protège et les garde. Je ne dirais jamais assez pour exprimer mon amour et mes remerciements : Merci ma très chère mère KADA.F et mon très cher père Aouak. R.

A ma très chère sœur Rima qui m'a toujours soutenu durant toute mes études je lui souhaite une vie pleine de joie, de bonheur et de réussite.

A mon grand-père Kada.A et ma grand-mère.

A ma chère grand-mère paternelle.

A mes amies Nadjiba et Nadine, à mon binôme Imene et toute la famille Aouak et Kada, et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour que ce travail soit possible, je vous dis merci.

Enfin mon plus profond respect va tout droit à mes aimables professeurs dans tous les cycles de ma scolarité qui mon éclairé la voie du savoir.

DEDICACES

J'ai le grand honneur de dédier ce modeste travail :

À mes très chers parents Mama et Papa, qui m'ont donné la vie, qui m'ont aidé et soutenu à tracer ce chemin lumineux que je suis et qui m'ont encouragé tout au long de mes études. Aucun mot ne pourra suffire pour vous exprimer l'amour que je vous porte et votre place dans mon cœur et si maintenant je réalise mon rêve de devenir docteur vétérinaire c'est pour vous et grâce à vous, ce n'est qu'un fruit de vos encouragements et vos précieux conseils et le moindre cadeau que je puisse vous offrir, Mille merci.

Que dieu leur accorde une longue vie.

À mes chères sœurs Dalal et Amina qui ont toujours été à mes côtés. Si chanceuse de vous avoir dans ma vie.

À mon héros et mon bras droit Amine, je t'adore petit frère.

À tous les membres de ma famille (BELKHIR & FRAOUCENE), petits et grands.

Que Dieu vous garde et vous protèges.

À ma chère amie et la meilleure des binômes Imane. Merci d'avoir été patiente et compréhensive.

À mes adorables amies, Nadjiba et Nadine.

A toute l'équipe d'IBN EL-BAYTAR.

À mon enseignant et mon maître de stage Dr CHERIF. T, qui nous a toujours transmis ses leçons avec passion et amour. Son seul et vrai objectif dans l'enseignement, c'est de construire et faire de nous une génération consciente et responsable. Je vous dis simplement que Les plus grandes leçons ne sont pas tirées d'un livre mais d'un enseignant tel que vous cher enseignant, Je ne vous remercierai jamais assez. Et sans oublier Dr ZOUGGAR. A et Dr ZEROUALI. I, mille merci pour votre soutien.

À tous les enseignants durant tout le cursus.

À toute la promotion de ISVB 2020–2021.

Imene

Résumé

Les besoins énergétiques de la vache sont extrêmement différents entre la période de tarissement et le début de lactation. Cette période spécifique se caractérise par un déficit énergétique. L'étude a comme objectifs de détecter le déficit énergétique, d'évaluer l'influence de ce dernier sur la concentration de certains paramètres biochimiques et enfin de mettre en évidence des liens entre les indicateurs du déficit énergétique et les marqueurs d'inflammation.

La partie expérimentale de cette étude a été réalisée sur 21 vaches laitières provenant de deux élevages situés à Chlef. Deux prélèvements de sang ainsi que des notations de l'état corporel ont été réalisés avant vêlage, et au pic de lactation. Les prélèvements de sang ont permis de doser les paramètres suivants : les AGNE, le BHB, le glucose, le cholestérol, le ratio AGNE/cholestérol, les protéines totales, l'albumine, les globulines, le ratio albumine/globulines, le fibrinogène, et le ratio protéines plasmatiques/fibrinogène. L'analyse des données a permis de constituer deux groupes de vaches [vaches malades (VM) et présumées saines (VS)].

Nos résultats ont révélé un déficit énergétique chez presque la moitié des vaches de notre échantillon (seuil d'AGNE $\geq 0,3$ mmol/L en *prépartum* et seuil d'AGNE $\geq 0,7$ mmol/L en *postpartum*), une baisse de la NEC de 0,8 point au pic de lactation, une prévalence élevée (42,86%) de cétose subclinique en *postpartum* (BHB $\geq 1,2$ mmol) et une stéatose hépatique chez les vaches cétoniques, mis en évidence par l'élévation importante du ratio AGNE/cholestérol. Il a été enregistré chez les (VM) en déficit énergétique, une hyperprotéïnémie, une hypo-albuminémie, une hyperglobulinémie, un ratio albumine/globulines très faible, une concentration de fibrinogène et un ratio protéines plasmatiques/fibrinogène élevés. Les résultats obtenus soutiennent l'existence d'un statut inflammatoire en relation avec le déficit énergétique des vaches.

En fin, une bonne gestion du tarissement et de l'entrée en lactation doit permettre de contrôler le déficit énergétique, et diminuer l'incidence des troubles de santé des vaches laitières.

Mots clés : indicateurs, déficit énergétique, inflammation, vache laitière, *péripartum*.

ملخص

تختلف احتياجات الطاقة للبقرة اختلافاً كبيراً بين فترة الجفاف وبدء الرضاعة. تتميز هذه الفترة المحددة بعجز في الطاقة. تتمثل أهداف الدراسة في الكشف عن عجز الطاقة وتقييم تأثير هذا الأخير على تركيز بعض المعايير البيوكيميائية وأخيراً إبراز الروابط بين مؤشرات نقص الطاقة وعلامات الالتهاب.

تم تنفيذ الجزء التجريبي من هذه الدراسة على 21 بقرة حلوب من مزرعتين في الشلف. تم أخذ عينتين من الدم ودرجات حالة الجسم قبل الولادة وفي ذروة الرضاعة. تم استخدام عينات الدم لفحص المعلمات التالية: BHB, AGNE ، الجلوكوز ، الكوليسترول ، نسبة AGNE / الكوليسترول ، البروتين الكلية ، الألبومين ، الجلوبيولين ، نسبة الألبومين / الجلوبيولين ، الفيبرينوجين ، نسبة بروتين البلازما / الفيبرينوجين. سمح تحليل البيانات بتشكيل مجموعتين من الأبقار [الأبقار المريضة (VM) والأبقار المفترضة السليمة (VS)].

كشفت نتائجنا عن عجز في الطاقة في ما يقرب من نصف الأبقار في عينتنا (عتبة AGNE 0.3 مليمول / لتر في مرحلة ما قبل الولادة وعتبة AGNE 0.7 مليمول / لتر بعد الولادة) ، انخفاض بمقدار 0.8 نقطة NEC في ذروة الإرضاع ، انتشار a مرتفع (42.86%) من الكيتوس تحت السريري بعد الولادة ($BHB \geq 1.2 \text{ mmol}$) والتكس الدهني الكبدي في أبقار الكيتون ، كما يتضح من الارتفاع الكبير في نسبة AGNE / الكوليسترول. تم تسجيله في (VM) مع نقص الطاقة، وارتفاع بروتين الدم في الدم، ونقص ألبومين الدم، وفرط غلوبولين الدم، وانخفاض شديد في نسبة الألبومين / الجلوبيولين، وارتفاع تركيز الفيبرينوجين وارتفاع نسبة بروتين البلازما / الفيبرينوجين. النتائج التي تم الحصول عليها تؤكد وجود حالة التهابية فيما يتعلق بنقص الطاقة في الأبقار.

أخيراً، يجب أن تجعل الإدارة الجيدة للجفاف وبدء الرضاعة من الممكن التحكم في نقص الطاقة، وتقليل حدوث المشكلات الصحية في أبقار الألبان.

الكلمات المفتاحية: مؤشرات، نقص الطاقة، التهاب، بقرة حلوب، ما قبل الولادة.

Abstract

The energy needs of the cow are extremely different between the drying period and the beginning of lactation. This specific period is characterized by an energy deficit. The objectives of the study is to detect the energy deficit, to evaluate the influence of the latter on the concentration of certain biochemical parameters and finally to highlight the links between the indicators of the energy deficit and the inflammation markers.

The experimental part of this study was carried out on 21 dairy cows from two farms located in Chlef. Two blood samples as well as body status ratings were made before calving, and at the peak of lactation. Blood withdrawals have made it possible to assay the following parameters: AGNE, BHB, glucose, cholesterol, agne / cholesterol ratio, total proteins, albumin, globulins, albumin / globulin ratio, fibrinogen, and the plasma protein / fibrinogen ratio. The analysis of the data made it possible to form two groups of cows [sick cows (VM) and presumed healthy (Vs)].

Our results have been revealed an energy deficit in almost half of the cows of our sample (agne threshold ≥ 0.3 mmol / l in preparation and agne threshold ≥ 0.7 mmol / l *postpartum*), a drop in the NEC 0.8 points at the peak of lactation, a high prevalence (42.86%) of subclinical cétoxis in *postpartum* (BHB $\geq 1,2$ mmol) and hepatic steatosis in ketone cows, highlighted by the significant elevation of the AGNE / CHOLESTEROL RATIO. It was recorded in the (VM) energy deficit, a high serum protein tree, hypo-albuminemia, hyperglobulinemia, a very low albumin / globulin ratio, a concentration of fibrinogen and a plasma protein / fibrinogen ratio high. The results obtained support the existence of inflammatory status in relation to the energy deficit of cows.

In the end, good sizership management and lactation entry should make it possible to control the energy deficit, and reduce the impact of dairy cow health disorders.

Key words: Indicators, energy deficit, inflammation, dairy cow, *Peripartum*.

Sommaire

Résumé	I
ملخص	II
Abstract	III
Liste des tableaux	IV
Liste des figures	V
Liste des abréviations.	VI
INTRODUCTION.	1
PARTIE I :BIBLIOGRAPHIQUE.	
CHAPITRE I : RAPPELS SUR LE DEFICIT ENERGETIQUE DE LA VACHE LAITIERE	
1.1.Le déficit énergétique autour du vêlage.	2
1.2.Déficit énergétique et modifications biochimiques.	3
1.2.1. La lipolyse.	4
1.2.2. Acides Gras Non Estérifiés AGNE.	4
1.2.3. Corps cétoniques.	5
CHAPITRE II : IMPACT DU DEFICIT ENERGETIQUE SUR LA SURVENUE DE L'INFLAMMATION ET L'INCIDENCE DES TROUBLES DE SANTE EN <i>POSTPARTUM</i>.	
2.1. Deficit energetique et inflammation.	6
2.1.1. Les médiateurs de l'inflammation.	6
2.1.1.1. Histamine.	6
2.1.1.2. Cytokines pro-inflammatoires.	6
2.1.1.3. Protéines de la phase aiguë.	7
2.1.1.3.1. Fibrinogène.	8
2.1.1.3.2. Haptoglobine.	9
2.1.1.3.3. Protéines sériques amyloïdes A (SAA).	10
2.1.1.3.4. Albumine.	11

2.1.1.3.5. Immunoglobulines.	11
2.2.AGNE et inflammation.	12
2.2.1. Activation de la voie NFκB par les AGNE.	12
2.2.2. Production de médiateurs pro-inflammatoires (EICOSANOIDES).	13
2.2.3. Perturbation de la fonction des macrophages et neutrophiles en <i>peripartum</i> .	13
2.2.3.1. Impact des AGNE sur la fonction immunitaire des leucocytes.	13

CHAPITRE III : EVALUATION D'UN DEFICIT ENERGETIQUE (LES INDICATEURS).

3.1.Evaluation de l'état corporel et des réserves graisseuses.	15
3.2.Les paramètres sanguins.	16
3.2.1. Les AGNE.	16
3.2.2. β-hydroxybutyrate (BHB).	16
3.2.3. La cinétique des AGNE et les BHB.	17
3.2.4. La glycémie.	17
3.2.5. La cholestérolémie.	18
3.2.6. Les paramètres hépatiques.	18
3.3. Les paramètres de suivi au niveau du lait.	19
3.3.1. Taux protéique (TP)	19
3.3.2. Taux butyreux (TB).	19
3.3.3. Utilisation du ratio TB/TP.	20

PARTIE II : ETUDE EXPERIMENTALE.

1.CONTEXTE ET OBJECTIFS DE L'ETUDE.	21
2.MATERIEL ET METHODES.	21
2.1. Zone d'étude et période de l'étude.	21
2.2. Matériel.	21
2.2.1. Echantillon d'étude (Elevages et animaux sélectionnés).	21
2.2.2. Caractéristiques des élevages sélectionnés.	22

2.2.3. Matériel de prélèvement et de dosage.	22
2.3. Méthodes.	24
2.3.1. Protocole expérimental.	24
2.3.2. Prélèvements.	25
2.3.3. Méthodes de dosage.	25
2.3.3.1. Méthodes de dosages des paramètres biochimiques.	25
2.3.3.2. Détermination des marqueurs d'inflammation et interprétation.	27
2.3.3.3. Analyse des données.	28
3. RESULTATS.	
1. ETUDE DESCRIPTIVE.	31
1.1. Profils des concentrations des paramètres biochimiques avant et après vèlage.	31
1.2. Concentrations des protéines plasmatiques du fibrinogène, ratio protéines plasmatiques/fibrinogène et de la glycémie après vèlage.	37
1.3. Evaluation de la note d'état corporel (NEC).	38
2. ETUDE ANALYTIQUE.	39
2.1. Détection du déficit énergétique et prédiction de la survenue de l'acétonémie à l'aide des indicateurs du métabolisme énergétique (AGNE ET BHB).	39
2.2. Influence du déficit énergétique sur les paramètres biochimiques et relation entre les indicateurs du déficit énergétique (AGNE et BHB) /cétose et les marqueurs d'inflammation.	42
4. DISCUSSION.	45
5. CONCLUSION.	53
6. RECOMMANDATIONS.	54
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.	55
ANNEXES.	67

LISTE DES FIGURES

Figure 1 :	Production, capacité d'ingestion et variation du poids (Enjalbert, 2017).	3
Figure 2	Variation des besoins énergétique de la vache laitière (Enjalbert, 2017).	3
Figure 3 :	Centrifugeuse modèle 800.	23
Figure 4 :	Lecteur « FREESTYLE OPTIUM NEO » et électrodes FreeStyle Optium β -cétone.	23
Figure 5 :	Analyseur de nioch semi-automatique WP 21B. (photo personnelle)	24
Figure 6 :	Schéma de principales étapes du protocole expérimental.	25
Figure 7 :	Principe de fonctionnement de l'électrode de mesure de BHB du lecteur Optium (PQ = accepteur d'électron) (Abbott Diabètes Care, 2006).	27
Figure 8 :	Utilisation et interprétation des protéines totales dans le diagnostic de l'inflammation. (PT : protéines totales ; PTS protéines totales sériques et PTP protéines totales plasmatiques. efibri : fibrinogène estimé) (Knapp et Guyot, 2016).	28
Figure 9 :	Evolution de la concentration des AGNE sériques de l'ensemble des vaches.	31
Figure 10 :	Evolution de la concentration de la cholestérolémie de l'ensemble des vaches.	32
Figure 11 :	Evolution des ratios AGNE/cholestérol de l'ensemble des vaches.	33
Figure 12 :	Evolution de la concentration des BHB sériques chez l'ensemble des vaches.	34
Figure 13 :	Evolution de la concentration des protéines totales sériques chez l'ensemble des vaches.	35
Figure 14 :	Evolution de la concentration de l'albumine chez l'ensemble des vaches.	35
Figure 15 :	Evolution de la concentration des globulines chez l'ensemble des vaches.	36
Figure 16 :	Evolution des ratios albumine /globulines chez l'ensemble des vaches.	37
Figure 17 :	Concentration des protéines plasmatiques, du fibrinogène, la glycémie et le ratio protéines plasmatiques/fibrinogène après vêlage.	38
Figure 18 :	Evolution de la NEC chez l'ensemble des vaches.	39

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 :	Mécanismes d'induction de la réponse inflammatoire par le fibrinogène (d'après Molmy, 2018).	8
Tableau 2 :	Intervalles de référence de l'haptoglobine chez des bovins sains (Moretti <i>et al.</i> , 2017).	10
Tableau 3 :	Intervalles de référence des protéines totales, albumine et globulines chez des bovins sains (Moretti <i>et al.</i> , 2017).	12
Tableau 4 :	Caractéristiques des élevages sélectionnés.	22
Tableau 5 :	Type et quantité d'aliment distribué dans les élevages sélectionnés	22
Tableau 6 :	comparaison de la concentration en BHB avant vêlage et de la concentration en BHB après vêlage.	29
Tableau 7 :	comparaison de la concentration en AGNE avant vêlage et de la concentration en BHB après vêlage.	30
Tableau 8 :	Profil de la concentration d'AGNE sériques de l'ensemble des vaches (moyenne± SD).	31
Tableau 9 :	Profil de la concentration de cholestérol de l'ensemble des vaches (moyenne± SD).	32
Tableau 10 :	Profil de la concentration des ratios AGNE/cholestérol de l'ensemble des vaches (moyenne± SD).	33
Tableau 11 :	Profil de la concentration des BHB sériques de l'ensemble des vaches (moyenne± SD).	33
Tableau 12 :	Profil de la concentration des protéines totales sériques de l'ensemble des vaches (moyenne± SD).	34
Tableau 13 :	Profil de la concentration de l'albumine de l'ensemble des vaches (moyenne± SD).	35
Tableau 14 :	Profil de la concentration de l'albumine de l'ensemble des vaches (moyenne± SD).	36
Tableau 15 :	Profil des ratios albumine /globulines estimés de l'ensemble des vaches (moyenne± SD).	37
Tableau 16 :	Concentrations des protéines plasmatiques, du fibrinogène, du ratio protéines plasmatiques/fibrinogène et de la glycémie après vêlage	37
Tableau 17 :	Note d'état corporel des vaches avant et après le vêlage	38
Tableau 18 :	Définition des groupes de femelles en fonction des concentrations sériques en AGNE au cours de la période <i>péripartum</i> .	39
Tableau 19 :	Définition des groupes de femelles en fonction du seuil de BHB sanguin	

	au cours de la période <i>prépartum</i> .	40
Tableau 20 :	Définition des groupes de femelles en fonction de l'atteinte de cétose subclinique au cours de la période <i>postpartum</i>	41
Tableau 21 :	Résultats de prédiction de l'acétonémie (BHB après vêlage $\geq 1,200$ mmol/l) à partir d'un seuil BHB avant vêlage (≥ 0.6 mmol/l).	41
Tableau 22 :	Résultats de prédiction de l'acétonémie (BHB après vêlage $\geq 1,200$ mmol/L) à partir d'un seuil d'AGNE avant vêlage (≥ 0.3 mmol).	42
Tableau 23 :	Résultats comparés des paramètres biochimiques et des marqueurs d'inflammation entre les vaches malades et présumées saines.	44

LISTE DES ABREVIATIONS

4-AA : 4-aminoantipyrine.

AA : Acéto Acétate.

AAP : Antiagrégant plaquettaire.

Ac : Coefficient d'exactitude.

Acétyl-Co.A : Acétyl-Coenzyme A.

ACOD : action de Acétyl-Coenzyme A oxydase.

ACS : Acétyl-Coenzyme A synthetase.

AGNE : Acides Gras Non Estérifiés.

AGV : Acides Gras Volatils.

AMP : Acide Médico-Psychologique.

ATP : Adrénosine 5-Triphosphorique.

BCG : Bromocrésol.

BHB : β -hydroxybutyrate.

CD14 : Cluster of Differentiation 14.

DEA : Défibrillateur Externe Automatisé.

DHA : Acide Docosahexaénoïque.

EPA : Acide Eicosapentaénoïque.

G-6-PDH : Glucose-6- Phosphate Déshydrogénase.

GM-CSF : Facteur stimulant les colonies de granulocytes et macrophages.

H⁺ : Hydron.

Hb : Hémoglobine.

HCl : Chlorure d'hydrogène.

HDL : Lipoprotéine de Haute Densité.

HK : Hexokinase.

Hp : Haptoglobine.

IA : Insémination Artificielle.

IFN : Interférons.

IL : Interleukines.

LBP : Lipopolysaccharide Binding Protein.

LPS : Lipopolysaccharide.

MCP : Monocyte chemoattractant protein.

MEHA : 3-Méthyl-N-éthyl-N-(hydroxyéthyl)-Aniline.

MIP : Macrophage Inflammatory Protein.

MMP : Matrix métalloprotéinase.

NADH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide.

NEC : Note d'État Corporel.

NEFA : Non-Esterified Fatty Acids.

NFκB : Nuclear Factor-Kappa B.

p : Probabilité .

PAMP : Pathogen-Associated Molecular Patterns.

POD : Peroxydase.

PP : Postpartum.

PPA : Protéines de la Phase Aiguë.

PPi : Pyrophosphorique.

PTP : Plasmatiques.

PTS : Protéines Totales Sériques.

SAA : Sériques Amyloïdes A.

SD : Ecart-type.

Se : Sensibilité.

Sp : Spécificité.

TB : Taux Butyreux.

TLR : Toll Like Receptor.

TLR : Toll Like Receptors.

TNF : Tumor Necrosis Factor.

TP : Taux Protéique.

VLDL : Very Low Density Lipoprotéine.

VM : Vaches Malades.

VPN : Valeur Prédictive Négative.

VPP : Valeur Prédictive Positive.

VS : Vaches Présumées Saines.

INTRODUCTION

Le *péripartum* est une période cruciale dans le cycle physiologique de la vache laitière, tant pour assurer ses performances de production et de reproduction que pour limiter les risques de développement d'autres maladies (Forgeat, 2013).

Des changements majeurs se produisent au moment de la parturition afin de répondre à l'augmentation drastique de la demande en glucose, en acides aminés et en acides gras pour la production laitière. L'un de ces changements est l'augmentation de la concentration d'acides gras non estérifiés (AGNE) dans le sang (Leroy *et al.*, 2008). Ceux-ci peuvent être oxydés au niveau du foie ou partiellement oxydés afin de produire des corps cétoniques (Wathes *et al.*, 2007). Le principal corps cétonique synthétisé par le foie lorsque les réserves corporelles sont mobilisées est le bêta-hydroxybutyrate (BHB), et sa concentration dans le sang, est un indice de l'oxydation des acides gras (Wathes *et al.*, 2007 ; Fauteux, 2017). Il permet alors de déterminer le degré de mobilisation du foie et l'ampleur du déficit énergétique. L'accumulation de ces corps cétoniques dans l'organisme de l'animal cause une pathologie métabolique nommée acétonémie ou cétose. Au moins 50 % des vaches laitières exprimeront une période temporaire de cétose subclinique dans le premier mois de lactation (Wathes *et al.*, 2007 ; Imhasly *et al.*, 2014).

La détection précoce de ces cétooses subcliniques et du déficit énergétique est un point clef pour la mise en œuvre des mesures correctives essentielles à la bonne santé économique de l'élevage. Plusieurs moyens de détection sont proposés : la notation de l'état corporel ; le dosage des AGNE, des BHB, du cholestérol et d'autres paramètres biochimiques (Segovia, 2015).

Les syndromes inflammatoires sont fréquents chez les bovins. En effet, en période de *péripartum*, la vache se trouve physiologiquement dans un état pro-inflammatoire. L'augmentation du taux circulant d'AGNE, ainsi que l'excès des radicaux libres sont responsables de l'activation des voies pro-inflammatoires (Lauriane, 2015). Mettre en évidence cet état inflammatoire n'est pas toujours facile, notamment lors d'affections subcliniques, d'affections chroniques non actives ou lorsque l'expression clinique est fruste, et nécessite parfois l'utilisation de biomarqueurs (Schelcher *et al.*, 2014).

Dans ce contexte, les objectifs de cette étude sont de détecter précocement le déficit énergétique chez la vache laitière, d'évaluer l'influence de ce dernier sur la concentration de certains paramètres biochimiques, et enfin de mettre en évidence des liens entre les indicateurs du déficit énergétique et les marqueurs de l'inflammation.

CHAPITRE I : RAPPELS SUR LE DEFICIT ENERGETIQUE DE LA VACHE LAITIERE.

La plus grande part de la digestion des aliments a lieu dans le rumen-réseau grâce à l'action de la microflore bactérienne. Cette microflore dégrade les glucides en sucres simples (oses) qu'elle utilise pour sa croissance et pour synthétiser des acides gras volatils (AGV) utilisés par les ruminants sous forme d'énergie. Les AGV formés dans le rumen sont absorbés par la paroi digestive et transportés par le sang jusqu'au foie pour être métabolisés afin de fournir de l'énergie. Le lactate, qui est un précurseur de l'acide propionique, peut se former aussi dans le rumen avant d'être absorbé (Ali-Amara, 2004).

Les AGV formés sont : l'acide acétique (65%), l'acide propionique (20%), l'acide butyrique (15%). Ces AGV sont transformés au niveau du foie en Acétyl-Coenzyme A. L'Acétyl-Co.A entre dans le cycle de Krebs par l'intermédiaire de l'oxalo-acétate qui conditionne son entrée dans le métabolisme énergétique cellulaire. L'Acétyl-Co.A est aussi déterminant dans le métabolisme des lipides. La vache a un grand besoin d'énergie qui lui est apportée à 70% par les glucides alimentaires. Après le vêlage, la vache oriente en priorité ses dépenses d'énergie vers la production lactée, vient en second lieu la croissance et l'entretien puis enfin la reproduction. Ainsi, des besoins différents exigent des rations différentes (Gozlan, 2014).

1.1. Le déficit énergétique autour du vêlage :

Durant les dernières semaines de gestation, les besoins énergétiques se voient augmentés à cause de la croissance fœtale, et dans les derniers jours de gestation à cause de la production des constituants du colostrum et de la libération des glucocorticoïdes qui accélèrent le métabolisme (Salat, 2005). Deux raisons expliquent le déficit énergétique chez la VL : l'une des raisons est le niveau élevé des dépenses (forte production). L'autre raison est une insuffisance d'apport liée soit à un problème de consommation soit à un défaut d'assimilation de la ration (texture, inrumination, déséquilibre). Le bilan énergétique de la VL, qui est une soustraction entre les apports et les dépenses d'énergie, doit être positif sinon il y aura déficit énergétique (Figures 1-2) (Ali-Amara, 2004).

