

## Table des matières

<b>Introduction.....</b>	<b>18</b>
<b><u>Partie I : synthèse bibliographique sur les maladies de production.....</u></b>	<b>19</b>
<b>I-1/ L’hypocalcémie.....</b>	<b>19</b>
<b>I-1-1/ Clinique et facteurs de risque.....</b>	<b>19</b>
<b>I-1-2/ Prévention.....</b>	<b>23</b>
<b>I-1-2-1/ La complémentation en calcium.....</b>	<b>23</b>
<b>I-1-2-2/ La vitamine D .....</b>	<b>24</b>
<b>I-1-2-3/ Le BACA et ses effets.....</b>	<b>24</b>
<b>I-1-2-4/ L’utilisation de sels anioniques.....</b>	<b>27</b>
<b>I-1-3/ Traitement.....</b>	<b>28</b>
<b>I-2/ L’acidose ruminale chronique ou subaiguë.....</b>	<b>29</b>
<b>I-2-1/ Définition .....</b>	<b>29</b>
<b>I-2-2 / Circonstances d’apparition et facteurs de risque.....</b>	<b>30</b>
<b>I-2-2 -1/ Populations à risque.....</b>	<b>30</b>
<b>I-2-2 -1-A/ La vache en transition alimentaire .....</b>	<b>30</b>
<b>I-2-2 -1-B/ La vache au pic de lactation.....</b>	<b>31</b>
<b>I-2-2 -2/ Les principaux facteurs de risque alimentaires .....</b>	<b>31</b>
<b>I-2-3/ Physiopathologie.....</b>	<b>32</b>
<b>I-2-3-1/ Mécanismes de l’acidose ruminale.....</b>	<b>32</b>
<b>I-2-3-2/ Conséquences pathologiques de l’ARSA et les signes cliniques.....</b>	<b>33</b>
<b>I-2-4/ Prévention de l’acidose ruminale chronique.....</b>	<b>37</b>
<b>I-2-4-1/ Le mode d’alimentation .....</b>	<b>38</b>
<b>I-2-4-2/ L’ajout de substances tampons dans la ration.....</b>	<b>38</b>
<b>I-2-4-3/ L’ajout de microorganismes directement dans la ration.....</b>	<b>39</b>
<b>I-2-4-4/ L’immunisation .....</b>	<b>39</b>
<b>I-3/ La cétose.....</b>	<b>40</b>
<b>I-3-1/ Définitions et physiopathologie.....</b>	<b>40</b>
<b>I-3-2/ La cétose de type I.....</b>	<b>42</b>
<b>I-3-2-1/ Circonstances d’apparition et signes cliniques .....</b>	<b>42</b>
<b>I-3-2-2/ Facteurs de risque .....</b>	<b>44</b>

I-3-2-3/ Pathogénie.....	47
I-3-3/ La cétose de type II, ou stéatose .....	49
I-3-3-1/ Circonstances d'apparition et signes cliniques .....	49
I-3-3-2/ Facteurs de risque de la stéatose .....	50
<i>Etat corporel au vêlage</i> .....	50
<i>Apport énergétique de la ration</i> .....	52
I-3-4/ Traitement de la cétose clinique.....	55
I-3-5/ Cétose et reproduction .....	55
I-3-6/ Relations des deux types de cétose avec les autres maladies péri partum.....	56
I-3-7/ Incidence économique de la cétose et de la stéatose .....	57
<b><u>Partie II : Diagnostic des maladies métaboliques dites de production chez la vache</u></b>	
<b><u>laitière à l'échelle de l'élevage</u></b> .....	60
II-1/ Analyses sur le troupeau en fin de tarissement et autour de la mise bas .....	60
II-1-1/ Etude de la prévalence de la stéatose.....	60
II-1-1-1/ Mesure de la concentration en AGNE dans le sang.....	60
II-1-1-2/ Evaluation de la glycémie .....	60
II-1-1-3/ Mesure de la concentration en BHB dans le sang .....	61
II-1-1-4/ La biopsie hépatique.....	62
II-1-2/ Etude du risque d'hypocalcémie dans un troupeau .....	63
II-1-2-1/ La mesure du pH urinaire .....	63
II-1-2-2/ La mesure de la calcémie .....	64
II-2/ Etude du troupeau en début de lactation .....	64
II-2-1/ Etude du risque d'ARSA dans un troupeau .....	64
II-2-1-1/ Observation et identification des signes d'appel dans le troupeau .....	64
II-2-1-1-A/ Boiteries et fourbure.....	64
II-2-1-1-B/ Observation des bouses .....	65
II-2-1-1-C/ Rumination .....	65
II-2-1-1-D/ Tympanisme ruminal .....	65
II-2-1-1-E/ Composition du lait .....	65
II-2-1-1-F/ Autres signes .....	66
II-2-1-2/ La mesure du pH ruminal .....	66
II-2-1-2-A/ La ruminocentèse .....	66
II-2-1-2-B/ Le prélèvement à l'aide d'une sonde ruminale .....	67