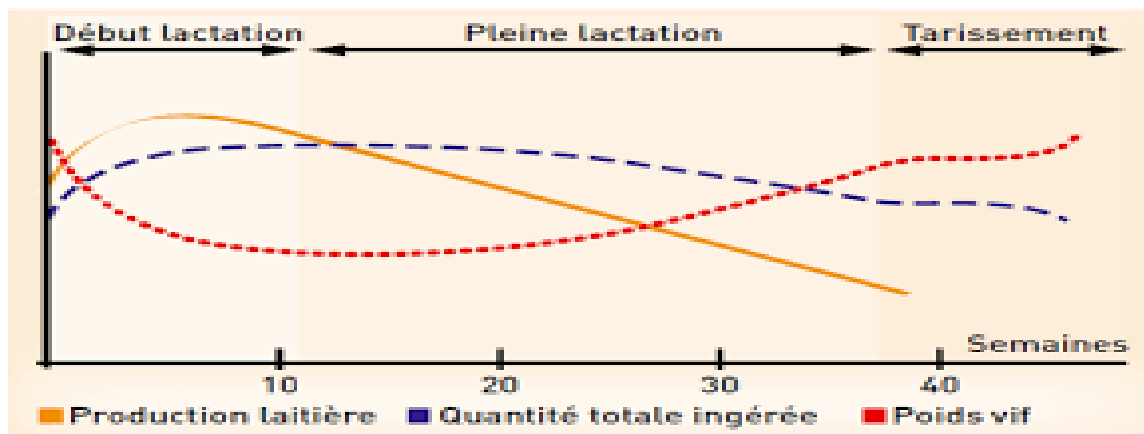


Figure 1 : Production, capacité d’ingestion et variation du poids (Enjalbert, 2017).



Figure 2 : Variation des besoins énergétique de la vache laitière (Enjalbert, 2017).

Après la mise bas, la production lactée croît intensément, les besoins énergétiques sont doublés en quelques jours et continuent à augmenter jusqu’au pic de lactation. Tandis que, pendant les dernières semaines avant le vêlage, l’espace occupé par le fœtus augmente en limitant la place disponible pour le rumen. L’inextensibilité de la cavité abdominale fait que la capacité d’ingestion diminue significativement durant les 3 dernières semaines ante-partum et chute fortement dans les jours précédant le part (Grummer, 1993) de 30% (Goff et Horst, 1997 ; Rousseau, 2013) voir 50% (Salat, 2012 ; Bobe *et al.*, 2004), et par la suite réaugmente progressivement (Aubadie-Ladrix, 2011) pour atteindre son maximum entre la dixième et la douzième semaine de lactation (Ferré *et al.*, 2004). Cette baisse d’ingestion est une cause majeure du déficit énergétique en fin de gestation et en début de lactation.

D’autres facteurs tendent à accentuer le déficit énergétique au cours des derniers jours de gestation, comme le stress de la mise bas, la forte hausse du taux d’œstrogènes (Drackley, 2004 ; Grummer, 1993) et l’augmentation du cortisol qui stimule le métabolisme. Il est

important de préciser que ce déficit est inévitable et s'accroît bien évidemment à l'entrée en lactation (Aubadie-Ladrix, 2001).

1.2. Déficit énergétique et modifications biochimiques :

Pour pallier au déficit énergétique, l'organisme doit mobiliser ses réserves. Cet état est physiologique et normal à ce stade. Cependant, il arrive qu'un déséquilibre exacerbé entre les apports et les dépenses s'installe. Dans ce cas, deux phénomènes en résultent : la stéatose et la cétose (Duffield, 2011).

1.2.1. La lipolyse :

Lors d'un déficit énergétique intense, l'organisme puise dans le tissu adipeux pour se procurer de l'énergie, on parle alors de lipolyse. Le relargage des réserves lipidiques par le tissu adipeux se fait après hydrolyse des triglycérides en acides gras non estérifiés (AGNE) et glycérol. La majorité de ces AGNE est prélevée par le foie (Fournet, 2012).

1.2.2. Acides Gras Non Estérifiés AGNE :

Ils sont transportés par l'albumine dans le sang (Lean *et al.*, 1991) et peuvent être utilisés par la mamelle pour produire la matière grasse. Ils seront à l'origine des acides gras longs du lait et peuvent entraîner une hausse du taux butyreux en cas de déficit énergétique au début de lactation (Aubadie-Ladrix, 2011). La production d'énergie à partir de l'oxydation d'AGNE se réalise suite à une captation hépatique, et se fait en fonction de leur concentration sanguine (Lea *et al.*, 1991), plusieurs devenir sont alors possibles :

- Une oxydation complète avec un cycle de Krebs pour produire de l'énergie.
- Une oxydation incomplète en corps cétoniques.
- Une estérification pour former des triglycérides et être exportés sous forme de Very Low Density Lipoprotéine (VLDL).
- Une estérification pour former des triglycérides et être accumulés dans le foie.

L'orientation vers l'une ou l'autre de ces voies se fait en fonction de la disponibilité de différents substrats.

1.2.3. Corps cétoniques :

Les corps cétoniques sont des produits issus du catabolisme incomplet des acides gras. Ces réactions ont lieu dans les mitochondries des cellules hépatiques lorsque l'organisme ne dispose pas suffisamment de glucose comme source d'énergie. Leur apparition s'observe donc lors de déficit énergétique (Herdt, 2000 ; Cuvelier *et al.*, 2005).

CHAPITRE II : IMPACT DU DEFICIT ENERGETIQUE SUR LA SURVENUE DE L'INFLAMMATION ET L'INCIDENCE DES TROUBLES DE SANTE EN POSTPARTUM.

2.1. Déficit énergétique et inflammation :

De nombreuses études suggèrent que certains aspects du métabolisme énergétique, notamment la lipomobilisation, peuvent avoir un impact négatif sur la réponse inflammatoire *peripartum*. Un dysfonctionnement ou un dérèglement de la réponse inflammatoire pourrait être le lien commun entre l'augmentation de la fréquence des maladies métaboliques et de celle des maladies infectieuses au cours de cette période (Sordillo et Raphael, 2013).

Tous les stimuli d'origine infectieuse, traumatique, néoplasique, toxique ou immunitaire, implique systématiquement une inflammation locale puis une succession d'événements aboutissant à une réponse systémique, alors appelée la réaction inflammatoire aiguë. Cette réponse est issue de l'interaction entre le système nerveux central et le système immunitaire via de nombreux effecteurs : cytokines, hormones, neurotransmetteurs et neuropeptides (Borghetti *et al.*, 2009).

2.1.1. Les médiateurs de l'inflammation :

2.1.1.1. Histamine :

C'est une amine vasoactive stockée dans les granules des mastocytes et des basophiles. Elle augmente la perméabilité vasculaire et permet la contraction des muscles lisses localement. Elle agit aussi au niveau du système nerveux et provoque la sensation de douleur (Merrouche *et al.*, 2020).

2.1.1.2. Cytokines pro-inflammatoires :

Sont des petites protéines sécrétées par les cellules en réponse à divers stimuli. Au niveau de la réponse immunitaire, elles permettent la communication entre les cellules immunes et l'orientation de la réponse en fonction de la nature du signal détecté (Lemaire, 2018).

En effet, l'élément pathogène est reconnu et lié à une protéine sérique, généralement la LBP (Lipopolysaccharide binding protéine) qui le livre aux récepteurs CD14 présents sur la surface des macrophages et autres cellules inflammatoires. Le récepteur est

alors activé et induit la production de cytokines, des peptides de bas poids moléculaire sécrétés par des leucocytes activés (alors appelés interleukines) ou par d'autres cellules (Ceciliani *et al.*, 2012). Les cytokines peuvent être divisées en 3 groupes (Jain *et al.*, 2011) :

- Les cytokines qui inhibent ou stimulent la prolifération des cellules : IL-2, IL-3, IL-4, IL-7, IL-10, IL-11, IL-12 et le GM-CSF (facteur stimulant les colonies de granulocytes et macrophages).
- Les cytokines pro-inflammatoires : TNF- α/β , IL-1 α/β , IL-6, IFN- α/γ , IL-8, la macrophage inhibitory protein-1.
- Les cytokines anti-inflammatoires : antagonistes du récepteur de l'IL-1, les récepteurs de l'IL-1, la TNF- α binding protein et l'IL-1 binding protein.

Les cytokines pro-inflammatoires, sont à l'origine de la libération de protéines de l'inflammation aiguë.

2.1.1.3. Protéines de la phase aiguë :

Les protéines de la phase aiguë (PPA) sont les effecteurs de la première réaction de l'organisme à un stress antigénique, donc sont les effecteurs de la réponse innée. Leur concentration varie de 25 % en réponse à une inflammation (Molmy, 2018). Elles sont pour la plupart majoritairement synthétisées dans le foie. Les études récentes montrent que les PPA interagissent à la fois avec les éléments pathogènes et les cellules immunitaires afin de moduler la réponse inflammatoire (Sitrin *et al.*, 1998 ; Ceciliani *et al.*, 2012).

Les protéines de la phase aigüe PPA sont classées en 2 groupes : les protéines positives et les protéines négatives. On distingue plusieurs groupes de PPA positives (Jain *et al.*, 2011) :

- Les PPA majeures : qui, leurs concentrations se multiplie par 100 à 1000 lors d'un stimulus inflammatoire.
- Les PPA modérées : qui, leurs concentrations se multiplie par 5 à 10 lors d'une inflammation.
- Les PPA mineurs : qui leur concentration est inférieure à 2.

La synthèse des protéines dites négatives, telles que la transthyréline, la Retinol Binding Protein, la Cortisol Binding Protein, la transferrine et l'albumine, est diminuée lors d'inflammation, la synthèse hépatique étant redirigée vers les protéines positives.

Une nouvelle PPA a été décrite récemment chez les bovins (Schroedl *et al.*, 2001) : la LBP (Lipopolysaccharide Binding Protein), déjà connue chez l'homme (Schumann *et al.*, 1999).

Elle évoluerait de façon semblable à l'haptoglobine bovine, avec cependant une cinétique plus rapide.

2.1.1.3.1. Fibrinogène :

Le fibrinogène est une glycoprotéine synthétisée par le foie essentiellement. Certaines structures extra-hépatiques, telles que l'épithélium pulmonaire capable de synthétiser localement le fibrinogène sous l'effet des médiateurs pro-inflammatoires.

Il est impliqué dans le maintien de l'homéostasie et dans le processus de réparation tissulaire, en constituant le substrat de formation du réseau de fibrine. Il contribue à la formation de la matrice permettant la migration des cellules impliquées dans la réaction inflammatoire (Rubel *et al.*, 2001).

Lors d'inflammation, la synthèse de fibrinogène est largement augmentée sous l'effet de l'interleukine 6 essentiellement, des glucocorticoïdes et de l'oncostatine M, généralement dans les 24 heures (Herrick *et al.*, 1999). Leurs propriétés pro-inflammatoires sont essentiellement liées à leur capacité de se lier puis à activer de nombreuses cellules immunitaires (Tableau 1) (Molmy, 2018).

Tableau 1 : Mécanismes d'induction de la réponse inflammatoire par le fibrinogène (d'après Molmy, 2018).

Liaison Récepteur cellulaire - Portion du fibrinogène	Cellules impliquées	Réponse inflammatoire
CD11b/CD18 – Fiby	Monocytes circulants Macrophages tissulaires Cellules microgliales	Cytokines TNF- α et IL-1 β
CD11c/CD18 – Fiby	Cellules dendritiques Monocytes Macrophages Neutrophiles Lymphocytes B	Rôle encore peu connu
ntégrine – Fiby	Mastocytes	Hypertension vasculaire
TLR-4 - Fibrinogène	Macrophages	Libération de cytokines et chémokines : MCP-1, MIP-1, IL6, IL8, TNF- α , MMP1, MMP9.

La concentration du fibrinogène peut être artificiellement augmentée en cas d'hémoconcentration causée par une déshydratation ou une augmentation des pertes. Il ne permet toutefois pas de différencier une augmentation du fibrinogène réelle d'une augmentation artéfactuelle par hémoconcentration (Sutton et Hobman, 1975). Le pic de son

taux est atteint en 4 jours et le taux reste élevé tant que la cause de l'inflammation est présente (Cole *et al.*, 1997).

2.1.1.3.2. Haptoglobine :

L'haptoglobine est une glycoprotéine sérique majoritairement synthétisée dans le foie, et dans les glandes mammaires des bovins lors d'inflammation locale. Sa synthèse est induite par la sécrétion d'interleukines, notamment par l'IL-6, IL-1 et de TNF. Chez les bovins il n'existe qu'un seul phénotype haptoglobine 2-2 et l'haptoglobine circule dans le plasma, liée à l'albumine (Ceciliani *et al.*, 2012). L'haptoglobine se lie à l'hémoglobine (Hb) plasmatique libre en formant un complexe stable (Hp-Hb). La capture de l'hémoglobine qui est, d'après (Wagener *et al.*, 2001), toxique et pro-inflammatoire sous forme libre, confère à l'haptoglobine plusieurs fonctions biologiques.

La formation de ce complexe permet d'une part, de réduire les dégradations oxydatives induites lors de l'hémolyse et d'autre part, de prévenir la perte de fer (Wagener *et al.*, 2001 ; Yang *et al.*, 2003). En réduisant ainsi le fer nécessaire à la croissance bactérienne, l'haptoglobine présente une activité bactériostatique (Eaton *et al.*, 1982).

Les complexes Hp-Hb incorporés dans les phagolysosomes des cellules phagocytaires pourraient générer des radicaux libres ayant une activité microbicide directe (Lewis et Dyer, 1995). L'Hp est un très bon marqueur de l'inflammation puisque, comme le montre le tableau ci-dessous (Tableau 2), sa valeur basale est très faible, son intervalle de référence très étroit (Ceciliani *et al.*, 2012).

Tableau 2: Intervalles de référence de l’haptoglobine chez des bovins sains (Moretti *et al.*, 2017).

Unité	Nombre d’animaux	Intervalle de référence	Moyenne \pm écart-type	Stade physiologique	Race	Référence
$\mu\text{mol/L}$	145 femelles	0,8–21,8 0,1 – 4,4		3 jours après vêlage *30jours après vêlage	Holstein	(Moretti <i>et al.</i> , 2017)
mg/L	10 femelles		60,0 \pm 20,0	Non précisé	Non précisée	Baydar, Dabak 2014)
mg/L	71 femelles 49 mâles	<196		Agés de 5 à 55 jours	Pas d’effet	Seppälä <i>et al.</i> , 2013)
g/L		<0,1				(Ceciliani <i>et al.</i> , 2012)
mg/dL		0,0 – 0,5				(Jain <i>et al.</i> , 2011)
mg/mL		<0,1				(Ritcher, 1974)

2.1.1.3.3. Protéines sériques amyloïdes A (SAA) :

Les SAA sont synthétisées principalement par le foie lors de stimulations par des cytokines ou par des lipopolysaccharides bactériens (Trumel *et al.*, 2018), mais aussi par la mamelle lors de la gestation, d’involution tissulaire ou de mammite (Molenaar *et al.*, 2009).

Les propriétés des SAA ne sont que partiellement connues. Deux hypothèses sont émises : selon la première : les SAA sont associées au HDL, favorise la fourniture de lipides, en particulier de cholestérol aux cellules dont les besoins sont augmentés pour la reconstitution tissulaire au sein du foyer inflammatoire. Selon l’autre hypothèse la SAA faciliterait la phagocytose par les macrophages du cholestérol issu de la lyse cellulaire et son recyclage ultérieur par le foie (Neveu, 2005).

La SAA plasmatique est plus sensible et augmente plus rapidement que l’haptoglobine après le début d’infection (Heegard, 2000) donc la SAA est un marqueur de choix en raison de sa faible teneur chez un animal sain, sa très forte augmentation lors d’inflammation, sa précocité d’apparition, sa capacité d’être un marqueur du bien-être de l’animal. Mais son utilisation est gênée par la difficulté de purification et de quantification (Horagadoga *et al.*, 1999).

2.1.1.3.4. Albumine :

L'albumine bovine est une protéine négative diminuent sensiblement dans les premiers jours de la réaction inflammatoire, principalement en raison de la diminution de la synthèse hépatique. Il semblerait que ceci soit la conséquence ; une orientation du métabolisme hépatocytaire vers une synthèse préférentielle de PPA positives, au détriment des PPA négatives. Ce phénomène permettrait de contrebalancer ; augmentation de la pression oncotique due aux protéines positives, et de fournir davantage des acides aminés pour leur élaboration. Cependant (Engler, 1995), fait remarquer que la plupart des PPA négatives sont des protéines de transport. La diminution de leur concentration plasmatique conduit à l'augmentation de la fraction libre, active, des ligands (vitamines, hormones, acides gras, oligo éléments) qui jouent un rôle important dans la phase de restauration cellulaire (Corbière, 2002).

2.1.1.3.5. Immunoglobulines :

Les globulines sont des protéines sériques aux nombreux rôles, elles sont notamment actrices de la réponse immunitaire humorale. La différence entre la concentration d'albumine et de protéines totales correspond à la concentration en globulines. Il existe différentes globulines : les globulines α -1 (représentant environ 10 % des globulines), les globulines α -2 (16 %), les globulines β (18 %), et le groupe majoritaire chez les bovins, les globulines γ (environ 55 %). Chaque catégorie peut être évaluée par électrophorèse des protéines sériques (Smith, 2009) (Tableau 3).

Tableau 3: Intervalles de référence des protéines totales, albumine et globulines chez des bovins sains (Moretti *et al.*, 2017).

Nombre d'animaux	Stade physiologique	Race	Protéines totales (g/L)	Albumine (g/L)	Globulines (g/L)	Référence
145 femelles	3 jours après vêlage 30 jours après vêlage	Holstein	48,3-83,4 59,8-95,7	29,2 – 39,5 29 – 40,9	16,4 – 44,8 29 – 40,9	(Moretti <i>et al.</i> , 2017)
			67 – 75	30 – 36		(Smith, 2009)
85 femelles	Lactation	Holstein	70 ± 5	34 ± 3 par colorimétrie 27,4 ± 2,8 par électrophorèse	36 ± 6 par colorimétrie 43,0 ± 6,0 par électrophorèse	Chorfi <i>et al.</i> , 2004)
		Multiples	64,5 à 89,2 en milieux tropicaux	30 à 35	50 à 55 en milieux tropicaux 40 en milieu tempéré	(Labouche, 1964)

2.2. AGNE et inflammation :

Chez la vache, des excès de tissu adipeux (vache grasse au vêlage) et une concentration élevée en AGNE (vache en déficit énergétique *postpartum*) sont des facteurs de risque pour plusieurs maladies inflammatoires telle que les mammites et les métrites avec un seuil d'alerte habituellement admis 0.4 mmol/l entre 7 et 10 jours *postpartum*.

Plusieurs mécanismes sont proposés pour expliquer la relation entre les AGNE et la régulation de la réponse inflammatoire. Ils affectent plus particulièrement la fonction de deux types cellulaires, celle des leucocytes et celle des cellules endothéliales (Sylvie, 2014).

2.2.1. Activation de la voie NFκB par les AGNE :

Les cellules épithéliales possèdent à leur surface des Toll Like Receptors (TLR) qui reconnaissent chez les pathogènes des séquences conservées, les Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMP). Les PAMPs sont, par exemple, des constituants de la paroi des bactéries : l'acide lipotéichoïque des bactéries à Gram positif, reconnu par les TLR1, TLR2 et TLR6 ; ou encore le lipopolysaccharide (LPS) des bactéries à Gram négatif reconnu par le TLR4. L'activation des TLR initie une cascade de signalisation aboutissant à la synthèse de

chimiokines et cytokines pro-inflammatoires, notamment des interleukines (IL), des molécules de la famille du Tumor Necrosis Factor (TNF) et des prostaglandines (Gros, 2015). Le NFκB (nuclear factor-kappa B) est une famille de petites protéines dimériques (p50-p65) dont le rôle est d'activer la transcription de gènes cibles et conduisant à l'établissement d'une réponse pro-inflammatoire par synthèse de cytokines, chimiokines et molécules d'adhésion vasculaire. La voie NFκB peut être activée par tous les récepteurs TLR. Or les AGNE, dont l'acide palmitique (C16 :0) et stéarique (C18:0), peuvent activer le TLR-4 et ainsi initier la réponse inflammatoire via la voie NFκB. De même le TLR-2 peut aussi être activé par les acides gras saturés tel que l'acide dodécanoïque (C12 :0) (Contreras *et al.*, 2011). En outre, les AGNE oméga 3 polyinsaturés (DHA, EPA) inhibent la production de NFκB, allant dans le sens d'une suppression de la réaction inflammatoire. Or les concentrations en oméga 3 diminuent au cours de la période de transition. Les AGNE libérés au cours du *peripartum* exercent donc une action pro-inflammatoire (Contreras *et al.*, 2011).

2.2.2. Production de médiateurs pro-inflammatoires (EICOSANOÏDES) :

Une autre voie par laquelle les acides gras peuvent interférer avec la réaction inflammatoire et immune est la biosynthèse des médiateurs lipidiques que sont les eicosanoïdes : prostaglandines, prostacyclines, leucotriène, limouxines et thromboxanes qui sont des modulateurs de la réaction inflammatoire. En présence de fortes concentrations d'AGNE avec des profils typiques du *peripartum* (augmentation des acides gras saturés et diminution des omega 3) ; la production des cytokines pro-inflammatoires par les cellules vasculaires endothéliales augmente (Sylvie, 2014).

2.2.3. Perturbation de la fonction des macrophages et neutrophiles en *peripartum* :

Les macrophages et neutrophiles ont besoin de beaucoup d'énergie pour assurer leur fonction antimicrobienne. Le glucose étant la principale source d'énergie, l'importante diminution de la glycémie pendant le *péripartum* affecte les cellules immunitaires en limitant la quantité d'énergie disponible (Sordillo *et al.*, 2013).

2.2.3.1. Impact des AGNE sur la fonction immunitaire des leucocytes :

In vitro, l'activité phagocytaire des neutrophiles, n'est pas affectée par l'ajout d'AGNE dans le milieu et ce quelle qu'en soit la concentration (Scalia *et al.*, 2006). Cependant, la

capacité des neutrophiles à produire des formes réactives de l'oxygène est très variable selon la concentration en AGNE avec laquelle les neutrophiles sont incubés (Scalia *et al.*, 2006 ; Ster *et al.*, 2012) ont quant à eux rapportent que les concentrations élevées en AGNE diminuent significativement le burst (explosion) oxydatif.

CHAPITRE III : EVALUATION D'UN DEFICIT ENERGETIQUE (LES INDICATEURS).

Certains paramètres biochimiques peuvent aider à la mise en évidence d'un bilan énergétique négatif et de pathologies métaboliques associées. Le déficit énergétique peut s'évaluer en *prépartum* via le dosage des AGNE afin de détecter précocement les animaux à risques de développer une cétose subclinique. La NEC, la glycémie, la cholestérolémie, la concentration sanguine en BHB et en AGNE, la composition du lait sont des indicateurs de déséquilibre énergétique en *postpartum* (Gozlan, 2014).

3.1. Evaluation de l'état corporel et des réserves graisseuses :

La NEC (Note d'État Corporel) d'une vache laitière est une évaluation de la proportion de la masse grasse et est reconnue à la fois par les scientifiques et les éleveurs comme un paramètre important dans la conduite du troupeau. Quel que soit l'échelle utilisée, la valeur basse correspond à un état d'émaciation et la valeur haute à l'obésité (Roche *et al.*, 2009).

La NEC optimale au vêlage est de 3,0 à 3,25 (pour une échelle de 0 à 5), une NEC plus basse est associée à une baisse des productions et du niveau de reproduction tandis qu'une NEC $\geq 3,5$ est associée à une réduction de la quantité de matière sèche ingérée en début de lactation et une hausse des risques de maladies métaboliques (Roche *et al.*, 2009).

Le risque de cétose chez les vaches avec une NEC $\geq 3,75$, entre 3,25 et 3,5 et une NEC $\leq 3,0$ est respectivement de 10,7%, 3,1% et 1,3% (Seifi *et al.*, 2011).

Suite au vêlage, une perte d'état corporel *postpartum* a lieu, avec une NEC la plus faible entre 40 et 120 jours *postpartum* (Rezamand *et al.*, 2007 ; Lucy *et al.*, 2009). Cette perte de NEC ne doit pas excéder un point par rapport au nadir de la NEC sur un cycle vêlage/vêlage. Ensuite, les réserves des tissus se reconstituent, simultanément avec une stabilisation et une baisse de la production laitière (Roche *et al.*, 2009).

On évalue l'état de chair d'une vache par appréciation visuelle de 4 points anatomiques arrière (base de la queue, tubérosité ischiatique (point des fesses), détroit caudal, ligne du dos) et de 2 points latéraux (pointe de la hanche, apophyses transverses et épineuses). Le système le plus couramment utilisé pour les vaches laitières est l'échelle de 1 à 5 avec 1 pour une vache émaciée, 2 mince, 3 moyenne, 4 grasse, 5 obèse (Roche *et al.*, 2004).

3.2. Les paramètres sanguins :

3.2.1. Les AGNE :

Comme vu précédemment, les AGNE proviennent de la lipomobilisation. Ils permettent de mettre en évidence un bilan énergétique négatif (Adewuyi *et al.*, 2005) : en effet, ils sont fortement corrélés au bilan énergétique (Raboisson et Schelcher, 2009). La valeur seuil utilisée pour évaluer un déficit énergétique trop important 2 à 14 jours avant vêlage varie selon les auteurs de 0,3 mmol/L (Ospina *et al.*, 2010 ; Chapinal *et al.*, 2011) à 0,5 mmol/L (Leblanc *et al.*, 2005) ; et celle après le vêlage est de 0,7 mmol/L (Ospina *et al.*, 2010).

Une concentration élevée reflète une lipomobilisation importante et supérieure aux capacités d'utilisation hépatique (Raboisson et Schelcher, 2009). Une mobilisation des réserves graisseuses ou une restriction énergétique sont significativement associées à un bilan énergétique plus fortement négatif et à une plus forte concentration en AGNE circulant (Vanhaelst *et al.*, 2008 ; Dessauge *et al.*, 2011 ; Sigl *et al.*, 2013). Chez les vaches taries, avant le vêlage, le dosage des AGNE sanguins est le seul test indiqué pour évaluer le risque de cétose. Une augmentation des AGNE met en évidence une lipomobilisation excessive et l'on peut prédire un risque de cétose *postpartum* lorsque le taux d'AGNE est supérieur ou égal à la valeur seuil de 0,3 mmol/L 10 jours avant le vêlage (Richard, 2014).