II-2-1-2-C/ Comparaison ruminocentèse - sonde ruminale .....	67
<b>II-2-1-3/ La flore ruminale .....</b>	<b>68</b>
<b>II-2-1-4/ Température du fluide ruminal .....</b>	<b>69</b>
<b>II-2-2/ Etude de la prévalence de la cétose subclinique.....</b>	<b>69</b>
<b>II-2-2-1/ Les différents tests disponibles au chevet de l'animal et leurs valeurs diagnostiques .....</b>	<b>69</b>
II-2-2-1-A/ Méthodes analytiques sur le sang .....	70
II-2-2-1-A-a/ Les différentes méthodes de mesure au laboratoire : chromatographie gazeuse, cinétique de réaction, spectrophotométrie et fluorométrie.....	70
II-2-2-1-A-b/ Mesure du BHB sanguin avec l'appareil portable Optium Xceed®.....	72
II-2-2-1-B/ Tests réalisables sur l'urine.....	75
II-2-2-1-C/ Tests réalisables sur le lait .....	77
II-2-2-1-D/ Relation entre les concentrations en corps cétoniques dans le lait et dans le sang.....	82
<b>II-3/ Choix des lots d'animaux, du nombre d'animaux et interprétation des résultats selon les critères choisis .....</b>	<b>83</b>
<b>II-3-1/ Interprétation des résultats des tests diagnostiques.....</b>	<b>83</b>
<b>II-3-2/ Tableau 17 : Récapitulatif des tests et indicateurs diagnostiques des maladies métaboliques de production .....</b>	<b>85</b>
<b><u>Partie III : Etude de la mesure du BHB dans le lait avec l'appareil portable Optium Xceed® .....</u></b>	<b><u>86</u></b>
<b>III-1/ But de l'expérience .....</b>	<b>86</b>
<b>III-2/ Matériel et méthodes .....</b>	<b>87</b>
<b>III-2-1/ Description des animaux.....</b>	<b>87</b>
<b>III-2-2/ Facteurs de risque de cétose et maladies post-partum .....</b>	<b>89</b>
<b>III-2-3/ Protocole expérimental .....</b>	<b>92</b>
II-2-3-1/ Prélèvements .....	92
II-2-3-2/ Réalisation de la mesure.....	93
II-2-3-3/ Evaluation de la répétabilité de la mesure .....	93
II-2-3-4/ Effet de la conservation.....	94
II-2-3-5/ Evaluation de l'exactitude de la mesure sur la matrice lait .....	95
II-2-3-6/ Corrélation entre les valeurs mesurées dans le sang et dans le lait.....	96

<b>III-3/ Résultats .....</b>	<b>97</b>
<b>III-3-1/ Evaluation de la répétabilité.....</b>	<b>97</b>
<b>III-3-2/ Evaluation de la conservation.....</b>	<b>97</b>
<b>III-3-3/ Exactitude de la mesure .....</b>	<b>99</b>
<b>III-3-4/ Estimation de la prévalence de la cétose subclinique dans le groupe d'étude.....</b>	<b>102</b>
<b>III-3-5/ Corrélation entre la mesure dans le sang et celle dans le lait.....</b>	<b>104</b>
<b>III-3-6/ Valeurs du test.....</b>	<b>104</b>
<b>III-3-7/ Mesures avec l'appareil Hitachi 717 et le kit Ranbut D-3-hydroxybutyrate .....</b>	<b>105</b>
<b>III-4/ Utilisation du test à l'échelle de l'élevage : exemple du cas particulier de l'élevage n°2.....</b>	<b>106</b>
<b>III-4-1/ Les états corporels des vaches de l'élevage 2 .....</b>	<b>108</b>
<b>III-4-2/ Analyse des paramètres de la reproduction.....</b>	<b>108</b>
<b>III-4-3/ Reproduction et déficit énergétique .....</b>	<b>108</b>
<b>III-5/ Discussion .....</b>	<b>111</b>
<b>III-5-1/ Recrutement des cas .....</b>	<b>111</b>
<b>III-5-2/ Utilisation de l'appareil Optium Xceed® pour le diagnostic de la cétose...</b>	<b>111</b>
<b>III-5-2-1/ Gamme des valeurs données par l'appareil .....</b>	<b>111</b>
<b>III-5-2-2/ Performances du test en fonction du seuil retenu.....</b>	<b>112</b>
<b>III-5-2-3/ Origine de la faible sensibilité du test .....</b>	<b>112</b>
<b>III-5-2-4/ Perspective d'un suivi individuel automatisé de la concentration en BHB dans le lait .....</b>	<b>114</b>
<b>III-5-2-5/ Application au cas particulier de l'élevage 2.....</b>	<b>116</b>
<b>CONCLUSION .....</b>	<b>117</b>
<b>AGRÈMENT ADMINISTRATIF.....</b>	<b>118</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>119</b>
<b>ANNEXE 1 : Exemple d'un élevage laitier avec des concentrations élevés de BHB (valeur de référence : 14,4 mg/dL soit 1400 µmol/l) : cas d'une stéatose, Données venant d'investigations faites à l'université de Wisconsin-Madison, 2004 .....</b>	<b>129</b>
<b>ANNEXE 2 : Exemple d'un élevage laitier avec des concentrations élevés de BHB (valeur de référence : 14,4 mg/dL soit 140 µmol/l) : cas d'une cétose de type I, Données venant d'investigations faites à l'université de Wisconsin-Madison, 2004 .....</b>	<b>130</b>

<b>ANNEXE 3 : Exemple de réactifs et d’emplacement dans l’analyseur dans la méthode de Hansen <i>et al.</i>.....</b>	<b>131</b>
<b>ANNEXE 4 : 4 substances testées : concentrations et pH des solutions.....</b>	<b>131</b>
<b>ANNEXE 5 : description des prélèvements .....</b>	<b>132</b>
<b>ANNEXE 6 : résultats des concentrations en BHB pour tous les échantillons.....</b>	<b>135</b>

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1 :</b> Physiologie du calcium .....	<b>20</b>
<b>Figure 2 :</b> Description des différentes régions du pied .....	<b>34</b>
<b>Figure 3 :</b> Mécanismes de la fourbure .....	<b>35</b>
<b>Figure 4 :</b> Schéma récapitulatif de l'acidose ruminale subaiguë et de ses conséquences .....	<b>37</b>
<b>Figure 5 :</b> Courbes énergétiques types pour la vache laitière en lactation.....	<b>40</b>
<b>Figure 6 :</b> Voies de la cétose et de la stéatose : les différentes utilisations des acides gras dans les cellules hépatiques, réactions cytoplasmiques et mitochondriales, Emery R.S <i>et al.</i> 1992.....	<b>42</b>
<b>Figure 7 :</b> Courbe théorique de la concentration en corps cétoniques chez des vaches avec une cétose clinique ou en cétose subclinique qui guérissent .....	<b>44</b>
<b>Figure 8 :</b> Mécanismes de la cétose.....	<b>48</b>
<b>Figure 9 :</b> Variation du poids des vaches dont la note d'état est normale comparées aux vaches note d'état supérieure à 4 dans les jours suivant la mise bas .....	<b>51</b>
<b>Figure 10 :</b> Variation de l'état corporel des vaches dont la note d'état est normale comparées aux vaches note d'état supérieure à 4 dans les jours suivant la mise bas .....	<b>51</b>
<b>Figure 11 :</b> Concentration en AGNE dans le sang autour de la mis bas de vaches alimentées à volonté (160% des besoins en énergie) comparées aux vaches chez lesquelles l'apport énergétique est restreint (80% des besoins en énergie) .....	<b>52</b>
<b>Figure 12 :</b> Relation entre la cétose et les autres maladies .....	<b>57</b>
<b>Figure 13:</b> Exemple d'interprétation des résultats : Interprétation de la mesure du pH ruminal sur 12 bovins d'un groupe de 100, avec un niveau d'alarme fixé à 25% (intervalle de confiance de 75%).....	<b>84</b>
<b>Figure 14 :</b> Distribution du rang de lactation .....	<b>88</b>
<b>Figure 15 :</b> Répartition des intervalles mise bas-prélèvement.....	<b>89</b>
<b>Figure 16 :</b> Représentation graphique de l'évolution de la note d'état corporel de toutes les vaches appartenant à l'élevage 2 .....	<b>91</b>
<b>Figure 17 :</b> Représentation graphique de l'évolution de la note d'état corporel des vaches de l'élevage 2 ayant été prélevées dans le cadre de cette étude.....	<b>91</b>
<b>Figure 18 :</b> Variation de la note d'état corporel entre la mise bas et le jour du prélèvement pour les vaches de l'élevage 2 ayant fait l'objet d'un prélèvement.....	<b>92</b>