La concentration en AGNE est plus haute chez les animaux en début de lactation que chez les animaux en milieu et fin de lactation (Bjerre-harpøth *et al.*, 2012). La concentration en AGNE dépend également d'une part génétique individuelle, l'héritabilité rapportée est de 0,08 à 0,35 (Oikonomou *et al.*, 2008).

3.2.2. β -hydroxybutyrate (BHB) :

Les corps cétoniques sont au nombre de trois. L'acétone n'est pas dosée, elle n'est présente que sous forme de traces dans le sang. L'acéto-acétate est parfois dosé mais il est instable dans les prélèvements sanguins et les tests ne sont pas très sensibles et spécifiques (Oetzel, 2008). Par conséquent, les bêta-hydroxybutyrates sont dosés car relativement stables.

Lorsque la quantité d'AGNE excède la capacité du foie à les oxyder complètement, la quantité de corps cétoniques augmente (Leblanc, 2010). Son dosage dans le sang constitue

le Gold Standard pour diagnostiquer une cétose (clinique et subclinique), entre 5 et 50 jours après le vêlage (Duffield *et al.*, 2009).

En effet, La régulation de la production des corps cétoniques est liée au taux d'AGNE : si celui-ci augmente (lipomobilisation), la céto-genèse est activée. Ensuite, les corps cétoniques sont transportés vers les tissus (surtout les muscles), pour être utilisés comme substrats énergétiques, ou vers la mamelle et les reins, pour être excrétés dans le lait et l'urine. Ils contribuent aux besoins énergétiques liés à l'entretien à hauteur de 7 à 12 % ; ce pourcentage augmente en cas de lactation et de gestation (Brockman, 1979).

Chez des animaux cliniquement sains, la concentration sanguine en corps cétoniques est inférieure à 10 mg/100ml (1 mmol/l) : 0.5 mg/100 ml pour l'AA, 4 mg/100 ml (< 0.8mmol/l) pour le BHB, traces d'acétone (Brugère-Picoux, 1995). La concentration du BHB est très dépendante du moment du repas. Les corps cétoniques augmentent pendant le premier mois de lactation, puis diminuent. En début de lactation, le BHB est corrélé négativement au bilan énergétique ($r = -0.43$ après repas et -0.58 avant) (Schelcher *et al.*, 1995).

3.2.3. La cinétique des AGNE et les BHB :

L'apparition des AGNE est plus précoce que celle des BHB, comme la montre.

Les AGNE sanguins permettent de mettre en évidence une lipomobilisation excessive avant même que la vache n'ait vêlé. Ainsi en pratique les AGNE constituent un bon indicateur dans les deux dernières semaines avant le vêlage et les BHB dans les deux semaines après le vêlage. (Gros, 2015).

3.2.4. La glycémie :

Le glucose est une molécule indispensable aux métabolismes énergétique cellulaire, lipidique, fœtal, et à la production laitière (synthèse de lactose) (Vagneur, 1992). Chez les ruminants, l'essentiel du glucose sanguin provient de synthèses endogènes. La néoglucogenèse fournit 93 % du glucose utilisé : le foie en synthétise 85 % et les reins 8%, à partir de substrats tels que le propionate, les acides aminés glucoformateurs, le glycérol et le lactate (Brugère-Picoux, 1995).

La glycémie est soumise à de fortes variations individuelles et n'est que très peu liée au statut énergétique d'un bovin (Coulon *et al.*, 1985). Chez les bovins, elle est

physiologiquement comprise entre 0,55 et 0,7 g.L-1 (soit 3,0 et 3,9 mmol.L-1). Une hypoglycémie est souvent observée en début de lactation (il est alors toléré de voir la glycémie descendre à 0,45 g.L-1 sans que cela ne soit considéré comme pathologique) (Veriele, 1994). Certains auteurs considèrent la glycémie comme un indicateur peu sensible du statut énergétique (Kronfeld *et al.*, 1982 ; Parker et Blowey, 1976). Par contre, (Doreau *et al.*, 1983) relie de façon positive la glycémie au bilan énergétique pendant les six premières semaines de lactation.

Il a également été étudié la relation entre teneur en BHB et glycémie. Les vaches en cétose ont une glycémie plus faible que les vaches non cétoniques tandis que, réciproquement, une glycémie forte conduit à une concentration en BHB et un risque de cétose diminués (Bjerreharpøth *et al.*, 2012 ; Tehrani-Sharif *et al.*, 2012) reprennent cette association négative entre concentration plasmatique en BHB et glycémie en suggérant que l'utilisation de ces deux indicateurs simultanément permet une meilleure évaluation du bilan énergétique que leur analyse individuelle indépendante.

3.2.5. La cholestérolémie :

Il est également possible de doser les lipides sanguins, afin de refléter une lipidose, via les triglycérides (seuil supérieur de 1,8 g/L) et surtout le cholestérol (seuil supérieur de 2,6 g/L) (Siliart, 2014). La concentration en cholestérol est positivement corrélée à la balance énergétique (Reist *et al.*, 2002). Suite à une restriction énergétique, le taux de cholestérol augmente quel que soit le stade de lactation et pourrait être un indicateur utile de déficit énergétique à tout moment de la lactation. Cette hausse pourrait être attribuée à une réestérification des AGNE en triacylglycérol et son exportation dans la circulation sous forme de lipoprotéines à faible densité (Bjerre-harpøth *et al.*, 2012).

3.2.6. Les paramètres hépatiques :

La fonction hépatique peut être évaluée par une variété d'enzymes, mais toutes ne sont pas pertinentes. Il faut être très prudent dans l'interprétation des résultats car ces paramètres n'ont pas toujours de bonnes corrélations avec le degré d'infiltration graisseuse du foie (Nakagawa *et al.*, 1997 ; Aubadie-Ladrix, 2005).

Le plus pertinent est d'associer le dosage des acides biliaires et celui des AGNE et si possible au cholestérol total (Salat, 2012 ; Ferré *et al.*, 2004). En effet, le cholestérol total permet de

mesurer indirectement la capacité du foie à excréter des VLDL. Il doit être supérieur à 1,94 mmol/L (Van Saun, 2000). Pour cela le rapport AGNE/Cholestérol utilisé doit rester inférieur à 0,4 (Salat, 2012 ; Van Saun, 2000).

3.3. Les paramètres de suivi au niveau du lait :

Les analyses du lait offrent l'avantage de la facilité de prélèvement, y compris par les éleveurs et sont facilement disponibles dans les élevages. La composition du lait varie en fonction du statut énergétique et peut permettre d'évaluer le niveau énergétique sur un cheptel (Friggens *et al.*, 2007).

Une explication biologique ou physiologique est à l'origine de cette hypothèse. La mobilisation des réserves lipidiques associée à un bilan énergétique négatif est à l'origine d'une augmentation de la concentration sanguine des AGNE (issus de la lipolyse) et une fraction de ces AGNE est transformée en VLDL qui peut être captés par la mamelle. Cela conduit à une augmentation de l'absorption des acides gras par la mamelle et donc une augmentation du taux butyreux du lait. Concomitamment, la diminution de la consommation de glucides fermentescibles réduit la synthèse des protéines par les bactéries présentes dans le rumen. Le flux d'acides aminés arrivant à la mamelle est donc plus faible et le taux protéique décroît. Une corrélation élevée a été trouvée entre la variation du taux butyreux (ΔTB) et le nadir du bilan énergétique ($\sim 30j$ PP) (De Vries et Veerkamp, 2000).

3.2.1. Taux protéique (TP) :

Du fait d'une corrélation positive entre taux protéique et déficit énergétique, un faible taux protéique est une conséquence classique d'un déficit énergétique chez la vache laitière ou d'une hypercétonémie. C'est également le reflet de l'évolution de l'état corporel en début de lactation (Ennuyer et Laumonnier, 2013).

3.3.2. Taux butyreux (TB) :

Le pourcentage de matière grasse étant négativement corrélé à l'équilibre énergétique, une augmentation du TB peut résulter d'un bilan énergétique négatif (Reist *et al.*, 2002). En effet, les acides gras mobilisés lors de déficit énergétique sont en partie prélevés par la mamelle, expliquant une élévation du taux butyreux. Cependant, dans d'autres publications, c'est une chute du taux butyreux qui est indicateur de déficit énergétique (De Vries et

Veerkamp, 2000) Ils recommandent d'utiliser la chute du pourcentage de matière grasse dans les premières semaines de lactation comme indicateur de déficit énergétique. Cependant, une forte teneur en matière grasse est significativement associée à une hausse du risque de cétose subclinique (Duffield *et al.*, 1997).

3.3.3. Utilisation du ratio TB/TP :

Le rapport TB/TP est un indicateur plus sensible et plus constant des maladies métaboliques qu'une simple analyse des taux considérés séparément.

Le ratio TB/TP peut être utilisable pour évaluer l'équilibre énergétique et le niveau de lipomobilisation, en particulier en début de lactation, du fait d'une corrélation négative entre le ratio TB/TP et le bilan énergétique. Cette relation est plus forte en début qu'au milieu de lactation. La valeur seuil maximale est fixée à 1,5. (Buttchereit *et al.*, 2010 ; Toni *et al.*, 2011). De plus, l'élévation du ratio TB/TP est instantanée en réponse à un faible déficit énergétique. Dans ce dernier contexte, le ratio TB/TP est alors un meilleur facteur de prédiction du bilan énergétique que le BHB sanguin (Heuer *et al.*, 2000).

PARTIE II

ETUDE EXPERIMENTALE

1. CONTEXTE ET OBJECTIFS DE L'ETUDE :

Le cycle physiologique de production d'une vache laitière conduit inévitablement à un déficit énergétique autour du vêlage. Ce déficit peut devenir la source de nombreux troubles métaboliques et infectieux. La mesure de certains métabolites sanguins pourrait permettre d'intervenir plus précocement dans la gestion de ces troubles en *péripartum*. En effet, il semblerait qu'une augmentation des concentrations sériques en AGNE et BHB au cours de la dernière semaine avant vêlage serait associée à un risque accru de développer des maladies inflammatoires et d'altérer l'état de santé des vaches. Cette étude vise à :

- Détecter précocement le déficit énergétique chez la vache laitière.
- Evaluer l'influence du déficit énergétique sur la concentration de certains paramètres biochimiques.
- Mettre en évidence des liens entre les indicateurs du déficit énergétique (AGNE et BHB) et les marqueurs d'inflammation.

2. MATERIEL ET METHODES :

2.1. Zone d'étude et période de l'étude :

Notre étude a été réalisée dans la wilaya de Chlef durant la période allant de décembre 2020 à mai 2021.

2.2. Matériel :

2.2.1. Echantillon d'étude (Elevages et animaux sélectionnés):

L'étude s'est déroulée dans deux élevages de bovins laitiers situés dans un rayon de 25 km autour d'un cabinet vétérinaire praticien. L'effectif total des vaches présent dans les élevages sélectionnés a été de 90 vaches (élevage 1, n=18 vaches, élevage 2 n=72). Le nombre de vaches suivies dans chaque élevage est de 6 pour l'élevage 1 (soit un échantillon de 33,33%) et 15 pour l'élevage 2 (soit un échantillon de n=20,83%). Les vaches suivies correspondent aux vaches dont le vêlage s'est déroulé entre janvier et mars 2021. Les animaux sont des multipares (2^{ème} et troisième lactation, et un âge de 3 à 5ans) et principalement de race Montbéliarde (66,66%) et Holstein (33,33%).

2.2.2. Caractéristiques des élevages sélectionnés :

Les caractéristiques des élevages sélectionnés sont rapportées dans le tableau 4. Brièvement, l'état d'hygiène a été moyen dans les deux élevages ; la litière a été suffisamment présente dans les 2 élevages ; la stabulation a été de type semi entravé dans l'élevage 2, et entravé dans l'élevage 1. La distribution de concentrés et CMV durant les 3 dernières semaines de lactation et la séparation des vaches tarées ont été différentes.

Tableau 4: Caractéristiques des élevages sélectionnés.

Caractéristiques	Elevage1	Elevage 2
État d'hygiène	Moyen	Moyen
Litière suffisante	Présente	Présente
Type de stabulation	Entravée	Semi-entravée
Aire d'exercice	Absente	Présente
Même alimentation pour tous les animaux (vache en lactation, tarées et génisses pleines)	Non	Non
Même alimentation pour tous les stades de lactation	Oui	Oui
Distribution de concentrés durant les 3 dernières semaines de lactation	Oui	Oui
Distribution de CMV durant les 3 dernières semaines de lactation	Non	Oui
Séparation des vaches tarées	Non	Oui

L'alimentation distribuée a été à base de (Tableau 5):

- Paille, Foin d'avoine, concentré pour l'élevage1.
- Ensilage, luzerne, paille, concentré pour l'élevage 2.

Tableau 5: Type et quantité d'aliment distribué dans les élevages sélectionnés.

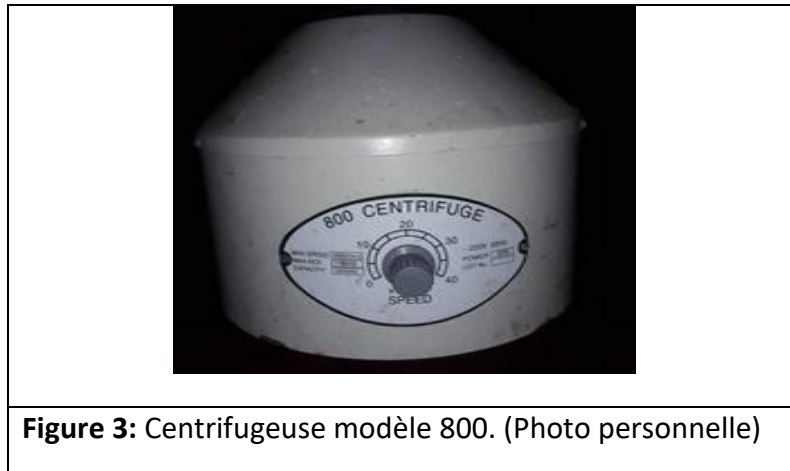
Type d'aliment	Elevage1				Elevage 2			
	Paille, Fourrages secs (Foin d'avoine), Concentré				Ensilage, luzerne, paille, concentré			
Quantité (Kg)	Tariissement		Lactation		Tariissement		Lactation	
	F	C	F	C	F	C	F	C
	2- 8	2	2- 8	8 – 10	8-10	1-2	17	10

F : fourrage, C : concentré.

2.2.3. Matériel de prélèvement et de dosage :

- Des tubes secs et héparinés de 5 ml (BD Vacutainer®) ont été utilisés pour les prélèvements de sang au niveau de la veine jugulaire. La centrifugation du sang prélevé a

été réalisée à l'aide d'une centrifugeuse modèle 800 (Low Speed Laboratory Centrifuge) (Figure 2). Pour la conservation du sang des cônes éppendorf ont été utilisés (4000 tour pendant 10 minutes).



- Un lecteur « FREESTYLE OPTIUM NEO » a été utilisé pour le dosage de BHB : c'est un appareil simple et fiable pour une lecture automatique et chiffrée de la glycémie et la cétonémie (Figure 3).



- Des kits de réactifs commerciaux de marques : *Cromatest*[®] (Espagne) et *Spinreact*[®](Espagne) ont été utilisés pour le dosage biochimique des paramètres sanguins suivants : glucose, albumine, protéines totales, cholestérol.
- Pour le dosage d'AGNE sérique, un kit commercial « FUJIFILM Wako Chemicals Europe GmbH , Allemagne» a été utilisé.
- Analyseur de nioch semi-automatique (spectrophotomètre) "WP 21B « SHENZHEN GENIUS ELECTRONICS CO » a été utilisé pour le dosage de l'ensemble des métabolites (Figure 4).



Figure 5 : Analyseur de niocch semi-automatique WP 21B. (photo personnelle)

2.3. Méthodes :

Dans une première étape des informations relatives à l'identification des vaches et les caractéristiques des élevages ont été récoltées et consignées sur des fiches de renseignements (Annexe 1, 2). Le choix s'est porté sur 21 vaches laitières en fin de période de tarissement (élevage 1 : 06 vaches, élevage 2 : 15 vaches).

2.3.1. Protocole expérimental :

Afin d'encadrer la période du *péripartum*, il a été choisi des élevages avec des vêlages groupés pour limiter le nombre de visites dans les exploitations. Les principales étapes du protocole sont illustrées dans la figure 5, à savoir :

- Une première visite a été réalisée à 270 jours post saillie /IA fécondante, afin que le prélèvement soit effectué dans les 14 à 3 jours avant le vêlage. Au cours de cette première visite, des prises de sang ont été réalisées et une notation de l'état d'engraissement des animaux a été faite suivant une grille simplifiée avec des NEC allant de 1 (très maigre) à 5 (trop gras) (Annexe 3, 4). (Edmonson et al., 1989 ; Bazin, 1989).
- Une seconde visite, 30 à 45 jours après vêlage (Pic de lactation), avait cette fois pour but de réaliser une notation de l'état corporel, et une nouvelle prise de sang sur les vaches. Une fois l'ensemble des prélèvements réalisés, un examen clinique des vaches, et des informations relatives aux troubles sanitaires survenant durant le 1er mois de lactation ont été enregistrées sur des fiches individuelles (Annexe 5).

2.3.2. Prélèvements :

Pour toutes les visites (à moins de 14 j du vêlage, et entre 30 j-45 j *postpartum*), deux prises de sang total ont été réalisées au niveau de la veine coccygienne sur tube sec et hépariné (5 ml). Les prélèvements sont immédiatement identifiés (Numéro de la vache, numéro et date prélèvement, code de la ferme), et placés à une température d'environ 4°C dans une glacière jusqu'au retour au cabinet du vétérinaire. A ce moment, une centrifugation du sang est réalisée à 3000 tours/min pendant 10 minutes pour séparer le plasma et sérum. Les aliquotes de sérums et plasmas ont été conservés dans des éppendorfs au congélateur à -20°C jusqu'au moment de l'analyse biochimique.

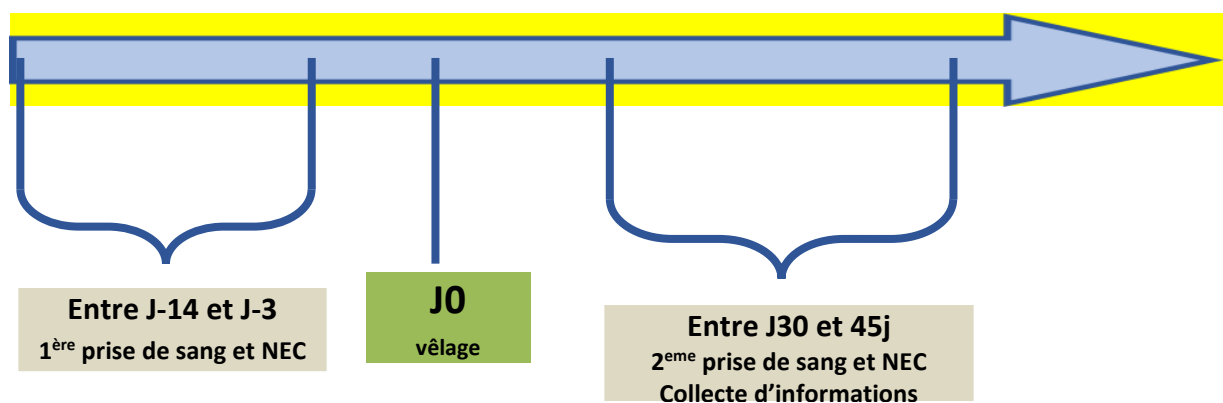


Figure 6: Schéma des principales étapes du protocole expérimental.

2.3.3. Méthodes de dosage :

Les analyses ont été effectuées au niveau du laboratoire des sciences vétérinaires de Blida 1. Tous les paramètres biochimiques étudiés ont été analysés par un analyseur de biochimie semi-automatique WP 21B.

2.3.3.1. Méthodes de dosages des paramètres biochimiques :

Les concentrations circulantes des différents métabolites ont été déterminées selon le mode opératoire du fabricant (*Cromatest*[®] et *Spinreact*[®]). Le principe de la méthode d'analyse pour chaque paramètre est comme suit :

2.3.3.1.1. Glucose :

Le glucose est dosé par une méthode enzymatique à hexokinase (HK) et glucose -6-phosphate déshydrogénase (G-6-PDH). L'absorbance due au NADH, H⁺ (concentration du glucose) est déterminé grâce une technique bichromatique en point final (340 et 373 nm).

2.3.3.1.2. Cholestérol :

Le cholestérol est dosé par méthode colorimétrique enzymatique. L'absorbance causée par DEA-HCL/AAP oxydée est directement proportionnelle à la concentration de cholestérol total est se mesure grâce à une technique polychromatique (452, 570, 700 nm) en point final.

2.3.3.1.3. Protéines totales (sériques et plasmatiques) :

Les protéines totales sont dosées selon la méthode de biuret (méthode de référence) dont le principe est que les ions cuivre (Cu^{++}) réagissent avec les liaisons peptidiques des protéines dans une solution basique. Le complexe protéine-cuivre de couleur bleue formé proportionnellement à la concentration des protéines totales est mesuré à l'aide d'une technique bichromatique en point final (540, 700 nm).

2.3.3.1.4. Albumine :

L'albumine est dosée par une technique chimique basée sur la méthode de doumas, watson et biggs, qui repose sur la liaison de l'albumine à un colorant, le vert de bromocrésol (BCG) en solution. L'albumine se lie de façon quantitative au BCG pour former un complexe albumine-BCG, qui est mesuré au point de virage de la réaction (en point final à 596-694 nm).

2.3.3.1.5. Dosage de BHB :

Le dosage des BHB a été réalisé sur du sérum comme rapporté par (Pineda et Cardoso, 2015) via le lecteur FREESTYLE OPTIUM NEO. Cet appareil fonctionne avec des électrodes FreeStyle Optium pour la mesure de la glycémie et avec les électrodes FreeStyle Optium β -cétone pour la mesure de l'acétonémie. Après insertion de l'électrode dans le lecteur une goutte de sérum ($2\mu\text{l}$) a été déposée sur son extrémité (Figure 6), la valeur du BHB est affichée au bout de 10 secondes sur l'écran du lecteur. Les résultats ont été notés sur les fiches individuelles de suivi puis sur un tableau Excel.

La différence moyenne par rapport à la méthode de référence est évaluée à $0,1 \text{ mmol.L}^{-1}$ lorsque la concentration en BHB est inférieure à $1,5 \text{ mmol.L}^{-1}$. Elle est de 10% lorsque la concentration en BHB est supérieure ou égale à $1,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ (Abbott diabètes care, 2006). Pour les concentrations inférieures à $1,5 \text{ mmol.L}^{-1}$, la déviation standard est de $0,04 \text{ mmol.L}^{-1}$ en moyenne. Pour des concentrations supérieures à $1,5 \text{ mmol.L}^{-1}$, le coefficient de

variation est de 3,1 à 3,8% en moyenne quel que soit le lot de bandelettes (Abbott diabète care, 2006).

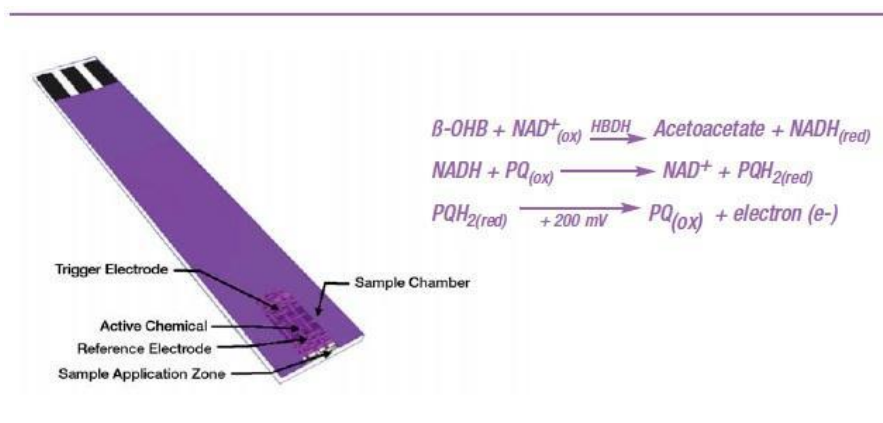


Figure 7 : Principe de fonctionnement de l'électrode de mesure de BHB du lecteur Optium (PQ = accepteur d'électron) (Abbott Diabetes Care, 2006).

2.3.3.1.6. Dosage d'AGNE :

Les prélèvements ont été placés au réfrigérateur, à une température de + 4°C afin de décongeler progressivement. Le dosage d'AGNE (NEFA) sérique a été réalisé selon le mode opératoire du fabricant (Annexe 6), en utilisant le kit de réactif fourni par Wako Chemicals (NEFA-HR (2)). Ce kit de réactifs de dosage NEFA basé sur une méthode enzymatique utilise la 3-méthyl-N-éthyl-N-(β-hydroxyéthyl)-aniline (MEHA) comme agent de couleur violette.

Principe de la méthode : L'acide gras non estérifié (NEFA) dans l'échantillon est converti en Acyl-CoA, AMP et pyrophosphorique (PPi) par l'action de l'Acyl-CoA synthétase (ACS), en coexistence avec la coenzyme A (CoA) et le sel disodique d'adénosine 5-triphosphate (ATP). L'Acyl-CoA obtenu est oxydé et donne du 2,3-trans-Enoyl-CoA et du peroxyde d'hydrogène par l'action de l'Acyl-CoA oxydase (ACOD). En présence de peroxydase (POD), l'hydrogène per -l'oxyde formé donne un pigment violet bleu par condensation d'oxydation quantitative avec 3-Méthyl-N-éthyl-N-(β-hydroxyéthyl)-aniline (MEHA) et 4-aminoantipyrine (4-AA). La concentration en acides gras non estérifiés (NEFA) est obtenue en mesurant l'absorbance du couleur bleu violet (546 nm et 660 nm).

2.3.3.2. Détermination des marqueurs d'inflammation et interprétation :

Les protéines totales sériques (PTS) et plasmatiques (PTP), l'albumine, les globulines et le fibrinogène, ont été déterminés puis utilisés pour diagnostiquer et les interpréter selon le diagramme rapporté par Knapp et Guyot, 2016 (figure 7).