<b>Figure 19 :</b> Dilution de sérum de la vache PH1 dans du lait négatif prélevé sur bronopol ; A. valeurs numériques, B. représentation graphique.....	<b>98</b>
<b>Figure 20 :</b> Dilution d'une solution de BHB dans du lait de vache négatif : A. résultats numériques, B. représentation graphique .....	<b>99</b>
<b>Figure 21 :</b> Dilution de la phase protéique du lait de la vache 07-1373 avec une phase protéique négative : A. valeurs numériques, B. représentation graphique.....	<b>100</b>
<b>Figure 22 :</b> Dilution du lait de la vache 1083 avec un lait négatif : représentation graphique.....	<b>101</b>
<b>Figure 23 :</b> Dilution de sérum de la vache 07-1266 dans du lait négatif ; A. valeurs numériques, B. représentation graphique .....	<b>102</b>
<b>Figure 24 :</b> Concentration en BHB dans le lait en fonction de la concentration en BHB dans le sérum, mesurées par l'appareil Optium Xceed® .....	<b>104</b>
<b>Figure 25 :</b> Evaluation du déficit énergétique, document du contrôle laitier de mai 2008.....	<b>109</b>
<b>Figure 26 :</b> Structure du modèle .....	<b>115</b>

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1</b> : Régulation du métabolisme du calcium et du phosphore .....	<b>21</b>
<b>Tableau 2</b> : Bilan : effets des sels anioniques sur les urines .....	<b>28</b>
<b>Tableau 3</b> : Erreurs dans la conduite de l'alimentation pouvant provoquer une acidose ruminale chronique et corrections à mettre en oeuvre.....	<b>38</b>
<b>Tableau 4</b> : Calcul des besoins en énergie nette lors de la lactation en Mcal/jour pour les vaches et les génisses 2 jours avant et 2 jours après le vêlage .....	<b>41</b>
<b>Tableau 5</b> : Incidence de la cétose subclinique sur la lactation avant l'apparition des signes cliniques.....	<b>58</b>
<b>Tableau 6</b> : Interprétation du test de flottaison sur une biopsie hépatique .....	<b>62</b>
<b>Tableau 7</b> : ruminocentèse / sonde oro-gastrique .....	<b>67</b>
<b>Tableau 8</b> : Interprétation du test de réduction au bleu de méthylène .....	<b>68</b>
<b>Tableau 9</b> : Effet du volume de l'échantillon : moyenne de biais (mmol/l ou %) vs volume de contrôle de 5µl.....	<b>74</b>
<b>Tableau 10</b> : Sensibilité et spécificité des tests urinaires comparés au BHB sanguin .....	<b>76</b>
<b>Tableau 11</b> : Sensibilité et spécificité des tests au nitroprussiate de soude sur le lait comparés au BHB sanguin .....	<b>78</b>
<b>Tableau 12</b> : Sensibilité et spécificité des tests Ketolac® ou Keto Test® sur le lait, comparés au BHB sanguin .....	<b>79</b>
<b>Tableau 13</b> : Sensibilité et spécificité des tests Ketolac® ou Keto Test® sur le lait calculées sur le pool d'animaux des différentes études (avec un gold standard de BHB sanguin de 1400 µmol/l).....	<b>80</b>
<b>Tableau 14</b> : Valeurs prédictives des tests Ketolac® ou Keto Test® sur le lait calculées sur le pool d'animaux des différentes études (avec un gold standard de BHB sanguin de 1400 µmol/l).....	<b>80</b>
<b>Tableau 15</b> : Probabilité d'un test positif pour les différents niveaux de résultats du Pink Test® et du Ketolac BHB® .....	<b>81</b>
<b>Tableau 16</b> : Coefficients de corrélation entre les concentrations en corps cétoniques dans le lait et le sang .....	<b>82</b>
<b>Tableau 17</b> : Récapitulatif des tests et indicateurs diagnostiques des maladies métaboliques de production .....	<b>85</b>