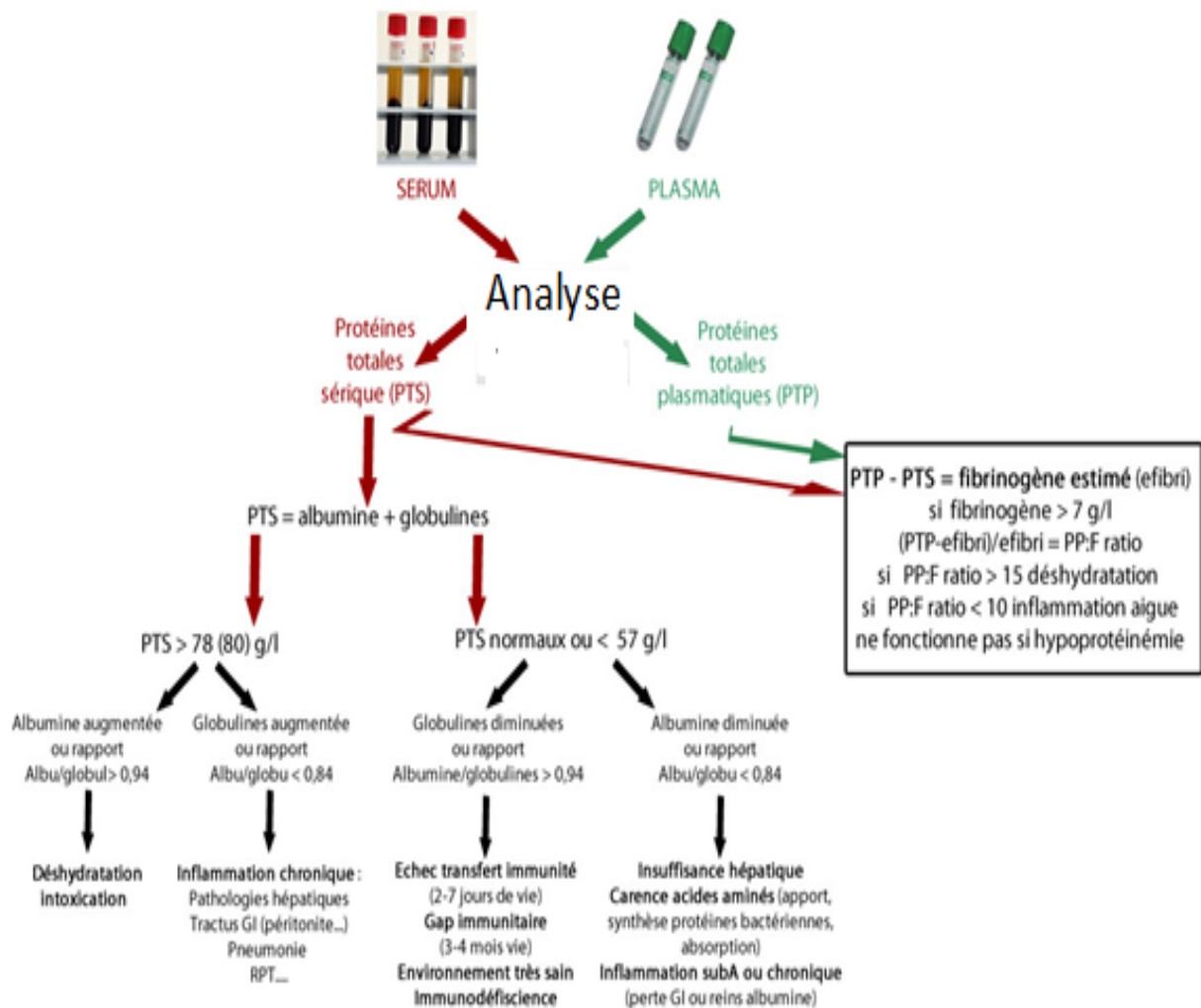


Figure 8: Utilisation et interprétation des protéines totales dans le diagnostic de l'inflammation. (PT : protéines totales ; PTS protéines totales sériques et PTP protéines totales plasmatiques ; F : fibrinogène estimé) (Knapp et Guyot, 2016).

2.3.3.3. Analyse des données :

2.3.3.3.1. Définitions et classement des vaches :

Les définitions suivantes ont été prises en considération pour le classement des vaches et traitement des données :

- Une vache est définie comme étant en cétose subclinique si elle présente une concentration sanguine en BHB supérieure ou égale à 1,200 mmol/L dans les 30-45j 30j-45j *postpartum* (Oetzel, 2004 ; Oliveira et Dubuc, 2014).
- La spécificité (Sp) est définie comme étant la capacité du dosage des AGNE ou BHB sanguins à prédire qu'une vache ne va pas développer de cétose subclinique en dessous d'un certain seuil préalablement défini.

- La Sensibilité (Se) est définie comme étant la capacité du dosage des AGNE ou BHB sanguins à prédire qu'une vache va développer une cétose subclinique à partir d'un certain seuil préalablement défini.
- La valeur prédictive positive (VPP) est la probabilité pour une vache ayant une concentration sanguine en AGNE ou BHB supérieur au seuil de mise en évidence d'une cétose subclinique développe effectivement une cétose subclinique dans les 30j-45j *postpartum*.
- La valeur prédictive négative (VPN) est la probabilité pour une vache ayant une concentration sanguine en AGNE ou BHB inférieur au seuil de mise en évidence d'une cétose subclinique ne développe effectivement pas une cétose subclinique dans les 30j-45j PP.
- Le coefficient d'exactitude (Ac pour « Accuracy » en anglais) est défini comme étant la capacité du dosage des AGNE sanguins ou BHB à prédire correctement qu'une vache va ou non présenter une cétose subclinique parmi celles qui, respectivement, développent ou non une cétose subclinique dans les 30j-45j *postpartum*.
- Un diagnostic correct est défini lorsqu'une vache présentant un risque de développer une cétose subclinique après vêlage développe effectivement une cétose subclinique (« a », Tableaux 6 et 7) ou lorsqu'une vache n'étant pas à risque de développer une cétose subclinique ne développe effectivement pas de cétose subclinique (« d », Tableaux 6 et 7). Un faux négatif est défini lorsqu'une vache ne présentant pas un risque de développer une cétose subclinique développe une cétose subclinique (« c », Tableaux 6 et 7). Un faux positif est défini lorsqu'une vache présentant un risque de développer une cétose subclinique ne développe pas de cétose subclinique (« b », Tableaux 6 et 7).

Tableau 6: comparaison de la concentration en BHB avant vêlage et de la concentration en BHB après vêlage.

		Concentration en BHB <i>postpartum</i> \geq à 1,200	
		+	-
Concentration en BHB <i>prépartum</i> > seuil	+	« a »	« b »
	-	« c »	« d »

« a » et « d », diagnostic correcte, « c », faux négatif, « b », faux positif.

Tableau 7: comparaison de la concentration en AGNE avant vêlage et de la concentration en BHB après vêlage.

		Concentration en BHB <i>postpartum</i> \geq à 1,200	
		+	-
Concentration en AGNE <i>prépartum</i> > seuil	+	« a »	« b »
	-	« c »	« d »

« a » et « d », diagnostic correcte, « c », faux négatif, « b », faux positif.

○ On se basant sur ces définitions, les Se, Sp, VPP, VPN et Ac sont calculés comme suit :

- $Se = [(a/a + c) * 100]$.
- $Sp = [(d/b + d) * 100]$.
- $VPP = [(a/a + b) * 100]$.
- $VPN = [(d/c + d) * 100]$.
- $Ac = [a+d / (a+b+c+d)] * 100]$.

2.3.3.3.2. Tests statistiques :

Les résultats ont été présentés sous la forme moyenne \pm SD (SD=écart type). Dans un premier temps, les indicateurs du métabolisme énergétique (AGNE, BHB), les paramètres biochimiques, les marqueurs d'inflammation et leur évolution autour du vêlage ont été décrits chez l'ensemble des vaches. Dans un deuxième temps les concentrations de l'ensemble des indicateurs, paramètres et marqueurs ont été analysées en suivant le principe de l'étude cas-témoin, avec une classification de vaches saines ou malades. La normalité de la distribution des concentrations des métabolites a été analysée par le test de Shapiro-Wilk. La corrélation entre les différents métabolites a été vérifiée avec le test Rho de Spearman. La comparaison des moyennes des concentrations de deux échantillons autour du vêlage a été effectuée pour : (i) les variables quantitatives, en utilisant le test de la somme des rangs de Mann-Whitney-Wilcoxon (test non paramétrique, effectifs faibles) (ii) les variables qualitatives, en utilisant le test exact de Fisher. Le logiciel Systat 10 a été utilisé pour l'ensemble des analyses statistiques.

RESULTATS

1. Etude descriptive :

1.1. Profils des concentrations des paramètres biochimiques avant et après vêlage :

Les résultats d'analyse des paramètres biochimiques de l'ensemble des vaches et leur évolution (avant et après le vêlage) sont présentés comme suit :

1.1.1. Concentration d'AGNE sériques :

Les concentrations des AGNE sériques avant et après vêlage sont rapportées dans le tableau 8 ci-dessous :

Tableau 8: Profil de la concentration des AGNE sériques de l'ensemble des vaches (moyenne \pm SD).

	AGNE (mmol/l)			
	Elevage 1 (n=06)	Elevage 2 (n=15)	Total	
			(n=21)	P
<i>Prépartum</i>	0,256 \pm 0,24	0,283 \pm 0,11	0,275 \pm 0,15	0.04
<i>Postpartum</i>	0,605 \pm 0,34	0,490 \pm 0,33	0,523 \pm 0,33	

Les résultats de l'analyse indiquent une augmentation significative de la concentration d'AGNE sériques après le vêlage chez l'ensemble des vaches (*Prépartum* : 0,275 \pm 0,15 vs *Postpartum* : 0,523 \pm 0,33, p=0.04). La figure 9 ci-dessous montre l'évolution de la concentration des AGNE chez l'ensemble des vaches.

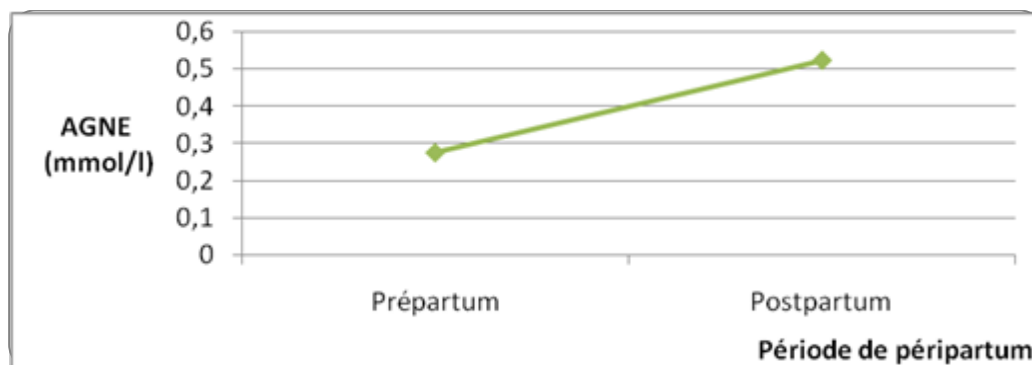


Figure 9 : Evolution de la concentration des AGNE sériques de l'ensemble des vaches.

1.1.2. Concentration de Cholestérol :

Les concentrations de la cholestérolémie sérique avant et après le vêlage sont rapportées dans le tableau 9 ci-dessous :

Tableau 9: Profil de la concentration de cholestérol de l'ensemble des vaches (moyenne± SD)

	Cholestérol (mmo/l)			
	Elevage 1 (n=06)	Elevage 2 (n=15)	Total	
			(n=21)	P
<i>Prépartum</i>	1,77±0,53	2,04±0,80	1,94±0,74	0.38
<i>Postpartum</i>	1,61±0,84	1,76±0,54	1,75±0,62	

Nos résultats montrent une baisse non significative de la cholestérolémie sérique après le vêlage chez l'ensemble des vaches (*Prépartum* : 1,94±0,74 vs *Postpartum* : 1,75±0,62, p= 0.38). La figure 10 ci-dessous montre l'évolution de la cholestérolémie sérique chez l'ensemble des vaches.

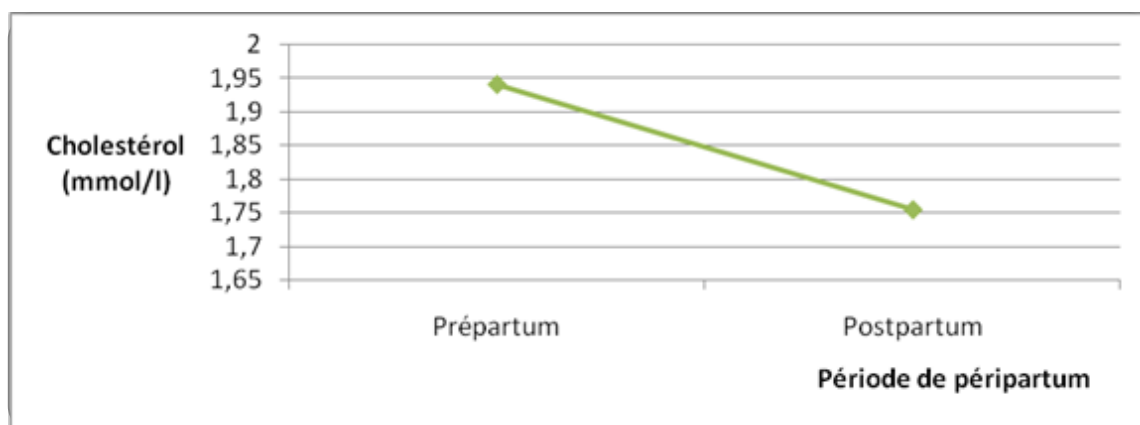


Figure 10 : Evolution de la concentration de la cholestérolémie de l'ensemble des vaches.

1.1.3. Ratio AGNE/Cholestérol :

Les ratios AGNE/Cholestérol calculés chez les vaches, avant et après le vêlage sont rapportés dans le tableau 10 suivant :

Tableau 10: Profil de la concentration des ratios AGNE/cholestérol de l'ensemble des vaches (moyenne \pm SD).

	Ratio AGNE/cholestérol			
	Elevage 1 (n=06)	Elevage 2 (n=15)	Total	
			(n=21)	P
<i>Prépartum</i>	0,22 \pm 0,24	0,18 \pm 0,13	0,19 \pm 0,17	0.05
<i>Postpartum</i>	0,40 \pm 0,23	0,31 \pm 0,24	0,33 \pm 0,23	

Une augmentation significative du ratio AGNE/cholestérol après le vêlage a été observée chez l'ensemble des vaches (*Prépartum* : 0,19 \pm 0,17 vs *Postpartum* : 0,33 \pm 0,23, p=0.05). La figure 11 ci-dessous montre l'évolution du ratio AGNE/cholestérol chez l'ensemble des vaches.

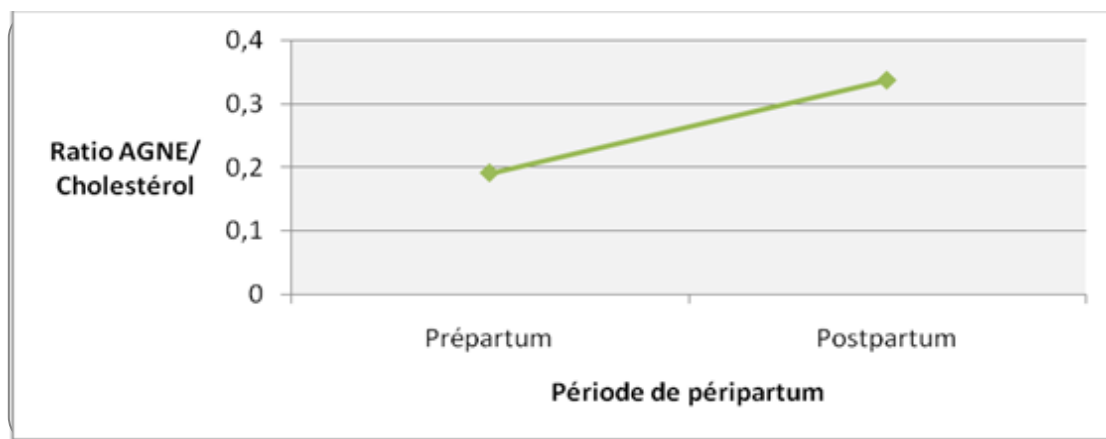


Figure 11 : Evolution des ratios AGNE/cholestérol de l'ensemble des vaches

1.1.4. BHB (mmol/l) :

Les concentrations des BHB sériques avant et après le vêlage sont rapportées dans le tableau 11 ci-dessous :

Tableau 11: Profil de la concentration des BHB sériques de l'ensemble des vaches (moyenne \pm SD).

	BHB (mmol/l)			
	Elevage 1 (n=06)	Elevage 2 (n=15)	Total	
			(n=21)	P
<i>Prépartum</i>	0,55 \pm 0,19	0,55 \pm 0,24	0,55 \pm 0,29	0.001
<i>Postpartum</i>	0,96 \pm 0,18	0,98 \pm 0,61	0,97 \pm 0,52	

Les résultats de l'analyse indiquent une augmentation très significative de la concentration des BHB sériques après le vêlage chez l'ensemble des vaches (*Prépartum* : $0,55 \pm 0,29$ vs *Postpartum* : $0,97 \pm 0,52$, $p=0.001$). La figure 12 ci-dessous montre l'évolution de la concentration des BHB chez l'ensemble des vaches.

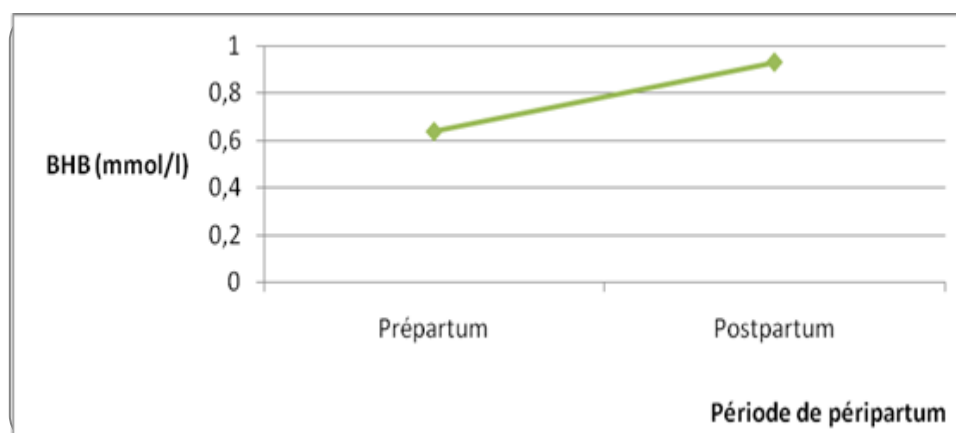


Figure 12: Evolution de la concentration des BHB sériques chez l'ensemble des vaches.

1.1.5. Concentration des protéines totales de sérum (g/l) :

Les concentrations des protéines totales sériques avant et après le vêlage sont rapportées dans le tableau 12 ci-dessous :

Tableau 12: Profil de la concentration des protéines totales sériques de l'ensemble des vaches (moyenne ± SD).

	Protéines totales sériques (g/l)			
	Elevage 1 (n=06)	Elevage 2 (n=15)	Total	
			(n=21)	P
<i>Prépartum</i>	76,58±8,71	78,98±13,56	77,53±15,33	0.88
<i>Postpartum</i>	77,91±4,21	78,28±6,07	78,48±6,80	

Aucune modification significative de la concentration des protéines totales sériques n'a été observée après le vêlage chez l'ensemble des vaches (*Prépartum* : $77,53 \pm 15,33$ vs *Postpartum* : $78,48 \pm 6,80$, $p=0.88$). La figure 13 ci-dessous montre l'évolution de la concentration des protéines totales sériques chez l'ensemble des vaches.

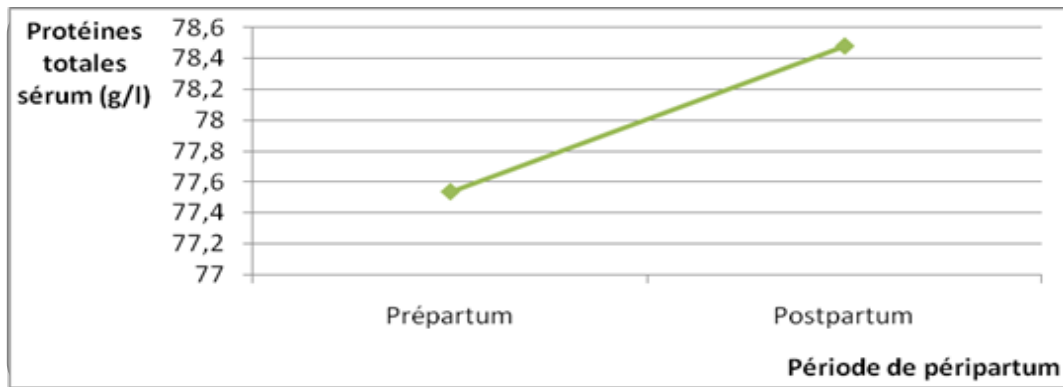


Figure 13: Evolution de la concentration des protéines totales sériques chez l'ensemble des vaches.

1.1.6. Concentration de l'Albumine (g/l) :

Les concentrations de l'albumine avant et après le vêlage sont rapportés dans le tableau 13 ci-dessous :

Tableau 13: Profil de la concentration de l'albumine de l'ensemble des vaches (moyenne \pm SD).

	Albumine sérique (g/l)			
	Elevage 1 (n=06)	Elevage 2 (n=15)	Total	
			(n=21)	P
<i>Prépartum</i>	42,36 \pm 4,46	33,79 \pm 5,84	36,24 \pm 6,68	0.0002
<i>Postpartum</i>	30,21 \pm 2,97	29,39 \pm 2,40	29,62 \pm 2,53	

Nos résultats montrent une diminution hautement significative de la concentration des albumines sériques après le vêlage chez l'ensemble des vaches (*Prépartum* : 36,24 \pm 6,68 vs *Postpartum* : 29,62 \pm 2,53, $p=0.0002$). La figure 14 ci-dessous montre l'évolution de la concentration des albumines sériques chez l'ensemble des vaches.

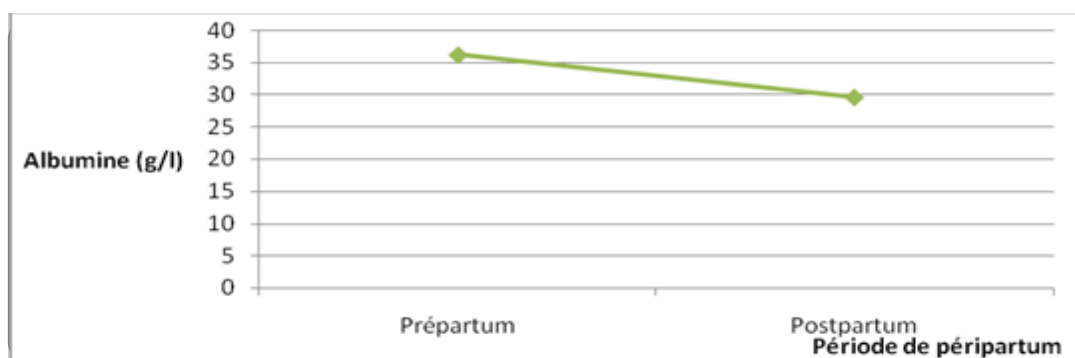


Figure 14: Evolution de la concentration de l'albumine chez l'ensemble des vaches

1.1.7. Concentration des globulines :

La concentration des globulines avant et après le vêlage sont rapportés dans le tableau 14 ci-dessous :

Tableau 14: Profil de la concentration de l'albumine de l'ensemble des vaches (moyenne± SD).

	Globulines (g/l)			
	Elevage 1 (n=06)	Elevage 2 (n=15)	Total	
			(n=21)	P
<i>Prépartum</i>	34,21±10,51	40,9±18,71	38,9±16,80	0.01
<i>Postpartum</i>	48,76±6,20	49,03±6,40	48,9±6,19	

Nos résultats montrent une augmentation significative de la concentration des globulines sérique après le vêlage chez l'ensemble des vaches (*Prépartum* : 38,9±16,80 vs *Postpartum* : 48,9±6,19, p=0.01). La figure 15 ci-dessous montre l'évolution de la concentration des globulines sérique chez l'ensemble des vaches.

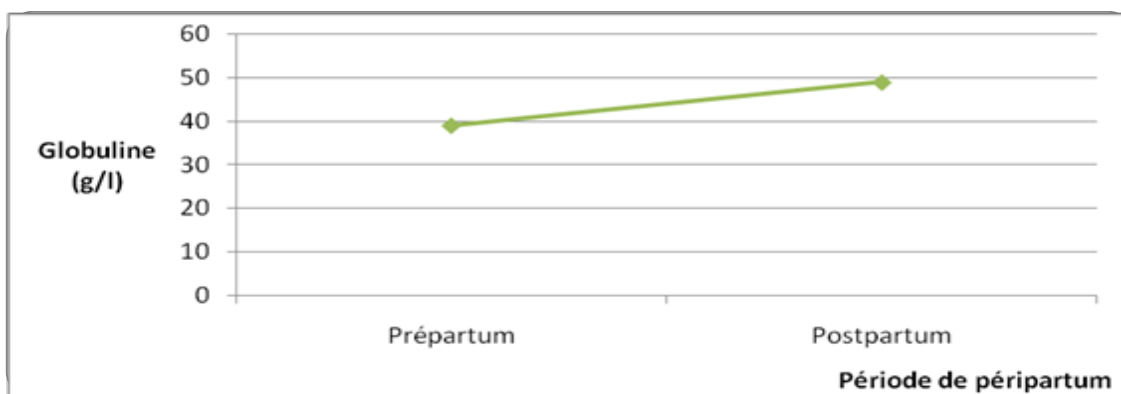


Figure 15: Evolution de la concentration des globulines chez l'ensemble des vaches.