<b>Tableau 18</b> : Incidence des facteurs de risque de cétose et des différentes pathologies post-partum.....	<b>90</b>
<b>Tableau 19</b> : Test de répétabilité .....	<b>97</b>
<b>Tableau 20</b> : Valeurs du test avec l'appareil Optium Xceed®, en fonction du seuil de positivité fixé dans le sérum.....	<b>105</b>
<b>Tableau 21</b> : Prévalence vraie (PV) et prévalence apparente (PA) de la cétose subclinique dans les différents groupes.....	<b>106</b>
<b>Tableau 22</b> : Prévalence apparente observée avec le test Optium Xceed® sur le lait selon la prévalence vraie de la cétose subclinique du troupeau.....	<b>107</b>
<b>Tableau 23</b> : Analyse des paramètres de reproduction, service de reproduction, ENVT.....	<b>108</b>

## LISTE DES ABREVIATIONS

AG : acide gras  
AGNE : acide gras non estérifié  
AGV : acide gras volatils  
ARF : Additional Risk Factor  
ARSA : acidose ruminale subaiguë  
ASAT : Aspartate amino transférase  
BACA : bilan alimentaire cation-anion  
BHB : béta-hydroxybutyrate  
BHBDHase : béta-hydroxybutyrate déshydrogénase  
EC : état corporel  
FN : faux négatif  
FP : faux positif  
IBR : Indicator Based Risk  
LPS : lipopolysacharides  
MB : mise bas  
MS(I) : matière sèche (ingérée)  
NRC : National Research Council  
PA : Prévalence apparente  
PAL : phosphatases alcalines  
peNDF : fibres au détergent neutre physiquement efficaces  
PEPCK : phosphoenol-pyruvate carboxykinase  
PTH : parathormone  
PV : prévalence vraie  
VLDL: very low density lipoprotein  
VN : vrai négatif  
VP : vrai positif

## Introduction

Les maladies de production de la vache laitière sont des manifestations de l'incapacité de la vache à faire face aux demandes métaboliques associées à la production lactée, en particulier lorsque cette dernière augmente. Elles sont la cause de troubles de la santé animale et de pertes économiques élevées pour cette filière de production.

Ces maladies regroupent principalement l'hypocalcémie, l'hypomagnésémie et la cétose/stéatose. La rétention placentaire, les déplacements de la caillette et les boiteries (fourbure) sont aussi considérés comme des maladies de production, ayant des conséquences non négligeables sur la rentabilité de l'élevage bovin laitier [1].

Les maladies de production peuvent aussi être définies comme le résultat du déséquilibre entre apports alimentaires et les besoins en métabolites qui sont nécessaires à la production de lait. Ce sont essentiellement des déviations de l'utilisation des métabolites menant à des états pathologiques.

L'apparition de ces maladies est en partie liée à la sélection génétique. D'autres facteurs tels que la conduite d'élevage et l'immunité peuvent être à l'origine de telles maladies de production.

Néanmoins, l'hypothèse selon laquelle un niveau de production élevé conduit à une fréquence élevée de maladies de production est fausse. Cette fréquence dépend également de l'environnement et de la nutrition [1].

Malgré l'accroissement des connaissances dans le domaine des maladies de production chez la vache laitière, la fréquence de ce type de maladie semble augmenter dans les élevages bovins laitiers (Kelton *et al.*, 1998).