1.1.8. Ratio Albumine /globulines :

Les ratios albumines /globulines estimés, avant et après le vêlage sont rapportés dans le tableau 15 suivant :

Tableau 15: Profil des ratios albumine /globulines estimés de l'ensemble des vaches (moyenne \pm SD).

	Ratio Albumines /globulines			
	Elevage 1 (n=06)	Elevage 2 (n=15)	Total	
			(n=21)	P
<i>Prépartum</i>	1,42 \pm 0,53	0,98 \pm 0,48	1,10 \pm 0,52	<0.0001
<i>Postpartum</i>	0,65 \pm 0,08	0,60 \pm 0,10	0,61 \pm 0,09	

Nos résultats montrent une baisse hautement significative du ratio albumine/globulines sérique après le vêlage chez l'ensemble des vaches (*Prépartum* : 1,10 \pm 0,52 vs *Postpartum* : 0,61 \pm 0,09, p =<0.0001). La figure 16 ci-dessous montre l'évolution des ratios albumine /globulines chez l'ensemble des vaches.

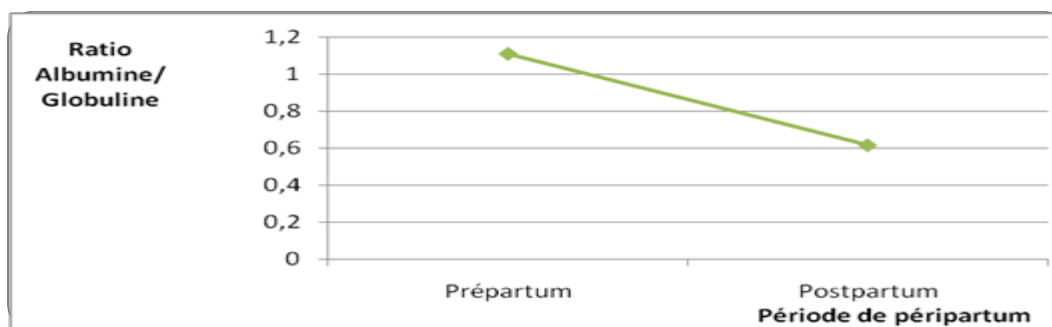


Figure 16: Evolution des ratios albumine /globulines chez l'ensemble des vaches.

1.2. Concentrations des protéines plasmatiques du fibrinogène, ratio protéine plasmatiques/fibrinogène et de la glycémie après vêlage :

Les concentrations des protéines plasmatiques, du fibrinogène, du ratio protéines plasmatiques/fibrinogène et de la glycémie après vêlage sont rapportés dans le tableau 16 ci-dessous :

Tableau 16 : Concentrations des protéines plasmatiques, du fibrinogène, du ratio protéines plasmatiques/fibrinogène et de la glycémie après vêlage.

	Protéines Plasmatiques (g/l)	Fibrinogène (g/l)	Ratio Protéines. Plasmatiques -fibrinogène	Glycémie (g/l)
Elevage 1(06)	84,88 \pm 5,67	5,9 \pm 1,93	15,03 \pm 6,21	0,74 \pm 0,08
Elevage 2(15)	86,82 \pm 8,58	8,54 \pm 4,94	12,07 \pm 6,90	0,78 \pm 0,11
Total (n=21)	86,26 \pm 7,77	7,78 \pm 4,42	12,91 \pm 6,70	0,77 \pm 0,10

Nos résultats montrent que chez l'ensemble des vaches :

- La concentration des protéines plasmatiques est de $86,26 \pm 7,77$ g/l.
- La concentration du fibrinogène estimé est de $7,78 \pm 4,42$ g/l.
- Le ratio protéines plasmatiques-fibrinogène est de $12,91 \pm 6,70$.
- La glycémie est de $0,77 \pm 0,10$ g/l.

La figure 17 ci-dessous montre la concentration des protéines plasmatiques, du fibrinogène, la glycémie et le ratio protéines plasmatiques/fibrinogène après vêlage chez les deux élevages et l'ensemble des vaches.

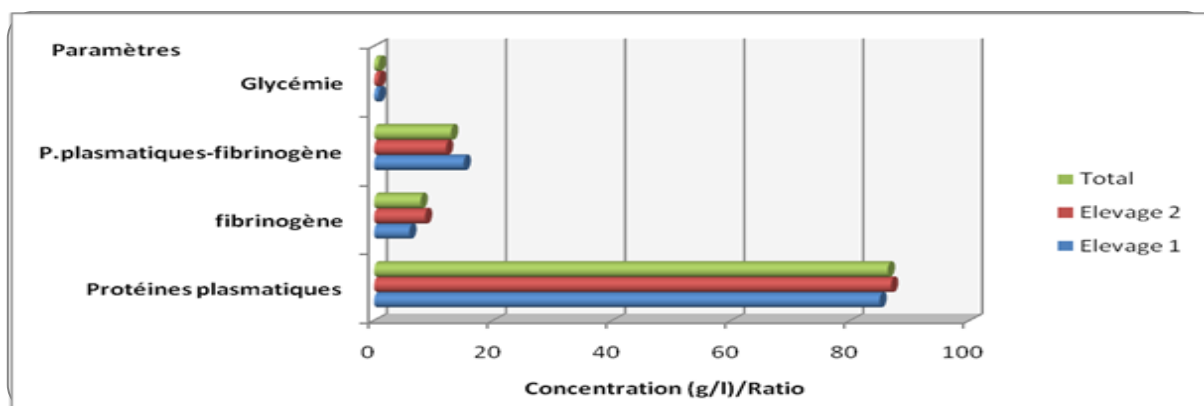


Figure 17: Concentration des protéines plasmatiques, du fibrinogène, la glycémie et le ratio protéines plasmatiques/fibrinogène après vêlage.

1.3. Evaluation de la note d'état corporel (NEC) :

Les résultats relatifs à l'évaluation de la note d'état corporel des vaches avant et après le vêlage sont rapportés dans le tableau 17 ci-dessous :

Tableau 17 : Note d'état corporel des vaches avant et après le vêlage.

	NEC			
	Elevage 1 (n=06)	Elevage 2 (n=15)	Total	
			(n=21)	P
<i>Prépartum</i>	3,20±0,43	3,13±0,20	3,15±0,28	<0.0001
<i>Postpartum</i>	2,58±0,49	2,18±0,22	2,29±0,36	

Nos résultats montrent une diminution significative de la NEC après le vêlage chez l'ensemble des vaches (*Prépartum* : $3,15 \pm 0,28$ vs *Postpartum* : $2,29 \pm 0,36$, $p < 0,0001$). La figure 18 ci-dessous montre l'évolution de la NEC chez l'ensemble des vaches.

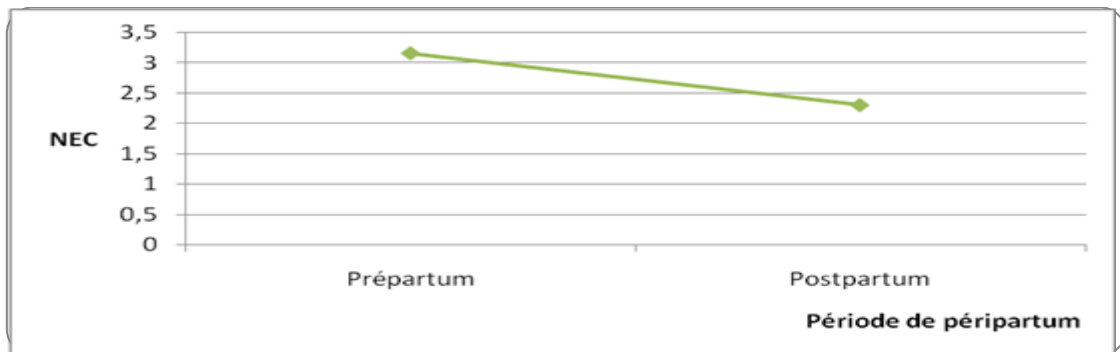


Figure 18: Evolution de la NEC chez l'ensemble des vaches.

2. Etude analytique :

2.1. Détection du déficit énergétique et prédiction de la survenue de l'acétonémie à l'aide des indicateurs du métabolisme énergétique (AGNE ET BHB) :

2.1.1. Classements des vaches en fonction de la concentration d'AGNE :

La concentration en AGNE varie de 0,04 à 0,6 mmol/L en *péripartum* et de 0,07 à 1,01 mmol/L en *postpartum*. En se référant à la définition de (Chapinal *et al.*, 2011), des seuils de concentrations sériques d'AGNE de 0,3 et 0,7 mmol/L, respectivement pour la période *prépartum* et *postpartum* ont été déterminés. Ces seuils, indicateurs d'un déficit énergétique, ont permis de définir deux groupes de femelles (Tableau 18).

Tableau 18: Définition des groupes de femelles en fonction des concentrations sériques en AGNE au cours de la période *péripartum*.

Groupes de vaches	Seuil de concentration AGNE (mmol/l)					
	<i>Prépartum</i>		P	<i>Postpartum</i>		P
	<0,3	≥0,3		<0,7	≥0,7	
Nombre de vaches et (%) de vache	11 (52,38)	10 (47,62)		10 (47,62)	11 (52,38)	
Concentration moyenne ± SD (mmol/l)	0,165 ± 0,098	0,397 ± 0,100	0,0001	0,260 ± 0,227	0,813 ± 0,112	0,0004

En prenant en compte le seuil *prépartum* de 0,3 mmol/L, 10 (47,62%) des femelles ont une valeur d'AGNE relativement élevée avant vêlage. Avec un seuil d'AGNE de 0,7 mmol/L *postpartum*, 11 (52,38%) vaches ont des valeurs supérieures au seuil indiquant un déficit énergétique. En effet, les mêmes vaches (10) détectées en *prépartum* et 01 nouvelle femelle (a une valeur d'AGNE sanguin *prépartum* inférieure à 0,3 mmol/L et en *postpartum* \geq 0,7mmol/L).

Une corrélation positive a été observée entre les concentrations d'AGNE en *prépartum* et celles en *postpartum*. Les vaches présentant des valeurs d'AGNE avant vêlage supérieures à 0,3 mmol/L ont significativement plus de chances de présenter après vêlage des valeurs d'AGNE supérieures à 0,7 mmol/L. ($r= 0.670$, $p=0.0008$).

1.3.1. Classements des vaches en fonction de la concentration en BHB et de cétose subclinique :

1.3.1.1. Concentration en BHB :

La concentration en BHB varie de 0,1 à 1,1mmol/L en *péripartum* et de 0,2 à 2,2mmol/L en *postpartum*. Le seuil de BHB *prépartum* ($\geq 0,6$ mmol/L), indiquant un risque de mobilisation des réserves corporelles a été défini pour les vaches. La répartition des femelles en fonction du seuil de BHB sanguin est rapportée dans le tableau 19 ci-dessous :

Tableau 19: Définition des groupes de femelles en fonction du seuil de BHB sanguin au cours de la période *prépartum*.

	Seuil de concentration BHB (mmol/l) <i>prépartum</i>		P
	<0,6	$\geq 0,6$	
Groupes de vaches	1	2	
Nombre de vaches et (%) de vache	12 (57.14)	09 (42,88)	
Concentration moyenne \pm écart type (mmol/l)	0,39 \pm 0,14	0,75 \pm 0,14	0,0001

En prenant en compte le seuil *prépartum* de 0,6 mmol/L, 09(42,88%) femelles ont une valeur de BHB relativement élevée avant vêlage.

1.3.1.2. Cétose subclinique :

La répartition des femelles en fonction du seuil de BHB sanguin *postpartum* $\geq 1,2$ mmol/L est rapportée dans le tableau 20 suivant :

Tableau 20: Définition des groupes de femelles en fonction de l'atteinte de cétose subclinique au cours de la période *postpartum*.

Groupes de vaches	Seuil de concentration BHB (mmol/l)		P
	<1,2	≥1,2	
Nombre de vaches et (%) de vache	12 (57,14)	09 (42,86)	
Concentration moyenne ± SD (mmol/l)	0,63±0,26	1,43±0,40	0,0001

Au sein de notre échantillon, 09 vaches ont présenté un état de cétose subclinique après vêlage, soit une prévalence de 42,86%.

1.3.2. Lien BHB avant vêlage / BHB après vêlage :

Aucun lien significatif n'a été montré entre les vaches présentant des concentrations de BHB avant vêlage \geq à 0,6 mmol/L et les concentrations de BHB après vêlage élevées (\geq 1,2 mmol/L) au sein de notre groupe de vaches ($r= 0.20$, $p=0.38$).

Les résultats de prédiction de la cétose *postpartum*, à partir d'un seuil de concentration en BHB *prépartum* de 0,6 mmol/L, montrent une sensibilité très mauvaise (44,44 %) et une spécificité assez moyenne (58,33 %). Ces résultats de prédiction de la cétose *postpartum*, à partir du BHB dans les deux semaines avant vêlage, sont très médiocres ($Ac=52,38\%$).

Tableau 21: Résultats de prédiction de l'acétonémie (BHB après vêlage $\geq 1,200$ mmol/l) à partir d'un seuil BHB avant vêlage (≥ 0.6 mmol/l).

Concentration en BHB <i>Prépartum</i> ($\geq 0,6$ mmol/l)	Concentration en BHB <i>postpartum</i> ($\geq 1,200$ mmol/l)	
	Se = $(4/4+5)100= 44,44\%$	Sp = $(7/7+5)100= 58,33\%$
VPP = $(4/4+5)100= 44,44\%$	VPN = $(7/5+7)100=58,33\%$	

1.3.3. Lien AGNE avant vêlage / BHB après vêlage :

La corrélation entre la concentration sanguine en AGNE avant vêlage et celle en BHB après vêlage est fortement positive au sein de notre groupe de vaches ($r=0.74$, $p= 0.0001$).

Les résultats de prédiction de la cétose *postpartum* montrent une très bonne sensibilité (88,88%) et une très bonne spécificité (83,33 %).

Ces résultats de prédiction de la cétose *postpartum* (c'est à dire vache avec [BHB] $\geq 1,2$ mmol/L, dans les 30j45j *postpartum*), à partir à partir d'un seuil de concentration en AGNE *prépartum* de 0,3 mmol/L, sont très bons (AC=85,71%).

Tableau 22: Résultats de prédiction de l'acétonémie (BHB après vêlage $\geq 1,200$ mmol/L) à partir d'un seuil d'AGNE avant vêlage (≥ 0.3 mmol).

Concentration en AGNE avant vêlage (≥ 0.3 mmol/l).	Concentration en BHB <i>postpartum</i> ($\geq 1,200$ mmol/l)	
		Se= $(8/8+1)100=88,88\%$
	VPP= $(8/8+2)100=80\%$	VPN = $(10/10+1)100=90\%$

2.2. Influence du déficit énergétique sur les paramètres biochimiques et relation entre les indicateurs du déficit énergétique (AGNE et BHB) /cétose et les marqueurs d'inflammation :

À partir du (Tableau 23) et après élimination des faux négatifs (02) et faux positifs (01) (vaches présentant des concentrations AGNE (≥ 0.3 mmol/l et BHB $<1,2$ mmol/l ou <0.3 mmol/l et BHB $\geq 1,2$ mmol/l), deux groupes de vaches ont été définis (vaches malades : présentant un déficit énergétique et cétose en *post partum* ; vaches présumées saines : ne présentant pas de déficit énergétique et cétose en *postpartum*).

La comparaison des moyennes des concentrations des différents métabolites des deux groupes de vaches est rapportée dans le tableau 23. Nos résultats montrent que comparativement aux vaches présumées saines (VS), les vaches malades (VM) (présentant un AGNE (≥ 0.3 mmol/l) et cétose en *postpartum* BHB $\geq 1,2$ mmol/l) ont :

- Un taux de cholestérol significativement plus faible en *prépartum* [(VM) 1.35 ± 0.53 vs 2.29 ± 0.37 (VS), $p=0.006$].
- Un ratio AGNE / cholestérol plus élevé en pré et *postpartum* [(*prépartum* : (VM) 0.35 ± 0.15 vs 0.06 ± 0.04 (VS), $p < 0.0001$; *postpartum* : (VM) 0.53 ± 0.19 vs 0.14 ± 0.09 (VS), $p < 0.0001$].
- Une valeur de fibrinogène estimé qui tend à être significativement plus élevée en *postpartum* [(VM) 9.98 ± 5.64 vs 6.34 ± 3.38 (VS), $p=0.07$].
- Un ratio protéines plasmatiques-fibrinogène significativement différent [(VM) 9.84 ± 3.70 vs 15.88 ± 8.25 (VS), $p=0.04$].

Nos résultats montrent aussi que chez les vaches malades,

- Le ratio AGNE / cholestérol tend à augmenter en *postpartum* (*prépartum* : 0.35 ± 0.15 vs *postpartum* : 0.53 ± 0.19 , $p = 0.06$)
- La concentration d'albumine a significativement baissé en *postpartum* (*prépartum* : 37.27 ± 7.06 vs *postpartum* : 28.7 ± 3.28 , $p = 0.01$)
- La concentration de globulines a significativement augmenté en *postpartum* (*prépartum* : 32.81 ± 12.48 vs *postpartum* : 49.42 ± 6.66 , $p = 0.02$).
- Le ratio albumine / globulines a significativement baissé en *postpartum* (*prépartum* : 1.31 ± 0.63 vs *postpartum* : 0.59 ± 0.10 , $p = 0.0003$)

Tableau 23: Résultats comparés des paramètres biochimiques et des marqueurs d'inflammation entre les vaches malades et présumées saines.

Paramètres		Vaches malades(n=08)	Vaches présumées saines (n=10)	p
AGNE	<i>Prépartum</i> (mmol/l)	0.417±0.10	0.150±0.09	0.0004
	<i>Postpartum</i> (mmol/l)	0.718±0.10	0.275±0.23	0.002
BHB	<i>Prépartum</i> (mmol/l)	0.62±0.21	0.49±0.25	0.442
	<i>Postpartum</i> (mmol/l)	1.46±0.42	0.58±0.25	0.0003
Cholestérol	<i>Prépartum</i> (mmol/l)	1.35±0.53	2.29±0.37	0.006
	<i>Postpartum</i> (mmol/l)	1.52±0.42	1.88±0.79	0.572
Ratio AGNE / cholestérol	<i>Prépartum</i>	0.35±0.15	0.06±0.04	<0.0001
	<i>Postpartum</i>	0.53±0.19	0.14±0.09	<0.0001
Protéines sériques totales	<i>Prépartum</i> (g/l)	74.63±11.16	80.77±15.97	0.359
	<i>Postpartum</i> (g/l)	78.12±6.95	77.98±6.29	0.722
Albumine	<i>Prépartum</i> (g/l)	37.27±7.06	35.46±7.15	0.633
	<i>Postpartum</i> (g/l)	28.7±3.28	29.69±1.81	0.306
Globulines	<i>Prépartum</i> (g/l)	32.81±12.48	44.12±19.27	0.10
	<i>Postpartum</i> (g/l)	49.42±6.66	48.29±6.96	0.798
Ratio albumine / globulines	<i>Prépartum</i>	1.31±0.63	0.93±0.37	0.247
	<i>Postpartum</i>	0.59±0.10	0.62±0.10	0.408
Protéines plasmatique totales (g/l)		88.11±10.36	84.32±6.26	0.633
Fibrinogène estimé (g/l)		9.98±5.64	6.34±3.38	0.07
Ratio Protéines /Plasmatiques-fibrinogène		9.84±3.70	15.88±8.25	0.04
Glycémie (g/l)		0,74±0.10	0,79±0.07	0.305

DISCUSSION

1. Détection du déficit énergétique et prédiction de la survenue de l'acétonémie à l'aide des indicateurs du métabolisme énergétique.

1.1. Les AGNE :

Nos résultats montrent, chez l'ensemble des vaches, une concentration sérique d'AGNE *prépartum* de $0,275 \pm 0,15$ mmol/l ; celle-ci a augmenté significativement ($p=0.04$) après vêlage ($0,523 \pm 0,33$ mmol/l). En effet, les AGNE proviennent de la lipomobilisation et sont fortement corrélés au bilan énergétique (Raboisson et Schelcher, 2009). Le dosage avant vêlage permet de détecter un déficit énergétique et d'évaluer la prédisposition des animaux au développement de différentes maladies telles que la cétose, la stéatose (Crocco, 2017). De nombreux auteurs préconisent des valeurs inférieures à 0,3 ou 0,4 mmol/L avant vêlage (Oetzel, 2008 ; Ospina *et al.*, 2010 ; Duffield, 2011). En prenant en compte le seuil *prépartum* de 0,3 mmol/L, 10 (47,62%) des femelles ont une valeur d'AGNE relativement élevée avant vêlage, ce qui indique un début de déficit énergétique précoce pendant la période de tarissement au sein de notre échantillon.

Le dosage des AGNE peut également être fait en début de lactation. Dans ce cas, la valeur seuil est plus élevée : 0,6 -0,7 mmol/L (Van Saun, 2000 ; Seifi *et al.*, 2011). Dans notre étude, l'utilisation d'un seuil d'AGNE *postpartum* de 0,7 mmol/L, a permis de détecter 11 cas (52,38%) en déficit énergétique. De plus, une corrélation positive a été observée entre les concentrations en *prépartum* et celles en *postpartum* ; les vaches présentant des valeurs supérieures à 0.3 mmol/l ont significativement plus de chances de présenter après vêlage des valeurs d'AGNE supérieures à 0.7 mmol/l. En revanche, Ospina *et al.*, (2010), suggèrent un seuil d'AGNE *postpartum* de 0.5mmol/L pour prédire le développement de maladies. Néanmoins, ces derniers auteurs, rapportent que le dosage d'AGNE n'a plus grand intérêt après vêlage car leur concentration est très variable et difficile à interpréter et que l'on dispose d'un indicateur relativement fiable et facilement accessible : le BHB.

1.2. BHB :

La moyenne des concentrations de BHB avant vêlage a été de $0,55 \pm 0,29$ mmol/l. Il est à noter que le dosage de BHB peut avoir lieu en *prépartum* pour détecter une éventuelle balance énergétique négative en fin de tarissement et le seuil retenu est alors de 0,6 mmol/l

(Lauriane, 2015). Dans notre étude, 09 (soit 42,88%) femelles ont une valeur de BHB relativement élevée avant vêlage ($\geq 0,6$ mmol/l) ce qui indique encore une fois un début de déficit énergétique chez ces vaches confirmant ainsi les résultats obtenus par le dosage des AGNE.

Après vêlage, la moyenne des BHB a significativement augmenté chez l'ensemble des vaches (*Prépartum* : $0,55 \pm 0,29$ vs *Postpartum* : $0,97 \pm 0,52$, $p=0.001$). Il est à signaler qu'une augmentation de BHB est physiologique et semble être liée à la lipomobilisation et au déficit énergétique physiologique observé en début de lactation (Herdt, 2000 ; Radostits *et al.*, 2007). Selon (Crocco, 2017), une élévation précoce en *postpartum* du BHB sanguin indiquera davantage un dysfonctionnement dans le rationnement et la gestion des vaches tarées. Néanmoins, les concentrations élevées de BHB observée dans notre étude semblent indicatrices de la présence de cas d'acétonémie au sein de notre échantillon. Par ailleurs, en utilisant le seuil BHB $\geq 1,2$ mmol/l retenu par plusieurs auteurs (Gross *et al.*, 2011), une prévalence de 42,86% de cétose subclinique a été obtenue en *postpartum*. Cette prévalence est supérieure à celle décrite par certains auteurs (Andersson, 1988 ; Duffield, 2000 ; Asl *et al.*, 2011) qui varie de 8,9% à 34%. Selon (Crocco, 2017) une hausse plus tardive (entre 15 et 35 jours après le part) orientera le praticien vers une inadaptation de la transition *péripartum* et/ou de la ration de début de lactation.

1.3. Lien AGNE *prépartum* /BHB *postpartum* et prédiction du risque d'acétonémie :

Une corrélation fortement positive a été observée entre les vaches qui avaient une concentration d'AGNE $\geq 0,3$ mmol/L en *prépartum* et les vaches avec concentration de BHB *postpartum* ≥ 1.2 mmol/l. Ce seuil a été associé à un couple sensibilité et spécificité respectivement de 88.88% et 83.33%, et un coefficient d'exactitude de 85.71%. En effet, on visualise bien qu'au-delà d'un seuil $\geq 0,3$ mmol/L de concentration AGNE *prépartum*, la vache a toutes les chances d'avoir les BHB *postpartum* augmentés et donc de développer une cétose. Ces seuils ($\geq 0,3$ mmol/L, 1.2 mmol/l) sont en accord avec ceux donnés dans la littérature. (Asl *et al.*, 2011) en déterminant un seuil de 0,26 mmol/L pour la détection précoce de la cétose, ont trouvé une sensibilité et une spécificité semblable à la nôtre (Se = 82,54 % et Sp = 91,89 %). De même, nos résultats sont en accord avec les résultats obtenus par (Commun *et al.*, 2014), qui en utilisant un seuil > 0.29 mmol/L, obtiennent une sensibilité, une spécificité et une exactitude de test, respectivement de 77 % et 74 % et 82 %.

1.4. Lien BHB *prépartum*/BHB *postpartum* et prédiction du risque d'acétonémie :

Nos résultats ne montrent aucun lien significatif entre les concentrations de BHB \geq à 0,6 mmol/L en *prépartum* et l'état de cétose subclinique observé chez les vaches en *postpartum* (BHB \geq 1,2mmol/l). Ce seuil est associé à une couple sensibilité et spécificité médiocre (44.44%, 58.33%), et un faible coefficient d'exactitude (52,38%) ce qui est en adéquation avec les résultats de 44,8% (sensibilité), 69%(spécificité) et 57,7% (coefficient d'exactitude) obtenus par (Alves De Oliveira, 2014) .Ces résultats de prédiction de la cétose *postpartum*, à partir du BHB avant vêlage, sont donc très médiocres ce qui est en accord avec les études parues à ce sujet (Chapinal *et al.*, 2011 ; Duffield, 2011). D'ailleurs, ces derniers auteurs ne recommandent l'utilisation de BHB pour détecter et prédire l'acétonémie qu'en début de lactation. Cependant, certains seuils sont tout de même proposés dans la littérature. Ainsi, (Roberts *et al.*, 2012) rapportent qu'une concentration en BHB proche de 0.7 mmol/l dans la dernière semaine avant vêlage semble être associée à des risques plus importants d'abattage des vaches en *postpartum*.