Le but de cette étude est de définir la place de la cétose parmi les principales maladies métaboliques dites de production chez la vache laitière et leur importance économique. Nous présenterons une synthèse des différentes méthodes de diagnostic utilisables à l'échelle de l'élevage en insistant plus particulièrement sur celles permettant le diagnostic de la cétose subclinique.

Dans la dernière partie, nous présenterons les résultats de la partie expérimentale de notre étude, dont le but était de déterminer si l'appareil portable Optium Xceed® (conçu à l'origine pour être utilisé sur le sang humain) permettait la mesure quantitative du bêta-hydroxybutyrate (BHB) dans le lait de vache. Cette méthode diagnostique de la cétose subclinique a été évaluée à l'échelle de l'élevage.

## **Partie I : synthèse bibliographique sur les maladies de production**

Cette partie présente les principales maladies métaboliques de la vache laitière, leur importance médicale (fréquence, sévérité, moyen de prévention et traitement) et leur importance économique.

L'hypocalcémie est aujourd'hui une maladie facile à diagnostiquer, sa fréquence diminue mais sa prévention reste complexe.

La fréquence de l'acidose ruminale chronique augmente, ses symptômes peu spécifiques font d'elle une maladie difficile à diagnostiquer précocement, pourtant elle reste facile à prévenir.

Enfin la cétose est une maladie de production dont la fréquence ne fait qu'accroître. Son diagnostic tout comme sa prévention restent difficiles.

Les maladies de production sont parfois liées entre elles.

Des maladies elles-mêmes peuvent favoriser l'apparition d'autres maladies. De plus, les moyens de prévention de certaines maladies peuvent devenir des facteurs d'apparition d'autres maladies.

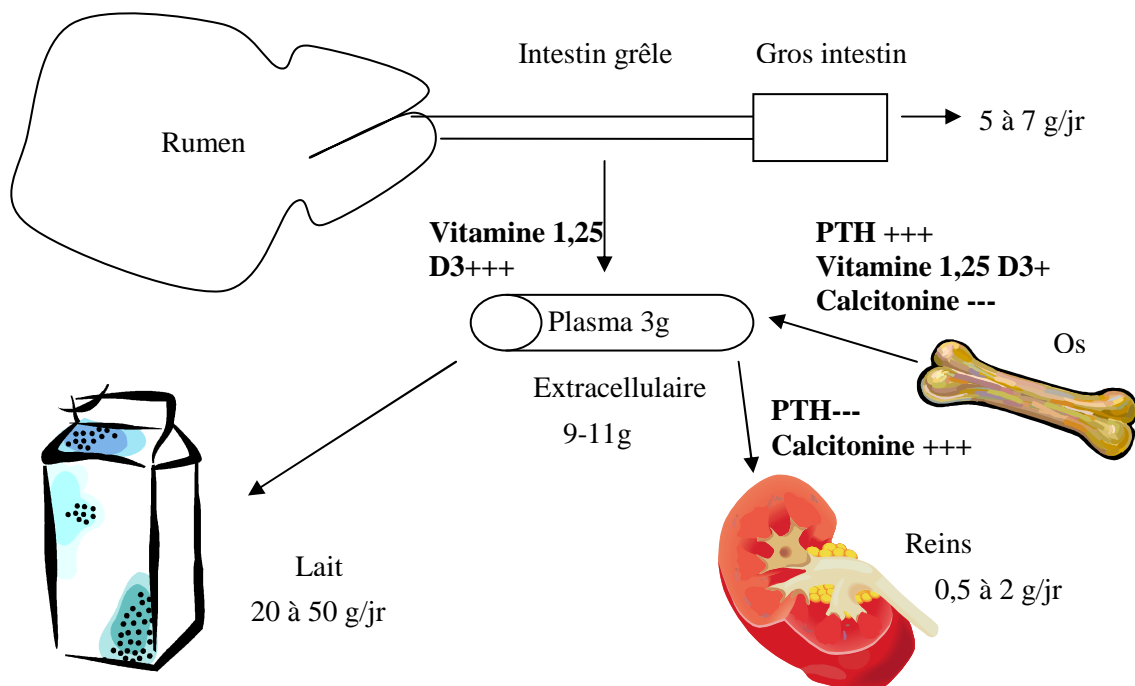
### **I-1/ L'hypocalcémie**

D'après l'étude de Goff [2] sur les maladies métaboliques dites de production chez la vache laitière aux USA, l'hypocalcémie est la seule dont l'incidence diminue, même si elle est encore de 5% environ [3].