1.5. La note d'état corporel :

L'estimation de la NEC bien qu'elle soit simple et subjective, elle permet d'évaluer indirectement le statut énergétique des femelles. En effet, une relation étroite a été rapportée entre la note d'état corporel et le bilan énergétique en début de lactation (Bukley *et al.*, 2003 ; Roche *et al.*, 2009), rapportent qu'une vache qui perd beaucoup d'état corporel en début de lactation a bien plus le risque de développer des troubles métaboliques et une diminution de la fertilité.

Les vaches de notre échantillon ont présenté avant vêlage une NEC moyenne de 3,15 points. En effet, l'objectif à atteindre en note d'état corporel au vêlage est une note comprise entre 3 et 3,5 (Rollin, 2002 ; Laumonnier, 2006) avec un optimum de 3,25 pour certains auteurs (Walsh *et al.*, 2007 ; Seifi *et al.*, 2011). Cependant, une diminution de la NEC de 0,8 point, soit une moyenne de 2,29, a été observée sur notre échantillon au pic de lactation, ce qui est déconseillé par plusieurs auteurs (Pedron *et al.*, 1993 ; Domecq *et al.*, 1997 ; Roche *et al.*, 2009). En moyenne la perte de NEC ne doit pas excéder 1 point dans le premier mois *postpartum* (Walsh *et al.*, 2007 ; Seifi, *et al.*, 2011). Cette situation montre encore une fois que les vaches mobilisent fortement leurs réserves corporelles en début de lactation et présentent un bilan énergétique négatif.

1.6. La glycémie :

La glycémie est considérée fréquemment comme un indicateur du statut énergétique. Dans notre étude, la glycémie a été de $0,77 \pm 0,10$ g/l. Cette valeur, appartient à la fourchette des valeurs normales comprise entre 0,35 et 0,88 g/L, rapportée chez les bovins adultes (Kaneko, 1997 ; Carlson, 2009). Elle n'est pas aussi stable que dans d'autres espèces et varie en fonction des individus et de leur stade physiologique mais aussi au cours de la journée notamment en fonction du stress, du nombre et du moment des repas (Radunz *et al.*, 2010). La baisse de concentration du glucose sérique est associée à un bilan énergétique négatif. Dans le cas de l'acétonémie, la glycémie permet de distinguer la cétose de type I de la cétose de type II. Alors qu'une hypoglycémie sera synonyme d'acétonémie de type 1, une glycémie normale voire légèrement augmentée fera penser à une acétonémie de type 2 (stéatose hépatique) (Oetzel, 2008 ; Oliveira et Dubuc, 2014). De manière général chez les bovins, il faut de toute façon toujours rester prudent dans l'interprétation des valeurs de glycémie afin de diagnostiquer un déficit énergétique (Herdt 2000 ; Raboisson *et al.*, 2009).

2. Influence du déficit énergétique sur les paramètres biochimiques et relation entre les indicateurs du déficit énergétique (AGNE et BHB) /cétose et les marqueurs d'inflammation.

2.1. Les paramètres biochimiques :

2.1.1. Cholestérolémie :

Nos résultats montrent que la majorité des animaux ont une cholestérolémie de $1,94 \pm 0,74$ et $1,75 \pm 0,62$, respectivement en *prépartum* et *postpartum*, ces concentrations appartiennent à la fourchette des valeurs rapportées par (Gerardo *et al.*, 2009) qui sont comprises entre 1.3 - 3.0 et 1.9–2.9 respectivement pour les deux stades physiologiques. Les valeurs dans le sérum des vaches dans notre étude étaient en moyenne comparables à celles rapportées dans la littérature : 1,96-2,12 (Hansen *et al.*, 2014), 1,75-2,35 (Engle *et al.*, 2001) ou 1,92 à 2,29 (Hutchinson *et al.*, 2012), alors que des valeurs plus faibles ont été observées par (Chladek *et al.*, 2004) : 1,04 à 1,77, ou par (Guedon *et al.*, 1999) : $1,01 \pm 3$. Chez les vaches laitières, le cholestérol varie en fonction du stade de lactation : il est bas pendant le tarissement et en début de lactation, atteint un pic en milieu de lactation puis diminue en fin de lactation. En effet, la cholestérolémie renseigne sur la mobilisation des réserves de

graisses corporelles par l'animal. Le cholestérol est présent en grande quantité dans les VLDL (very low densité lipides). Ainsi, la mesure du cholestérol total reflète indirectement la présence de VLDL dans le sang, et en conséquence la capacité du foie à produire des VLDL. Or si la production des VLDL est compromise, cela peut entraîner une lipidose hépatique (Van Saun, 2000).

Nos résultats montrent que comparativement aux vaches présumées saines (VS), les vaches malades (VM) ont présenté, un taux de cholestérol significativement plus faible en prépartum [(VM) 1.35 ± 0.53 vs 2.29 ± 0.37 (VS), $p = 0.006$], qui semble être liée à une infiltration hépatique précoce de ces vaches en période de tarissement. Cette dernière peut être due à une mobilisation intense des réserves lipidiques et par conséquent une réduction de la synthèse et de sécrétion hépatique du cholestérol et des lipoprotéines surtout les VLDL qui contiennent un pourcentage élevé de cholestérol (Gerardo *et al.*, 2009 ; Djokovic, 2010).

2.1.2. Ratio AGNE/Cholestérol :

Selon (Mostafavi *et al.*, 2013), le ratio AGNE / cholestérol serait prédictif de lipidose hépatique en fin de tarissement et en *postpartum*. Les vaches avec un ratio AGNE / cholestérol $> 0,2$ étaient 9,9 fois plus susceptibles d'être affectés par une stéatose hépatique. Dans notre étude, comparativement aux vaches présumées saines (VS), un ratio AGNE / cholestérol plus élevé en pré et *postpartum* a été constaté chez les vaches malades [(*prépartum* : (VM) 0.35 ± 0.15 vs 0.06 ± 0.04 (VS), $p < 0.0001$; *postpartum* : (VM) 0.53 ± 0.19 vs 0.14 ± 0.09 (VS), $p < 0.0001$)]. Les valeurs élevées du ratio AGNE/cholestérol peuvent fortement évoquer d'une lipidose hépatique en pré et *postpartum* chez les vaches cétoniques confirmant ainsi la présence d'un déficit énergétique déjà signalé au paravent par les dosages des BHB et AGNE.

2.2. Les marqueurs d'inflammation :

2.2.1. Les protéines totales :

Aucune modification significative de la concentration des protéines totales sériques n'a été observée après le vêlage chez l'ensemble des vaches (*prépartum* : $77,53 \pm 15,33$ vs $78,48 \pm 6,80$: *postpartum*, $p=0.88$). De même, aucune différence significative n'a été observée entre les vaches malades et saines. Les valeurs moyennes de protéinémie enregistrées étaient légèrement supérieures à la plage normale signalée par (Bradford *et al.*,

2020) qui varie de 67 à 74,6 g/L. Les protéines totales sont constituées d'albumine et de globulines. Le sérum est le substrat de référence pour évaluer l'albumine et les globulines (Russel et Roussel, 2007). L'élévation du taux de protéines totales après le part peut-être dû au changement de la ration (augmentation de la quantité du concentré distribué) qui aboutit à une synthèse accrue de l'acide propionique et par conséquent des protéines sériques (Hagawane *et al.*, 2009 ; Piscine *et al.*, 2009). L'hyperprotéïnémie résulte aussi de l'augmentation des concentrations en albumine, en globuline ou des deux composantes. Le taux de protéines totales augmente en cas d'hémoconcentration lorsque l'animal présente une déshydratation. Cependant, si les protéines totales sont supérieures à 78 g/l et le taux de globulines est élevé on suspectera un processus infectieux ou inflammatoire aigu ou chronique (Brugere-Picoux et Remy, 1995).

2.2.2. Albuminémie :

Nos résultats montrent que l'albuminémie a significativement baissé en *postpartum* (*prépartum* : $36,24 \pm 6,68$ vs $29,62 \pm 2,53$: *postpartum*, $p=0.0002$). Et elle a aussi significativement baissé chez les vaches malades (*prépartum* : 37.27 ± 7.06 vs 28.7 ± 3.28 : *postpartum*, $p= 0.01$). L'albumine sérique est synthétisée par le foie à partir des protéines absorbées dans l'intestin et des protéines corporelles. Elle constitue la fraction protéique majeure indicatrice de l'état inflammatoire (protéine négative) chez les animaux. En effet, les valeurs d'albumine observées en *prépartum* sont comparables à celles décrites par (Russel et Roussel, 2007 ; Alberghina *et al.*, 2011) qui varient de 32 à 38 g/l. Par contre, la baisse d'albuminémie constatée en *post partum* pourrait être expliquée par le passage d'albumine vers la mamelle afin de fournir les acides aminés nécessaires pour la synthèse du lait lors d'un apport alimentaire insuffisant (Bell *et al.*, 1995). Néanmoins, l'hypoalbuminémie enregistrée pourrait aussi s'expliquer par un dysfonctionnement hépatique. En effet, une valeur basse de l'albuminémie renseigne sur l'installation de stéatose hépatique (Sevinç *et al.*, 2003) et l'altération de la fonction endogène du foie (Bobe *et al.*, 2004 ; Piccione *et al.*, 2009 ; Djokovic, 2013). De plus, rapporte que la concentration élevée d'AGNE en période de transition serait responsable de la diminution et de l'altération des fonctions de transport d'albumine.

2.2.3. Les globulines :

La globulinémie est la concentration sanguine en globulines (alpha, bêta et gamma). Dans cette étude, la moyenne de la globulinémie chez toutes les vaches a été significativement différente entre le *prépartum* et le *postpartum* (*prépartum* : 38,99±16,80 vs 48,9±6,19 : *postpartum*, p=0.01). Dans le groupe des vaches malades, la globulinémie a significativement augmenté en *post partum* (*prépartum* : 32.81±12.48 vs *postpartum* : 49.42±6.66, p= 0.02) et la valeur obtenue est supérieure à la borne physiologique de 30 - 40 g/L rapportée par (Bradford *et al.*, 2020). Connaissant que les globulines sont synthétisées par les lymphocytes et les plasmocytes, elles augmentent dans le sang en cas de processus infectieux ou inflammatoire (Kouamo *et al.*, 2011).

Il est à signaler, que les principales causes d'hyperglobulinémie sont la stimulation antigénique chronique (maladie inflammatoire chronique) et les maladies hépatiques. La stimulation antigénique chronique peut-être rencontrée dans de nombreuses affections telles que la réticulo-péritonite traumatique, les abcès hépatiques ou encore une pneumonie chronique (Russel et Roussel, 2007).

2.2.4. Ratio albumine/globuline :

Nos résultats révèlent une baisse hautement significative du ratio albumine/globulines sérique après vêlage chez l'ensemble des vaches (*prépartum* : 1,10±0,52 vs 0,61±0,09 : *postpartum*, p=<0.0001). Ce ratio a fortement baissé en *postpartum* chez le groupe de vaches cétoniques (0.59±0.10, p= 0.0003), ce qui est relativement faible par rapport aux marges des valeurs de références, entre 0,84 et 0,94g/l, décrites par (Knapp et guyot, 2016). Il est à noter que lorsque la concentration des protéines sériques totales est ≥78g/l et qu'un ratio albumine/globulines est <0.84g/l, comme c'est le cas de ce groupe de vache malades dans notre étude, nous oriente vers une forte suspicion d'atteinte d'inflammation chronique qui peut être surtout une pathologie hépatique (Knapp et guyot, 2016).

De plus, Selon (Russell et Roussel, 2007), lors de stimulation antigénique chronique, le ratio albumine/globulines diminue car l'augmentation des globulines est souvent accompagnée par une légère diminution de l'albumine. La concentration en albumine diminue davantage dans les maladies hépatiques chroniques, causant une diminution du ratio albumine/globulines plus important. Ainsi, (Smith, 2009) considère que lors d'affections

chroniques et sévères du foie, il y a généralement une augmentation des immunoglobulines (gammaglobulines : IgM, IgG, IgA) conjointement à une diminution de la concentration en albumine sérique. En se référant aux résultats obtenus précédemment dans cette étude (faible taux de cholestérol, augmentation du ratio AGNE/cholestérol et de BHB), nous pouvons conclure que ces vaches souffrent d'un déficit énergétique sévère qui a conduit à l'apparition d'une stéatose hépatique.

2.2.5. Le fibrinogène :

Chez les bovins, le fibrinogène est utilisé pour déterminer les maladies inflammatoires et traumatiques et se caractérise par une synthèse accrue lors d'une réponse d'origine infectieuse (Hirvonen et Pyörälä, 1998 ; Humblet et Godeau, 2005). Les marges normales du fibrinogène se situent entre 3-7g/l (Knapp et Guyot, 2016). Dans notre étude, comparativement aux vaches saines, la valeur estimée de fibrinogène tend à être significativement plus élevée en *postpartum* chez les vaches cétoniques [(VM) 9.98±5.64 vs 6.34±3.38 (VS), p=0.07]. De plus, le ratio protéines plasmatiques-fibrinogène a été significativement différent chez les deux groupes de vaches [(VM) 9.84±3.70 vs 15.88±8.25 (VS), p=0.04]

Le fibrinogène est une β -globuline plasmatique c'est un précurseur de la fibrine dans la cascade de la coagulation. Sa concentration devient très élevée seulement dans de rares cas, en particulier lors de processus inflammatoire généralisé sévère. Selon (Gros, 2015), une concentration d'AGNE élevée en *postpartum* (vaches en déficit énergétique en *postpartum*) est un facteur de risque pour le développement de maladies inflammatoires dont la mammite et la métrite. Ce même auteur indique qu'il existe un lien fort entre déficit énergétique et infection/inflammation.

CONCLUSION

La période de transition entre la gestation et la lactation chez la vache laitière est marquée par des changements métaboliques, hormonaux et immunitaires ayant un impact sur l'incidence des infections et des maladies métaboliques. Cette période spécifique se caractérise par un déficit énergétique, et entraîne une utilisation excessive des réserves corporelles de l'animal. Ainsi, la mise en évidence précoce d'un déficit énergétique exagéré représente un point clé en suivi d'élevage. Les objectifs de notre étude visaient à détecter précocement le déficit énergétique, d'évaluer l'influence de ce dernier sur la concentration de certains paramètres biochimiques et enfin de mettre en évidence des liens entre les indicateurs du déficit énergétique et les marqueurs d'inflammation.

Afin de répondre à nos objectifs, nous avons utilisé certains outils qui sont considérés comme des indicateurs de choix du métabolisme énergétique (note d'état corporel, concentration sérique en AGNE, concentration sanguine en BHB et la concentration de la glycémie). D'autres paramètres ont été utilisés : la concentration du cholestérol, et le ratio AGNE/cholestérol.

Ainsi, pour l'évaluation de l'état d'inflammation d'autres paramètres ont été explorés (les protéines totales, l'albumine, les globulines, le ratio albumine/globulines, le fibrinogène, et le ratio protéines plasmatiques/ fibrinogène).

A la lumière des résultats obtenus, l'utilisation des seuils d'AGNE de 0,3 mmol/L et 0,7 mmol/L en *prépartum* et *postpartum* respectivement, a permis de détecter un déficit énergétique chez presque la moitié des vaches de notre échantillon. La baisse importante de la NEC observée au pic de lactation, en relation avec la forte mobilisation des graisses corporelles, a confirmé la présence de ce déficit énergétique.

Par conséquent, ce déficit a été à l'origine d'une prévalence élevée de cétose subclinique en *postpartum* (BHB \geq 1,2mmol : 42,86%) et d'une atteinte de stéatose hépatique mise en évidence par l'élévation du ratio AGNE / cholestérol (> 0,2).

Il en ressort qu'en période de *postpartum*, les vaches en déficit énergétique ont une protéinémie sérique élevée, une hypo-albuminémie, une hyperglobulinémie, un ratio albumine/globulines très faible, une concentration de fibrinogène et un ratio protéines plasmatiques/fibrinogène élevés. Cette situation semble indiquée que les vaches de notre échantillon souffrent d'un syndrome inflammatoire qui peut être en relation avec les concentrations élevée des AGNE et BHB.

RECOMMENDATIONS

Ce travail avait pour but d'apporter des informations supplémentaires concernant l'utilisation de certains indicateurs du métabolisme énergétique et de l'inflammation dans un souci d'aider le praticien vétérinaire à améliorer ses programmes de suivi d'élevage.

De nouveaux outils (dosage des AGNE et BHB, NEC) sont donc utilisables pour permettre une anticipation des problèmes au sein des élevages.

- Avant vêlage, le dosage des AGNE avant vêlage semble être un bon outil pour prédire, certaines maladies (telle que la cétose). Des valeurs hautes en AGNE avant vêlage permettraient, de corriger les pratiques de gestion de la transition pour éviter le déficit énergétique des vaches. Il semble intéressant, pour un vétérinaire, d'intégrer ce dosage à ses suivis d'élevage.
- En début de lactation, la cétose subclinique, insidieuse, limite les performances des vaches. Une évaluation de la NEC toutes les semaines durant les quatre premières semaines de lactation et des mesures des AGNE et de corps cétonique sur les fraîches vêlées sont simples et efficaces pour la révéler et recaler sa conduite alimentaire précocement.

A l'instar des résultats obtenus au cours de cette étude, imposent la nécessité de la vulgarisation auprès des éleveurs pour les sensibiliser à reconnaître l'intérêt des dosages biochimiques. Cela aura pour conséquence de réduire les pertes occasionnées par les frais de traitement, les chutes de production et la mortalité. Pour cela, il est recommandé de :

- Sensibiliser les vétérinaires praticiens, sur la nécessité de l'outil paraclinique pour s'informer des désordres métaboliques avant que ne s'installe les signes cliniques.
- Encourager les vétérinaires pour recourir plus spontanément à l'apport du laboratoire dans l'établissement de leur diagnostic.

Enfin, la gestion des vaches tarées est une étape indispensable pour assurer un bon démarrage en lactation et limiter les maladies du *péripartum*. Il est primordial de préparer les vaches pendant cette phase afin que celles-ci ne subissent pas un déficit énergétique trop important. L'utilisation de marqueurs métaboliques dans les suivis d'élevage permettra :

- (1) d'objectiver un dysfonctionnement métabolique et de le corriger rapidement
- (2) de sensibiliser l'éleveur à l'importance de la gestion de la préparation au vêlage.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abbott, D.C., 2006.** Clinique Evaluation of a Faster, Smaller Sample Volume Blood B-ketone Test Strip. Abbott diabetes care inc., 2006 ART 10927 6/0.
- Adewuyi, A.A., Gruys, E., et Eerdenburg, F.J.C.M. van., 2005.** Non esterified fatty acids (NEFA) in dairy cattle. A review. *Veterinary Quarterly*. Vol. 27, n° 3, pp. 117-126.
- Alberghina, D., Giannetto, Cl., Vazzana, I., Ferrantelli, V., Piccione., 2011.** Reference Intervals for Total Protein Concentration, Serum Protein Fractions, and Albumin/Globulin Ratios in Clinically Healthy Dairy Cows. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 2011 ; 23 : 111-114.
- Ali-Amara, G., 2004.** Biochimie de la vache laitière : étude de la glycémie et de la calcémie en relation avec la concentration des corps cétoniques chez la vache jersiaise en production intensive ; Mémoire de diplôme d'études approfondies de production animales.
- Anderson, L., 1988.** Subclinical Ketosis in Dairy Cows. *Veterinary Clinics of North America*. Juillet 1988, Vol. 4, 2, pp. 233-251.
- Asl, A. N., Nazifi, S., Ghasrodashti, A. R., et Olyaei, A., 2011.** 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*, 100(1), 38-43.
- Aubadie-Ladrix, M., 2005.** Conduite à tenir lors de stéatose hépatique. *Point vétérinaire*, (261), 36-40.
- Aubadie-Ladrix, M., 2011.** La cétose de la vache laitière. *Bulletin des GTV*. 59, 79-88.
- Ballard, F. J., Hanson, R. W., and D. S. Kr., 1969.** Gluconeogenesis and lipogenesis in tissues from ruminant and non-ruminant animals. *Fed. Proc.* 28: 218-231.
- Baydar, E., et Dabak, M., 2014.** Serum iron as an indicator of acute inflammation in cattle. *Journal of Dairy Science*, janvier 2014, Vol. 97, n° 1, pp. 222-228.
- Bazin, S., 1989.** Grille de notation de l'état d'engraissement des vaches montbéliardes. ITEBRNED. 1989, Paris (France). 27 p
- Bell, A. W., 1995.** Regulation of organic nutrient metabolism during transition period from late pregnancy to early lactation. *J Anim. Sci* (73), pp 2804-2819.
- Bjerre-Harpøth, V., Friggens, N. C., Thorup, V. M., Larsen, T., Damgaard, B. M., Ingvarsen, K. L., & Moyes, K. M., 2012.** 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*, 95(5), 2362-2380.

Bobe, G., Young, J.W., Beitz, D.C., 2004. Invited review: pathology, etiology, prevention and treatment of fatty liver in dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 2004, Vol. 87, pp. 3105-3124.

Borghetti, P., Saleri, R., Mocchegiani, E., Corradi, A., et Martelli, P., 2009. Infection, immunity and the neuroendocrine response. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 15 août 2009, Vol. 130, n° 3-4, pp. 141-162.

Bradford, P., Van Metre, D., Pusterla, N., 2020. *Large Animal Internal Medicine*. Sixth Edit. In. Elsevier, City.

Brockman, R.P., 1979. Roles for insulin and glucagon in the development of ruminant ketosis a review. *Can. Vet. J.*, 1979, 20, 121-126.

Brugère-Picout, J., 1995. Baisse de la disponibilité en Glucose. *La Dépêche Vétérinaire* supplément technique. 24 au 30 Juin 1995, 46, pp. 9-21.

Buckley, F., O'sullivan, K., Mee, J.F., Evans, R.D. et Dillon, P., 2003. Relationships among milk yield, body condition, cow weight, and reproduction in spring-calved Holstein-Friesians. *Journal of Dairy Science*. 2003.Vol. 86, n 7, pp.2308-2319.

Buttchereit, N., Stamer E., Junge W., Thaller G., 2010. Evaluation of five lactation curve models fitted for fat: protein ratio of milk and daily energy balance. *Journal of Dairy Science*, 93(4), 1702-1712.

Carlson, G.P., 2009. Clinical chemistry tests. In : Smith BP. *Large animal medicine*. Mosby Elsevier, St Louis, 2009, 375-397.

Ceciliani, F., Ceron, J. J., Eckersall, P. D. et Sauerwein, H., 2012. Acute phase proteins in ruminants. *Journal of Proteomics*, 19 juillet 2012, Vol. 75, n° 14, pp. 4207-4231.

Chapinal, N., Carson, M., Duffield, T.F., Capel, M., Godden, S., Overton, M., Santos, J.E.P. et Leblanc, S.J., 2011. The association of serum metabolites with clinical disease during the transition period. *Journal of Dairy Science*. Vol. 94, n° 10, pp. 4897-4903.

Chladek, G., Machal, L., Hibner, A., Nowalkowski, P., 2004. The relationship between blood plasma cholesterol and milk production parameters in Czech Pied cows-preliminary results. *Electronic J. Polish Agric. Univ.*, 7, #02,

Chorfi, Y., Lanevski-Pietersma, A., Girard, V., Tremblay, A., 2004. Evaluation of variation in serum globulin concentrations in dairy cattle. *Veterinary Clinical Pathology*, 33(3), 122-127.

Cole, D.J., Roussel, A.J., and Whitney, M.S., 1997. Interpreting a bovine CBC : evaluating the leukon and acute-phase proteins. *Veterinary Medicine*, 1997, 92, 470-478.

Commun, L.G., Forgeat, E., Bertrand, L., Alves de oliveira., 2014. Transition des vaches laitières : de nouveaux outils pour mesurer le déficit énergétique, avant et après vêlage. Journées nationales GTV –Reims 2014, pages 881-890.

Contreras, G. A. et Sordillo, L. M., 2011. Lipid mobilization and inflammatory responses during the transition period of dairy cows. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. Vol. 34, n° 3, pp. 281-289

Corbière, F., 2002. Les marqueurs de l'inflammation chez les bovins : nature, physiopathologie et intérêt diagnostique. 2002. Thèse de doctorat.

Coulon, J., Remond, B., Doreau, M., Journet, M., 1985. Evolution de différents paramètres sanguins du métabolisme énergétique chez la vache laitière en début de lactation. In *Annales de Recherches Vétérinaires* (Vol. 16, No. 3, pp. 185-193).

Crocco, H., 2017. Les profils métaboliques en élevage bovin allaitant. Thèse : Doctorat vétérinaire. Faculté de médecine de Créteil, Ecole nationale vétérinaire d'Alfort, 190 pages.

Cuvelier, C., Cabaraux, J. F., Dufrasne, I., Istasse, L., & Hornick, J. L., 2005. Transport sanguin et métabolisme hépatique des acides gras chez le ruminant. In *Annales de Médecine Vétérinaire* (Vol. 149, pp. 117-131). ULg-Université de Liège.

De Vries, M.J., Van der beek S., Kaal-lansbergen L.M.T.E., Ouweltjes W., Wilmink J.B.M., 1999. Modeling of energy balance in early lactation and the effects of energy deficits in early lactation on first estrus postpartum in dairy cows. *Dairy Sci.*, 82, 1927-1934

Djokovic, R., Samanc, H., Jovanovic, M. Fratric, N., Doskovic, V., et Stanimirovic, Z., 2013. Relationship among blood indicators of hepatic function and lipid content in the liver during transitional period in high-yielding dairy cows. *Acta Scu. Vet* 41 (1128), 6p.

Dohoo, I.R., Martin S.W., 1984. Subclinical ketosis: prevalence and associations with production and disease. *Can J Comp Med.*, 1984 January, Volume 48(1), pages 1-5.

Domecq, J., Skidmore, AL., Lloyd, J.W., Kaneene, J.B., 1997. Relationship between body condition scores and conception at first artificial insemination in a large dairy herd of high yielding Holstein cows. *J. Dairy Sci.*, 1997, 80, 113-120.