#### **I-1-1/Clinique et facteurs de risque**

Il s'agit d'une maladie métabolique touchant les vaches à partir de 48 heures avant la mise bas jusqu' à 48-72 heures après le part. Elle est due à une forte mobilisation du calcium nécessaire à la synthèse lactée. La concentration en calcium est de 1,7 à 2,3 grammes par litre de colostrum (elle n'est que de 1,25 g/l de lait [4]). Il faut donc 40 g de calcium pour produire 20 litres de colostrum et la quantité de calcium disponible chez une vache est d'environ 14 g au total. Il existe donc un déficit si la vache ne mobilise pas efficacement les réserves osseuses.

L'homéostasie du calcium est assurée par de nombreuses hormones (cf. figure 1 et tableau 1) : la parathormone, la calcitonine, et la 1,25 vitamine D3. L'ensemble du système permet de faire face au déficit en calcium au moment de la mise bas grâce à la mobilisation du calcium osseux, l'augmentation de l'absorption intestinale et la diminution de l'excrétion urinaire de cet élément. Cependant, ce système se met en place progressivement, ce qui peut conduire à une hypocalcémie quelques jours avant ou après la mise bas selon la rapidité de la mobilisation osseuse.



**Figure 1 : Physiologie du calcium**

**Tableau 1 : Régulation du métabolisme du calcium et du phosphore [5]**

	<b>Déficit en calcium</b>	<b>Excès de calcium</b>
<b>Parathormone</b>	Stimulation de la sécrétion	Inhibition de la sécrétion
<b>Vitamine 1,25-D3</b>	Augmentation de PTH stimule la synthèse de vitamine 1,25-D3	Diminution de PTH inhibe la synthèse de vitamine 1,25-D3
<b>Calcitonine</b>	Faible concentration	Concentration augmentée
<b>Absorption intestinale de calcium</b>	Augmentée du fait de la stimulation par la vitamine 1,25-D3	Diminuée du fait de la faible concentration de vitamine 1,25-D3
<b>Libération de calcium et de phosphore osseux</b>	Stimulée par PTH et vitamine 1,25-D3	Inhibée par une faible concentration de PTH et vitamine 1,25-D3
<b>Excrétion rénale de calcium</b>	Diminuée du fait de la réabsorption tubulaire stimulée par la PTH et la vitamine 1,25-D3. L'hypocalcémie active des récepteurs dans l'anse de Henlé pour faciliter la réabsorption	Augmentée du fait de la réabsorption tubulaire diminuée par la faible concentration de PTH et de la vitamine 1,25-D3.
<b>Excrétion rénale de phosphore</b>	Très stimulée par la PTH, pour prévenir les effets de la résorption osseuse	Diminuée

Une étude réalisée en Finlande sur un groupe de 61124 vaches montre que 4 % des vaches ont eu une parésie vitulaire (5,3% des multipares) [6].

L'hypocalcémie correspond au plan physiopathologique à une diminution du calcium total dans le sérum en dessous de 2 mmol/l, ou du calcium ionisé en dessous de 1 mmol/l. Sur le plan clinique, elle correspond à une parésie plus ou moins marquée, l'expression clinique est variable en fonction de l'intensité de l'hypocalcémie :

1. vache faible, debout, avec des mouvements caractéristiques de la langue (la vache se lèche souvent le mufle), des trémulations musculaires, une production de lait plus faible que celle attendue, une bradycardie légère
2. vache en décubitus sternal, les oreilles froides, des trémulations musculaires, bradycardie possible
3. Etat comateux au cours duquel la vache est en décubitus latéral, en état de choc, avec perte de vigilance [7]

En 2001, Larsen a montré que les signes cliniques tels que l'apathie, la baisse d'appétit, la baisse de tonus musculaire, la baisse de la motilité ruminale et l'hypothermie sont bien corrélées à l'hypocalcémie [3].