Doreau, M., Flechet, J., Lefavre, R., Ollier, A., Sornet, C., 1983. Effects of food intake on variations in different plasma constituents at the end of gestation and the start of lactation.

Drackley, J.K., 2004. Physiological adaptations in transition dairy cows. Vol. 51, pp. 74-87.

- Duffield, T. F., 2000.** Subclinical ketosis in lactating Dairy cattle. Veterinary Clinic of North America food Animal Practice. Juillet 2000, Vol. 16, 2, pp. 231-253.
- Duffield, T., 2011.** Managing transition cow issues Western Dairy Management conference.
- Duffield, T.F. et al., 2009.** Impact of hyperketoneia in early lactation dairy cows. Journal of Dairy Science. 2009, Vol. 92, 2, pp. 231-253.
- Duffield, T.F., Kelton D.F., Leslie K.E., Lissemore K.D., Lumsden J.H., 1997.** Use of test day milk fat and milk protein to detect subclinical ketosis in dairy cattle in Ontario Can. Vet. J., 38, 713-718.
- Eaton, J.W., Brandt, P., Mahoney, J.R., 1982.** Haptoglobin: a natural bacteriostat. Science, 1982, 215, 691-693.
- Edmonson, A.J., Lean, I.J., Weaver, L.D., Farver, T., Webster, G., 1989.** A body condition scoring chart for holstein dairy cows. J Dairy Sci, 1989, 72: p. 68-78
- Engle, T.E., Engle, V., Fellner, J.W., 2001.** Spears Copper status, serum cholesterol and milk fatty acid profile in Holstein cows fed varying concentrations of copper J. Dairy Sci., 84 (2001), pp. 2308-2313.
- Engler, R., 1995.** Protéines de la phase aiguë de l'inflammation : Acute phase proteins. Compte Rendu de la Société de Biologie, 1995, 189, 563-578.
- Enjalbert, F., 2017.** Du nouveau dans la maîtrise de l'apport énergétique à la vache laitière en *péripartum*. Applications à la pratique de la préparation au vêlage de la Vache Laitière Haute Productrice. Journées nationales GTV-Reims 2017, pages 705-708
- Ennuyer, M., Laumonier G., 2013.** VADE-MECUM de gestion de l'élevage bovin laitier
- Ferré, D., et Aubadie-Ladrix, M., 2004.** La cétose et la stéatose de la vache laitière : importance économique, physiopathologie, conséquences pathologiques. Journée Nationales GTV., pp. 443-454.
- Forgeat, G., 2013.** Déficit énergétique avant et après vêlage chez la vache laitière : les liens entre les indicateurs Thèse de doctorat. Lyon, Université Claude Bernard, 166p.
- Fournet, D., 2012.** Conduite à tenir en cas d'acétonémie subclinique : Enquête auprès des vétérinaires de terrain. Thèse de doctorat. Paris, la faculté de médecine de Créteil, 122.

Friggens, N.C., Berg, P., Thellgaard, P., Korsgaard, I.R., Ingvarsten, K.L., Løvendahl, P., Jensen, J., 2007. Breed and parity effects on energy balance profiles through lactation : evidence of genetically driven body energy change J. Dairy Sci, 90, 5921-5305

Gerardo, F., Quiroz-Rocha, S.J., Leblanc, T.F., Duffield, D. W. K. E. et Leslie, R. M., 2009. Reference limits for biochemical and hematological analytes of dairy cow one week before and week after parturition. Can. Vet.J (50), pp 383-388.

Goff, J. P. et Horst, R. L., 1997. Physiological changes at parturition and their relationship to metabolic disorders. Journal of Dairy Science. Vol. 80, n° 7, pp. 1260-1268.

Gozlan, J., 2014. Impact de la restriction énergétique en début de lactation sur le métabolisme et les caractères de production chez la brebis de race lacaune (Doctoral dissertation). These pour obtenir le grade de Docteur Veterinaire TOU 3 – 4064.

Gros, L., 2015. Impact du bilan énergétique sur l'inflammation génitale chez la vache laitière (Doctoral dissertation). These pour obtenir le grade de Docteur Veterinaire TOU 3 – 4077.

Gross, J., Van dorland, H.A., Bruckmaier, R.M., Schwarz, F.J., 2011. Milk fatty acid profile related to energy balance in dairy cows Journal of Dairy Research, 78, 479-488.

Grummer, R.R., 1993. Etiology of lipid-related metabolic disorders in periparturient dairy cows. Journal of Dairy Science. Vol. 76, 12, pp. 3882-3896.

Guedon, J., Saumande, F., Dupron, C., Couquet, B., 1999. Desbals Serum cholesterol and triglycerides in postpartum beef cows and their relationship to the resumption of ovulation Theriogenology, 51 (7) (1999), pp. 1405-1415

Hagawane, S.D., Shinde, S.B., et Rajguri, D.N., 2009. Haematological and bloodbiochemical profile in lactating buffaloes in and buffaloes in and around Parbhanincity. Veterinary. Word Vol 2 No (12), 467-469.

Hansen, S.L., Hansen, J.W., Spears, K.E., Lloyd, C.S., 2014. Whisnant Growth, reproductive performance, and manganese status of heifers fed varying concentrations of manganese J. Anim. Sci., 84 (2014), pp. 3375-3380.

Heegaard, P., Godson, L., Toussaint, M.J.M., Tjornehoj, K., Larsen, L.E., Viuff, B., and Ronsholt, L., 2000. The acute phase response of haptoglobin and serum amyloid A(SAA) in

cattle undergoing experimental infection with bovine respiratory syncytial virus. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2000,77,151-159.

Herdt, T.H., 2000. Ruminant adaptation to negative energy balance: Influences on the etiology of ketosis and fatty liver. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 16(2), 215-230.

Herrick, Sarah, Blanc-brude, Olivier, Gray, Andrew et Laurent, Geoffrey., 1999. Fibrinogen. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, juillet 1999, Vol. 31, n° 7, pp. 741-746.

Heuer, C., Van Straalen, W.M., Schukken, Y.H., Dirkwager, A., Noordhuizen, J.P.T.M., 2000. Prediction of energy balance in a high yielding dairy herd in early lactation : model development and precision. *Livestock Production Science*, 65(1-2), 91-105.

Hirvonen, J., et Pyörälä, S., 1998. Acute-phase response in dairy cows with surgically-treated abdominal disorders. *The Veterinary Journal*, 1998, 155, 53-61

Horadagoda, N.U., Knox, K.M.G., Gibbs, H.A., Reid, S.W.J., Horadagoda, A., Edwards, S.E.R., and Eckersall, P.D., 1999. Acute phase protein in cattle : discrimination between acute and chronic inflammation. *Veterinary Record*, 1999, 144, 437-441

Humblet, M.F., et Godeau, J.M., 2005. L'haptoglobuline, marqueur protéique de l'inflammation aiguë dans l'espèce bovine. *Annales de Médecine Vétérinaire*. 2005, Vol. 149, pp. 20-33.

Hutchinson, I.A., Hutchinson, A.A., Hennessy, S.M., Waters, R.J., Dewhurst, A. C.O., Evans, P., Lonergan, S.T., 2012. Butler Effect of supplementation with different fat sources on the mechanisms involved in reproductive performance in lactating dairy cattle *Theriogenology*, 78 (2012), pp. 12-27

Imhasly, S., Naegeli, H., Baumann, S., Von bergem, M., Luch, A., Jungnickel, H., 2014. Metabolomic biomarkers correlating with hepatic lipidosis in dairy cows. *BMC Vet. Res.*, 10(1), 1-9.

Jain, S., Gautam, V., et Naseem, S., 2011. Acute-phase proteins: As diagnostic tool. *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences*, janvier 2011, Vol. 3, n° 1, pp. 118-127.

Kaneko, J.J., Harvey, J.W., Bruss, M.L., 1997. *Clinical biochemistry of domestic animals.* Academic press

Knapp, E., Guyot, H., 2016. Inflammation et alimentation : des pistes intéressantes. Journées Nationales des GTV : Nutrition et pratique vétérinaire, du ba-ba à l'innovation, 161-176.

Kouamo, J., LEYE, A., Ouedraogo, G.A., Sawadogo, G.J., Benard P., 2011. Influence des paramètres énergétiques, protéiques et minéraux sur la réussite de l'insémination artificielle bovine en élevage traditionnel dans la région de Thiès au Sénégal. Revue de Médecine vétérinaire, 162(8), 425.

Kronfeld, D.S., Donoghue, S., Copp, R.L., Stearns, F.M., Engle, R.H., 1982. Nutritional status of dairy cows indicated by analysis of blood. J. Dairy Sci., 1982, 65, 1925-1933

Labouche, Cl., 1964. La protéinémie chez la vache. Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux, 1964, Vol. 17, pp. 721-745.

Laumonier, G., 2006. L'utilisation des taux d'uree du lait de melange dans le suivi du rationnement des vaches laitieres. Bulletin des GTV n°36, 92-94

Lauriane, F., 2015. Le lactose, indicateur de déficit énergétique chez la vache laitière ? étude réalisée auprès de 162 élevages en rhône-alpes auvergne, These, Présentée à l'Université Claude-Bernard - Lyon I.

Lean, I. J., Bruss, M. L., Baldwin, R. L., & Troutt, H. F., 1991. Bovine ketosis: a review. I. Epidemiology and pathogenesis. Veterinary Bulletin (United Kingdom).

Lemaire, F., 2018. Phu rinnopari-Orientation de la réponse immune Thelper et rôle des peptides d'élastine au cours du remodelage des voies aériennes associé à la BPCO (Doctoral dissertation, Reims).

Leroy, J.L., Vanholder, T., Van knegsel, A.T., Garciaispierto, I., Bols, P.E., 2008. Nutrient prioritization in dairy cows early postpartum : mismatch between metabolism and fertility . Reprod Domest Anim. 2008 ;43 Suppl 2 :96-103.

Lewis, D.A., Dyer, D.W., 1995. Identification of an iron-regulated outer membrane protein of Neisseria meningitidis involved in the utilization of haemoglobin complexed with haptoglobin. J. Bacteriol., 1995, 177, 1293-1306.

Lucy, M.C., Verkerk, G.A., Whyte, B.E., Macdonald, K.A., Burton, L., Cursons, R.T., Roche, J.R., Holmes, C.W., 2009. Somatotropic axis components and nutrient partitioning in genetically diverse dairy cows managed under different feed allowances in a pasture system J. Dairy Sci., 92, 526-539.

Mcsherry, H., Horney, F.D., Degroot, J.J., 1970. Plasma fibrinogen levels in normal and sick cows. *Can. J Comp. Med* 1970 ; 34, 191-197.

Merrouche, F., Bettache, F., Merzouk, C., & Hireche, S. E., 2020. Activité anti-inflammatoire de la plante *Laurus nobilis* (Doctoral dissertation, Université de Jijel).

Molenaar, A. J., Harris, D. P., Rajan, G. H., Pearson, M. L., Callaghan, M. R., Sommer, L., ... & Stelwagen, K., 2009. The acute-phase protein serum amyloid A3 is expressed in the bovine mammary gland and plays a role in host defence. *Biomarkers*, 14(1), 26-37.

Molmy, M., 2018. Marqueurs d'inflammation chez les bovins : corrélation chez les mêmes animaux entre les données cliniques et l'examen post-mortem (Doctoral dissertation).

Moretti, P., Paltrinieri, S., Trevisi, E., Probo, M., Ferrari, A., Minuti, A., & Giordano, A., 2017. Reference intervals for hematological and biochemical parameters, acute phase proteins and markers of oxidation in Holstein dairy cows around 3 and 30 days after calving. *Research in veterinary science*, 114, 322-331.

Mostafavi, M., Seifi, H. A., Mohri, M., et Jamshidi, A. 2013. Optimal thresholds of metabolic indicators of hepatic lipidosis in dairy cows. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 164(12), 564-571.

Nakagawa, H., Yamamoto, O., Oikawa, S., Higuchi, H., Watanabe, A., & Katoh, N., 1997. Detection of serum haptoglobin by enzyme-linked immunosorbent assay in cows with fatty liver. *Research in Veterinary Science*, 62(2), 137-141.

Neveu, M.A., 2005. Intérêts de l'haptoglobine dans les bronchopneumonies chez les veaux : résultats d'un essai clinique avec inoculation des souches *P. multocida* et *M. haemolytica* (Doctoral dissertation, Thèse d'exercice vétérinaire, Ecole Nationale vétérinaire de Lyon).

Oetzel, G.R., 2004. Monitoring and testing dairy herds for metabolic disease. *Veterinary Clinic of North America- Food Animal Practice*. 2004, Vol. 20, 3, pp. 651-674.

Oetzel, G.R., 2008. Herd-based testing for metabolic and nutritional diseases. *Dairy herd problem investigation strategies : Transition cow troubleshooting*. Charlotte : s.n., 2008. pp 3-51.

Oliveira, L.A., Dubuc, J., 2014. Acétonémie/hypercétionémie/ cétose/complexe cétose-stéatose. Dans : Francoz D, Couture Y. *Manuel de médecine des bovins*. Med'com. 460-463.

Ospina, P. A., Nydam D. V., Stokol T., Overton T. R., 2010. Evaluation of nonesterified fatty acids and β -hydroxybutyrate in transition dairy cattle in the northeastern United States: Critical thresholds for prediction of clinical diseases. *Journal of Dairy Science*, Volume 93, Issue 2, February 2010c, Pages 546-554.

Ospina, P.A., Mcart, J.A., Overton, T.R., Stokol, T. et Nydam, D.V., 2013. Using Nonesterified Fatty Acids and β -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, n° 2, pp. 387-412.

Parker, B.N, Blowey, R.W., 1976. Investigations into the relationship of selected blood components to nutrition and fertility of the dairy cow under farm conditons. *Vet. Rec.*, 1976, 98, 394-404.

Pedron, O., Cheli, F., Senatore, E., Baroli, D., Rizzi, R., 1993. Effects of body condition score at calving on performance, some blood parameters, and milk fatty acid composition in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 1993, 76, 2528-2535.

Piccione, G., Caola, G., Giannetto, C., Grasso, F., Calanni Runzo, S., Zumbo, A et Pennisi, P., 2009. Selected biochemical serum parameters in ewes duing pregnancy, postparturition , lactation and dry period. *Animal Science Papers and Reports*. 27 (4), 321-330.

Raboisson, D., et Schelcher, F., 2009. Critères diagnostiques des maladies métaboliques. *Point vétérinaire*, 40, 109-115.

Radostits, O. M., Gay, C. C., Hinchcliff, K. W., & Constable, P. D., 2007. A text book of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats 10th Ed. *Book power*..

Radunz, A. E., Fluharty, F. L., Day, M. L., Zerby, H. N., & Loerch, S. C., 2010. Prepartum dietary energy source fed to beef cows: I. Effects on pre-and postpartum cow performance. *Journal of Animal Science*, 88(8), 2717-2728.

Reist, M., Erdin, D., Von Euw, D., Tschuemperlin, K., Leuenberger, H., Chilliard, Y., et Blum, J. W., 2002. Estimation of energy balance at the individual and herd level using blood and milk traits in high-yielding dairy cows. *Journal of dairy science*, 85(12), 3314-3327.

Rezamand, P., Hoagland, T.A., Moyes, K.M., Sllbart, L.K., Andrew, S.M., 2007. Energy status, lipid-soluble vitamins, and acute phase proteins in periparturient Holstein and Jersey dairy cows with or without subclinical mastitis *J. Dairy Sci.*, 90, 5097-5107

Richter, H., 1974. Haptoglobin bei Haussäugstieren. III. Mitteilung: Der Haptoglobingehalt im Blutplasma und -serum von Widerkäufern und Schweinen unter verschiedenen physiologischen Bedingungen. Arch. Exp. Vet. Med., 1974, 28, 505-519.

Roberts, T et al., 2012. Metabolic parameters in transition cows as indicators for early lactation culling risk. Journal of Dairy Science. 2012, Vol. 95, 6, pp. 3057-3063.

Roche, J.R., Dillon, P.G., Stockdale, C.R., Baumgard, L.H., et Vanbaale, M.J., 2004. Relationships among International Body Condition Scoring Systems. J. Dairy sci.87 :3076–3079.

Roche, J.R., Friggens, N.C., Kay, J.K., Fisher, M.W., Stafford, K.J. et Berry, D.P., 2009. Invited review: Body condition score and its association with dairy cow productivity, health, and welfare. Journal of Dairy Science. Vol. 92, n° 12, pp. 5769-5801.

Roland, L., Drillich, M., et Iwersen, M., 2014. Hematology as a diagnostic tool in bovine medicine. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation : Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc, septembre 2014, Vol. 26, n° 5, pp. 592-598.

Rollin, F., 2002. Field tests to detect dairy cow subclinical diseases: clinical examination and pathology. In *Veterinary Sciences Congress, Oeiras (Portugal), 10-12 Oct 2002*. SPCV.

Rousseau, C., 2013. Alimentation des vaches taries : les bases théoriques. Le Point Vétérinaire. 2013, Vol. 44, Numéro spécial : Prévention nutritionnelle en élevage bovin, pp. 86-92.

Rubel, C., Fernandez, G.C., Dran, G., Bompadre, M.B., Isturiz, M.A., Palermo, M.S., 2002. Fibrinogen promotes neutrophil activation and delays apoptosis. J. Immunol., 2001, 166, 2002- 2010.

Russel, K.E., et Roussel, A.J., 2007. Evaluation of the Ruminant Serum Chemistry Profile, Vet Clin. Food. Anim., 23(3), 403-426.

Salat, O., 2012. La stéatose hépatique. Affections hépatiques chez les bovins avec un focus sur les méthodes diagnostiques. s.l. : La Dépeche Technique, Vol. 130, pp. 3-7.

Sattler, N., 2003. Intérêts et limites des analyseurs en buiatrie. Le Point Vét. Num. Spé., 34: 32-35.

Scalia, D., Lacetera, N., Bernabucci, U., Demeyere, K., Duchateau, L. et Burvenich, C., 2006.

In vitro effects of nonesterified fatty acids on bovine neutrophils oxidative burst and viability. *Journal of dairy science*. Vol. 89, n° 1, pp. 147–154.

Schelcher, F., Cassard, H., Corbière, F., Foucras, G., Lacroux, C., Maillard, R., Meyer, G. et

Raboisson, D., 2014. Bio-marqueurs sanguins des syndromes inflammatoires bovins. In : Journées Nationales des GTV 2014, Reims, 2014. pp. 237-246.

Schelcher, F., Valarcher, J.F., Foucras, G., Espinasse, J., 1995. Profils métaboliques : intérêts et limites. *Point Vét.*, 1995, 27 (n° spécial "Maladies métaboliques des ruminants"), 25-31.

Schroedl, W., Fuerll, B., Reinhold, P., Krueger, M., and Schuett, C., 2001. A novel acute phase marker in cattle: lipopolysaccharide binding protein (LBP). *Journal of Endotoxin Research*, 2001, 7(1), 49-52

Schumann, R.R., and Zweigner, J., 1999. A novel acute-phase marker : lipopolysaccharide binding protein (LBP). *Clinical Chemistry for Laboratory Medicine*, 1999, 37(3), 271-4.

Segovia, C., 2015. The global threat of antimicrobial resistance: science for intervention Instituto de Salud Carlos III, ISCIII, Madrid, Spain

Seifi, H.A., Leblanc S.J., Leslie K.E., Duffield T.F., 2011. Metabolic predictors of post-partum disease and culling risk in dairy cattle. *The Veterinary Journal* 188 (2011) 216–22

Seppä-lassila, L., Orro, T., Lepage, J-P. et Soveri, T., 2013. Reference values for acute phase proteins in calves and its clinical application. *Veterinary Record*, 5 octobre 2013, Vol. 173, n° 13, pp. 319.1-319.

Sevinc, M., Basoglu, A et Guzulbekta, H., 2003. Lipid and lipoprotein levels in dairy cows with fatty liver. *Turk J Vet Anim Sci*, 27: 295-299.

Sigl, T., Gellrich, K., Meyer, H.H.D., Kaske, M., Wiedmann, S., 2013. Multiparous cow categorized by milk protein concentration and energy-corrected milk yield during early

Siliart B., 2014. Intérêt du laboratoire dans l'exploration des déséquilibres métaboliques chez la vache laitière *Bull. Group. Tech. Vet.*, 74, 41-48

Sitrin, Robert, G., Pan, Pauline, M., Srikanth, Sujata et Todd, Robert, F., 1998. Fibrinogen Activates NF-κB Transcription Factors in Mononuclear Phagocytes. *The Journal of Immunology*, 1 août 1998, Vol. 161, n° 3, pp. 1462-1470.

Smith, B.P., 2009. Large animal internal medicine. 4th ed. St. Louis. Collections of samples and interpretation of laboratory tests, pp 373-436.

Sordillo, L.M., et Raphael, W., 2013. Significance of Metabolic Stress, Lipid Mobilization, and Inflammation on Transition Cow Disorders. *Veterinary Clinics of North America : Food Animal Practice*. Vol. 29, n° 2, pp. 267-278.

Ster, C., Loisel, M.-C. et Lacasse, P., 2012. Effect of postcalving serum nonesterified fatty acids concentration on the functionality of bovine immune cells. *Journal of Dairy Science*. Vol. 95, n° 2, pp. 708-717.

Sutton, R.H., et Hobman, Brenda., 1975. The value of plasma fibrinogen estimations in cattle: A comparison with total leucocyte and neutrophil counts. *New Zealand Veterinary Journal*. Mars 1975. Vol. 23, n° 3, pp. 21-27.

Tehrani-sharif, M., Hadadi, M., Noughabi, H.H., Mohammadi, A., Rostami, F., Sharifi, H., 2012. Bovine subclinical ketosis in dairy herds in Nishaboor, Iran *Comp. Clin. Pathol.*, 21, 1637-1641.

Toni, F., Vincenti, L., Grigoletto, L., Ricci, A., & Schukken, Y. H., 2011. Early lactation ratio of fat and protein percentage in milk is associated with health, milk production, and survival. *Journal of dairy science*, 94(4), 1772-1783.

Trumel, Catherine, Gaillard, Elodie, Aumann, Marcel et Braun, Jean Pierre., 2018. La protéine sérique amyloïde A : un marqueur de la réaction inflammatoire aiguë chez le chat. *Le point vétérinaire*, mai 2018, Vol. 49, n° 385, pp. 34-36.

Vagneur, M., 1992. Biochimie de la vache laitière appliquée à la nutrition. *La dépêche vétérinaire*, supplément technique, 28.

Van Saun, R.J., 2000. Blood profiles as indicators of nutritional status. *Dairy Seminar*. Red Deer Alberta, Canada (pp. 1-6).

Veriele, M., 1994. Biochimie en production laitière : le rôle du vétérinaire praticien. *Bulletin des GTV- numéro spécial*. 1994, pp. 157-162.59, pp. 79-88.62, 2, pp. 137-142.

Wagener, F.A., Eggert, A., Boerman, O.C., Oyen, W.J., Verhofstad, A., Abraham, N.G., Adema, G., Van kooyk, Y., De witte, T., Figdor, C.G., 2001. Heme is a potent inducer of inflammation in mice and is counteracted by heme oxygenase. *Blood*, 2001, 98, 1802-1811.

Walsh, R. B., Walton, J. S., Kelton, D. F., Leblanc, S. J., Leslie, K. E., Duffield, T.F., 2007. The Effect of Subclinical Ketosis in Early Lactation on Reproductive Performance of Postpartum Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*, Volume 90, pages : 2788–2796.

Wathes, D. C., M. Fenwick, Z. Cheng, N. Bourne, S. Llewellyn, D. G. Morris, D. Kenny, J. Murphy, and R. Fitzpatrick. 2007. Influence of negative energy balance on cyclicity and fertility in the high producing dairy cow. *Theriogenology* 68 Suppl 1: S232-241.

Yang, F., Haile, D.J., Berger, F.G., Herbert, D.C., Van beveren, E., Ghio, A.J., 2003. Haptoglobin reduces lung injury associated with exposure to blood. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, 2003, 284, L402-4.

ANNEXES

Annexe 1 : Fiche d'élevage

INFORMATIONS GENERALES

Date de l'enquête : _____ Éleveur : _____ Niveau de production/exploitation : _____ litres / jour

Effectif : Plus de 10 têtes Moins de 10 têtes :

Race: BLM BLA (croisée)

Age moyen du cheptel : _____ (Ans) Primipares (nbr) : _____ Multipares (nbr) : _____ Génisses (nbr) : _____

Rang de lactation : En lactation (nbr) _____ Hors lactation (nbr) _____

Type de stabulation : libre semi entravée entravée Aire d'exercice : Présence

CONDUITE DU TROUPEAU :

Type d'alimentation : Fourrages verts Herbe de prairie Fourrages secs Paille Concentré pain rassie

Quantité : remorques / têtes bottes / têtes kg ou sac / têtes sac / têtes

Composition et quantité de ration de base distribuée : Fourrage : _____ kg

Composition et quantité de ration principale distribuée : Concentré : _____ kg

Même alimentation pour tous les animaux (vache en lactation, tarées et génisses pleines) : Non Oui

Même alimentation pour tous les stades de lactation : Non Oui

Annexe 2 : Fiche de suivi des vaches

Date de visite	N° vache	Race	Age	Rang	Date de Vêlage	Tarisement		Pic de lactation		
						NEC	AGNE	NEC	BHB	AGNE

Annexe 3 : Fiche de notation de la race Holstein




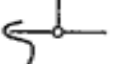


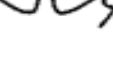

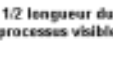


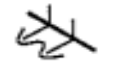
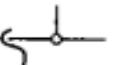


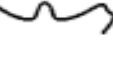



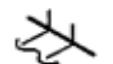

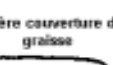
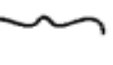



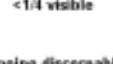



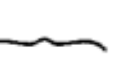



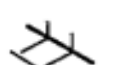
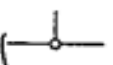


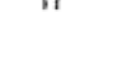



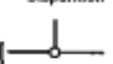


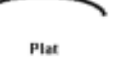



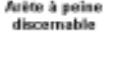




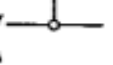


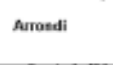

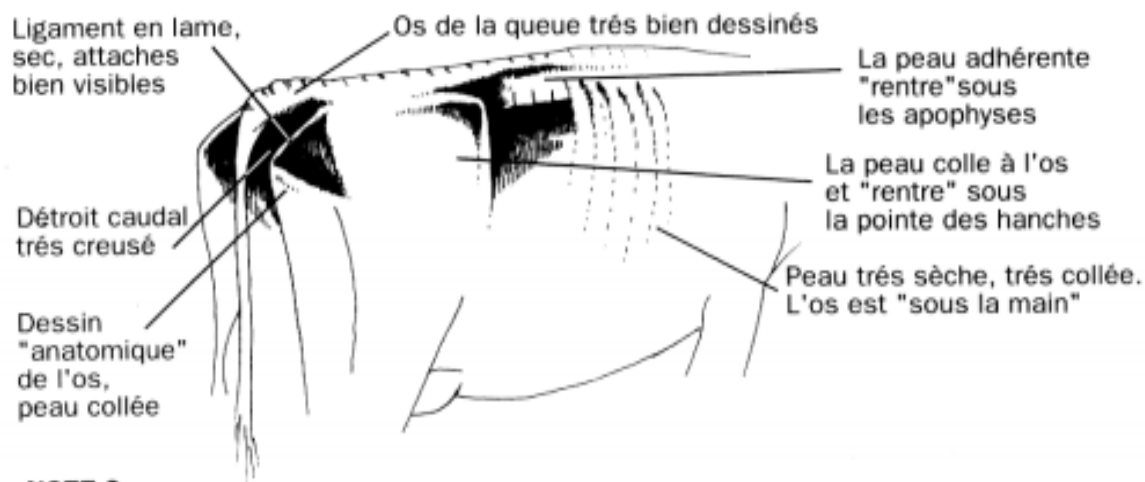
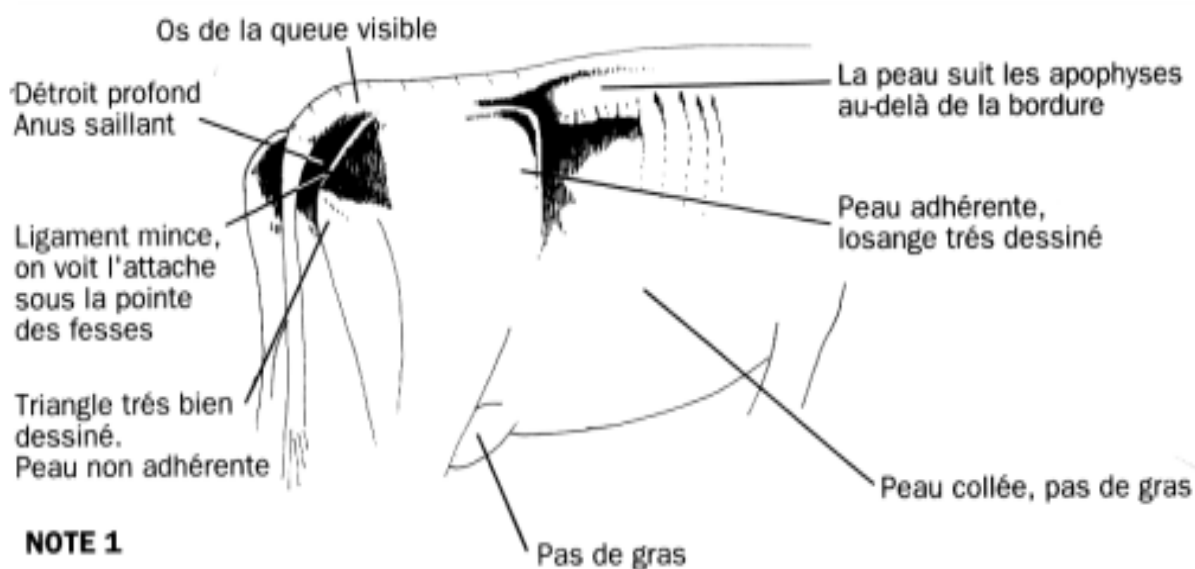
		Processus épineux	Angle entre processus transverses et épineux	Processus Transverses	Creux du flanc (attention au rumin)	Pointes de la hanche et des fesses	Entre pointes de la hanche et des fesses	Entre les pointes de la hanche	Base de la queue
Vache émaciée	1.00	Bien distinct, aspect de "dent" 	Profonde dépression 	Très saillants, >1/2 longueur visible 	Profond 	Extrêmement tranchante 	Sévèrement creusé 	Extrêmement creusé 	Relief osseux très saillant, cavité en "V" profonde sous la queue 
	1.50			1/2 longueur du processus visible 					
Vache maigre	2.00	Bien individualisés 	Dépression marquée 	Entre 1/2 et 1/3 visible 	Marqué 	Saillante 	Très creusé 		Relief osseux saillant, cavité en "U" sous la queue 
	2.50	tranchant, saillant 		Entre 1/3 et 1/4 visible 	Modéré 		Légère couverture de graisse 		Première trace de graisse 
Équilibrée	3.00		Aplatissement de la concavité 	<1/4 visible 	Léger 	Aplatie 	Creusé 	Dépression modérée 	Relief osseux aplati, cavité peu profonde 
	3.50	Peu visible, en partie aplati 		A peine discernable 			Légèrement couverte 	Légèrement creusé 	
Légèrement grasse	4.00	Plat, non discernable 	Pratiquement plat 	Arête arrondie 	Disparition 	Arrondi par la graisse 	Plat 	Plat 	Relief osseux arrondi par la graisse et légère dépression sous la queue 
	4.50			Arête à peine discernable 					
Vache grasse	5.00	Enfoui sous la graisse 	Arrondi (convexe) 	Enfoui sous la graisse 	Bombé 	Enfoui sous la graisse 	Arrondi (bombé) 	Arrondi 	Relief osseux enfoui sous la graisse, bourrelet graisseux sous la queue 

Figure 1 : Grille de notation de l'état corporel selon Edmonson *et al.* [27].

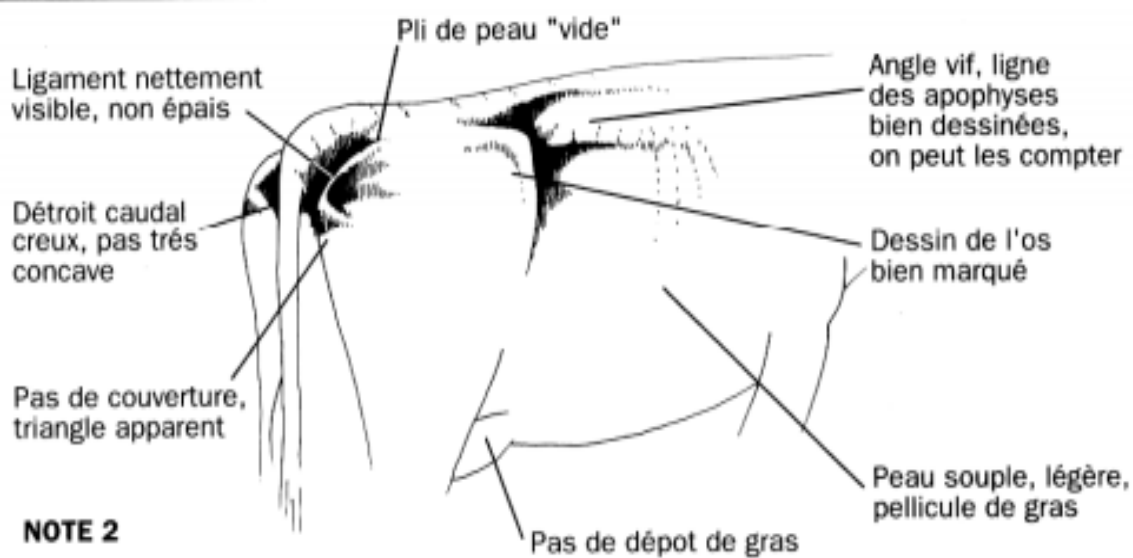
Annexe 4 : De notation de la race montbéliarde



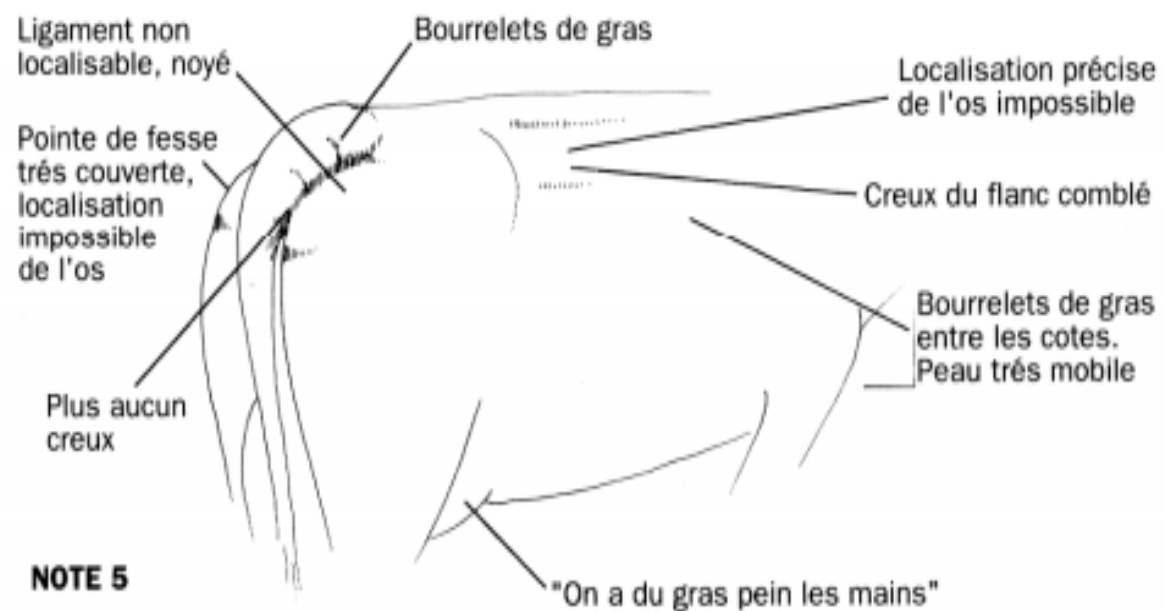
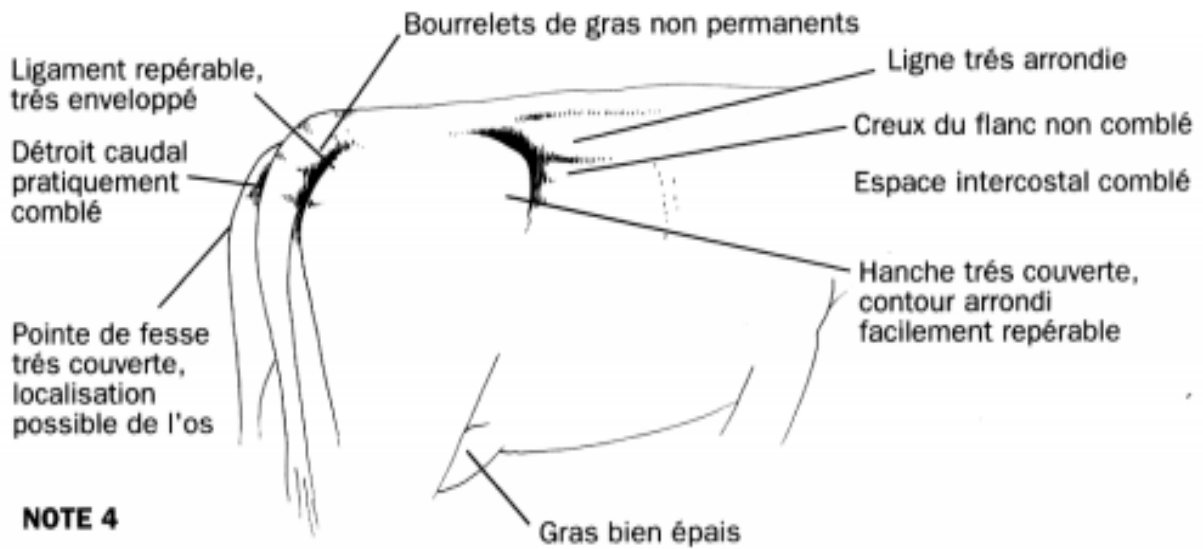
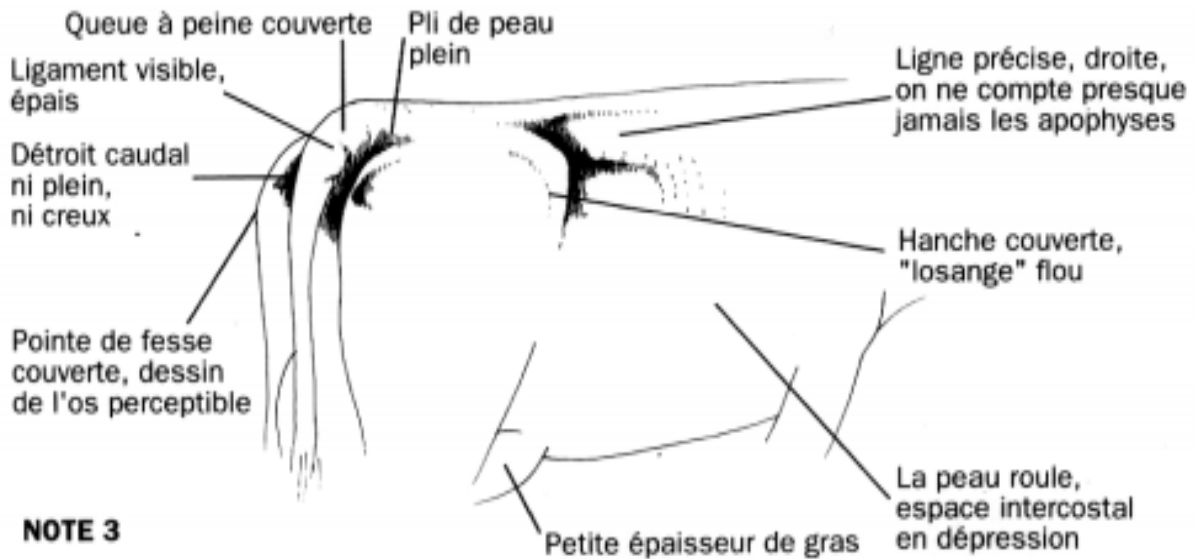
NOTE 0



NOTE 1



NOTE 2



Annexe 5 : Troubles de santé observés et/ou enregistrés chez les vaches

N°VACHE	TROUBLES	ÉVÈNEMENT	Date (J0=vêlage)
	Mammaires	Mammites cliniques	
	Métaboliques	Fièvre de lait	
		Cétose	
		Acidose	
		Autres pathologies	
	Locomoteurs	Boiteries infectieuses (panaris, mortellaro, etc.)	
		Fourbures	
	Digestifs	Diarrhées	
		Déplacements de caillette	
		Autres pathologies	
	Respiratoires	Bronchites vermineuses	
		Pneumopathies d'origine infectieuse	
		Autres pathologies	
	Reproduction	Dystocies (vêlage avec traction légère ou forte), césarienne	
		Non délivrance	
		Métrites	
	Autres pathologies		

Annexe 6 : Dosage des AGNE selon le mode du fabricant.



NEFA-HR(2)

ACS-ACOD Method

For the quantitative determination of Non-Esterified Fatty Acids (NEFA) in Serum

Read this instruction sheet thoroughly before use!



43-4-91795
1014 D3

Intended use

The Wako NEFA-HR(2) reagent is an *in vitro* enzymatic colorimetric method assay for the quantitative determination of non-esterified fatty acids (NEFA) in serum.

Summary and explanation of the test

Non-esterified fatty acid (NEFA) in serum binding albumin, is used as an important energy source of peripheral tissues. The amount of NEFA in serum depends on a balance between intake in liver and peripheral tissues, and the release from adipose tissues. Amount of NEFA decreases by physical exercise, increases by starvation, cold, fear or smoking. And then increase or decrease of NEFA is observed in diabetes, hepatic diseases or endocrine diseases.

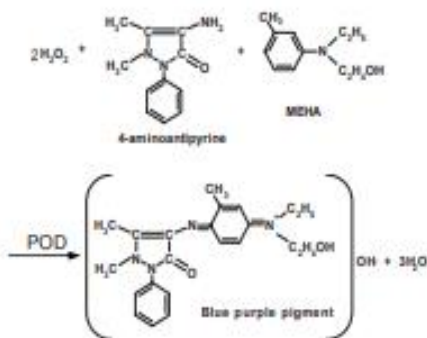
NEFA had been assayed by organic solvent extraction method, which was complicated to operate. Enzymatic method using Acyl-CoA oxidase (ACOD) has become widespread due to excellent specificity and concise procedure. NEFA-HR(2) is the reagent kit for NEFA assay based on enzymatic method using 3-Methyl-N-Ethyl-N-(β-Hydroxyethyl)-Aniline (MEHA) as a violet color agent. It gives reliable results without interference from ascorbic acid and bilirubin.

Principle of the method

Non-esterified fatty acid (NEFA) in sample is converted to Acyl-CoA, AMP and pyrophosphoric acid (PPi) by the action of Acyl-CoA synthetase (ACS), under coexistence with coenzyme A (CoA) and adenosine 5-triphosphate disodium salt (ATP). Obtained Acyl-CoA is oxidized and yields 2,3-trans-Enoyl-CoA and hydrogen peroxide by the action of Acyl-CoA oxidase (ACOD). In the presence of peroxidase (POD), the hydrogen peroxide formed yields a blue purple pigment by quantitative oxidation condensation with 3-Methyl-N-Ethyl-N-(β-Hydroxyethyl)-Aniline (MEHA) and 4-aminoantipyrine (4-AA).

Non-esterified fatty acids (NEFA) concentration is obtained by measuring absorbance of the blue purple color.

Reactions



Physical or chemical indications of instability

The presence of precipitates in the reagents or values of control sera outside the manufacturer's acceptable range may be an indication of reagent's instability.

Instruments

The reagent is designed to be used on commercially available automated analyzers. Refer to the operating manual for a description of instrument operation and specifications. A validation by the user in practice at the customer's site in the form of measurements of adequate control or patient sera in sufficient number is indispensable.

Reagents

Contents and storage conditions

R1 Set:	R1a: Color A	Store at 2 - 10°C
	R1: Solvent A	
R2 Set:	R2a: Color B	Store at 2 - 10°C
	R2: Solvent B	

Ingredients

R1 Set:		
R1a: Color A	(when reconstituted)	
	ACS	0.53 U/mL
	CoA	0.31 mmol/L
	ATP	4.3 mmol/L
	4-AA	1.5 mmol/L
	ACOD	2.6 U/mL
	Sodium azide	0.062%
	(Color A lyophilized)	(0.8%)
R1: Solvent A		
	Phosphate Buffer, pH 7.0	50 mmol/L
	Sodium azide	0.05%
R2 Set:		
R2a: Color B	(when reconstituted)	
	ACOD	12 U/mL
	POD	14 U/mL
R2: Solvent B		
	MEHA	2.4 mmol/L

Reagent preparation

- R1: Prepare R1 by mixing one bottle of Color A and Solvent A. After preparing the R1, store at 2 - 10°C and use within 1 month.
R2: Prepare R2 by mixing one bottle of Color B and Solvent B. After preparing the R2, store at 2 - 10°C and use within 1 month.

Specimen collection and preparation

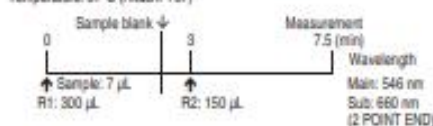
Serum can be used as specimen.

Assay samples immediately after collection, because the enzymes such as lipoprotein lipase, phospholipase etc. hydrolyze lipids and form fatty acids. Freeze sample, when a serum is stored. Stability: 2 days at 4°C.

In vivo heparin addition causes wrongly increased values. Because of stimulation of the lipoprotein lipase by heparin samples of patients under heparin treatment blood can be used for this determination only after appropriate pre-treatment.²

Standard procedure

Temperature: 37°C (HitachiP737)



Calibrator: Wako NEFA Standard (Available separately.)

Calculation of NEFA concentration

Calculate NEFA concentration from the calibration curve which was created from absorbance of calibrator.

$$\begin{aligned} \text{Conversion factor: mg/dL} &= \text{mmol/L} \times 28.2 \\ &(\text{calculated for oleic acid, MW} = 282) \\ \text{mmol/L (real)} &= \text{mEq/L} \times 0.025 \end{aligned}$$

Application to the various automatic analyzers

Input the parameters according to the instructions of instruments to perform the measurement. Instrument applications are available upon request.

Results

The final results are automatically calculated and printed in concentration. The results are given in mEq/L. Always use the same unit for the calibrator.

Expected values³

Men: 0.1 - 0.60 mmol/L (2.8 - 16.9 mg/dL)
Women: 0.1 - 0.45 mmol/L (2.8 - 12.7 mg/dL)

Since expected values are affected by age, sex, diet, geographical location and other factors, each laboratory should establish its own expected values for this procedure.

Manufactured by:

Wako Chemicals GmbH
Fuggerstraße 12, D-41468 Neuss
Telephon(e): +49-2131-311-0
Facsimile: +49-2131-311-100
URL: www.wako-chemicals.de

CB-DE

1

GB 1014 D3

Performance characteristics

- (1) **Accuracy**
When a control serum of known concentration is assayed, the assay value falls within the range of $\pm 15\%$ of the known concentration.
- (2) **Sensitivity**
 - a) When purified water is assayed, the absorbance is not more than 0.140.
 - b) When a standard of given concentration (oleic acid 1 mEq/L) is assayed, the absorbance is 0.100 - 0.380.
- (3) **Precision**
When a sample is assayed not less than 5 times in a run, CV of absorbance is not more than 1.5%.
- (4) **Measurement range**
0.01 - 4.00 mEq/L NEFA. (In the case of using the standard procedure)

Correlation

Specimen	Serum
Correlation coefficient	$r = 0.997$ (n = 50)
Regression equation	$y = 1.013x - 0.043$
y	Wako NEFA-HR(2) (ACS - ACOD method, mEq/L)
x	Wako NEFA C (ACS - ACOD method, mEq/L)

Interfering substances

- a) Bilirubin gives slightly negative effect on the assay.
- b) Ascorbic acid and hemolysis do not have significant effects on the assay.
- c) Citrate, oxalate, EDTA and sodium fluoride do not have significant influences on the assay when they are used in their usual amounts.

Warnings and precautions

- For *in vitro* diagnostic use only.
- The usage and application of this test is reserved for professional use only. Please refer to respective national and local regulations and legislation.
- Not to be used internally in humans or animals.
- Do not use the reagents described above for any purpose other than described herein. Performance cannot be guaranteed if the reagents are used in other procedures or for other purposes.
- Operate the instruments according to operator's manuals under appropriate conditions.
- Store the reagents under the specified conditions. Do not use reagents past the expiration date stated on each reagent container label.
- Do not use reagents which were frozen in error. Such reagents may give false results.
- After opening the reagents, it is recommended to use them immediately. When the opened reagents are stored, cap the bottles and keep them under the specified conditions.
- Do not use the containers and other materials in the package for any purposes other than those described herein.
- The vial is stoppered at reduced pressure. Slowly remove the stopper in order not to release the powder in the vial.
- When the reagent for NEFA is used at the same time as reagent for cholesterol and triglyceride, the cholesterol esterase and lipoprotein lipase in the reagent are adsorbed to cuvettes and may interfere the measured value of NEFA.
- Use NEFA Standard for calibration.
- This assay should not be used as the sole determinant for clinical diagnosis.
- If the reagents come in contact with the mouth, eyes or skin, wash off immediately with a large amount of water.
- Be careful not to cut yourself with the aluminum cap when remove it from the vial.
- When discarding the reagents, dispose of them according to local or national regulations. Solvent A contains 3 mg/L potassium ferrocyanide (1 mg/L as cyan).
- All the devices including reagents and reagent bottles contacted with specimen should be considered potentially infectious.
- Sodium azide may react with lead or copper plumbing to form explosive compounds. Even though the reagent contains minute quantity of sodium azide, drains should be flushed well with a large amount of water, when discarding the reagents.
- Color A (R1a) contains components classified as follows according to Regulation (EC) No 1272/2008

Hazard pictograms



Warning

Hazard-determining components of labeling:

4-Amino-2,3-dimethyl-1-phenyl-3-pyrazolin-5-one
Sodium azide

Hazard statements

- Harmful if swallowed or in contact with skin.
- Harmful to aquatic life with long lasting effects.

Precautionary statements

- Do not breathe dust/fume/gas/mist/vapours/spray.
- Use personal protective equipment as required.
- Avoid release to the environment.
- IF SWALLOWED: rinse mouth. Do NOT induce vomiting.
- IF ON SKIN (or hair): Remove/Take off immediately all contaminated clothing. Rinse skin with water/shower.
- Get medical advice/attention if you feel unwell.

Quality control

A quality control program is recommended for all clinical laboratories.

References

1. Rogiers V, Stability of the long chain non-esterified fatty acid pattern in plasma and blood during different storage conditions. *Clin Chim Acta*. 84, 40 - 54 (1978).
2. Krebs, M. et al, Prevention of *in Vitro* Lipolysis by Tetrahydrolipstatin. *Clin. Chem.* 46 (7), 950 - 954 (2000).
3. Aufenanger, J. and Katammann, R. *Klinisch-chemische Meßgröße: Freie Fettsäuren (FFS)*, S. 319 - 320 in Greiling / Grafner: *Lehrbuch der Klinischen Chemie und Pathobiochemie*, 3. edition, Schattauer (1995).

Ordering information

Code No.	Product	Package
434-91795	NEFA-HR(2) R1 Set	R1a: 4 x 50 mL R1: 4 x 50 mL
436-91995	NEFA-HR(2) R2 Set	R2a: 4 x 25 mL R2: 4 x 25 mL
270-77000	NEFA Standard	CAL: 2 x 10 mL

Manufactured by:

Wako Chemicals GmbH
Fuggerstraße 12, D-41468 Neuss
Telefon(e): +49-2131-311-0
Facsimile: +49-2131-311-100
URL: www.wako-chemicals.de