Sur le plan biochimique, 25% des vaches ont une valeur de la calcémie en dessous de 1,85 mmol de calcium total/l dans les 24 heures qui suivent la mise bas sans symptôme. Le décubitus apparaît pour des valeurs inférieures à 1,5 mmol de calcium total/l [7]. Une hypophosphatémie est souvent observée [8], la magnésémie est variable, mais souvent diminuée en cas d'hypocalcémie sévère [3] et on peut observer une hyperglycémie modérée.

Les signes d'appel sont surtout le contexte (autour de la mise bas), et l'âge de la vache. En effet, il semble (d'après une étude réalisée sur 10 élevages en Allemagne) que le risque de fièvre de lait augmente avec le nombre de lactations et la production de lait [9,10] :

- probabilité d'apparition en 3<sup>ème</sup> lactation à 6000 kg de lait/an : 4%
- probabilité d'apparition en 3<sup>ème</sup> lactation à 12000 kg de lait/an : 13,2%
- probabilité d'apparition en 2<sup>ème</sup> lactation à 8000 kg de lait/an : 4,6%
- probabilité d'apparition en 6<sup>ème</sup> lactation à 8000 kg de lait/an : 13%

Il existe une forte corrélation entre le niveau de production de la lactation précédente et le risque d'hypocalcémie au début de la lactation. De même le risque d'hypocalcémie augmente avec le rang de lactation.

Le risque d'hypocalcémie est faiblement corrélé avec la production de lait de la lactation qui débute.

L'augmentation de la quantité de concentrés dans la ration favoriserait la fièvre vitulaire, à cause de l'augmentation de production provoquée par un apport d'énergie plus élevé [11].

D'après l'étude de Hardeng F. et Edget V.L [11], le risque de fièvre de lait augmente de 5% pour chaque kilogramme de lait supplémentaire.

L'augmentation du risque avec l'âge serait due à une diminution de l'absorption intestinale de calcium [12].

### **I-1-2/Prévention**

Les principaux facteurs de risque d'hypocalcémie sont la concentration de la ration en calcium et le bilan anion-cation de la ration (BACA) ; plusieurs équations du BACA ont été décrites. A l'origine, le BACA était utilisée pour le rationnement du poulet et son expression était :

$$\frac{(\text{Na}^+ + \text{K}^+ - \text{Cl}^-)}{100 \text{ g de matière sèche dans la ration}} \quad [13]$$

Mais l'ion  $\text{S}^{2-}$  ayant un rôle aussi important que l'ion  $\text{Cl}^-$  chez les bovins, l'équation de Block est plus adaptée :

$$\frac{(\text{Na}^+ + \text{K}^+ - \text{Cl}^- - \text{S}^{2-})}{100 \text{ g de matière sèche dans la ration}}$$

D'autres équations ont été élaborées (équation de Horst et équation de Goff). Cependant, l'étude de Lean I.J., DeGaris P.J., McNell D.M. et Block E. [12] montre que l'équation de Block est la plus appropriée pour modéliser le rôle de chacun des ions forts chez la vache.

#### **I-1-2-1/ La complémentation en calcium**

La complémentation en calcium avant la mise bas est un moyen controversé de diminuer le risque d'hypocalcémie à court terme. En effet, l'augmentation de la quantité de calcium dans la ration juste avant le vêlage augmente les risques d'apparition de la maladie.

Le risque de fièvre vitulaire diminue avec une concentration en calcium très faible dans la ration (inférieure à 20 g/jour/vache) avant le vêlage, d'après Oetzel [12, 14].

Il est décrit qu'une concentration plus forte en calcium (60 g/jour/vache) [12] serait aussi un moyen de prévention si elle est apportée pendant quelques jours seulement avant la mise bas.

L'apport en calcium peut être réalisé par une solution orale à forte concentration en calcium tel que le chlorure de calcium, qui est facilement : cette solution provoque la fermeture de la gouttière oesophagienne, et arrive dans la caillette sans dilution dans le rumen [15].



### **I-1-2-2/ La vitamine D**

La vitamine D ou l'un de ses dérivés peuvent être utilisés comme moyen de prévention de la fièvre de lait [8]. Le moment de l'administration est alors important pour être efficace. Il est nécessaire de renouveler l'injection au moment de la mise bas.

Cependant, les injections intramusculaires de métabolites de la vitamine D peuvent être toxiques. Après la première injection pré partum, les signes sont les suivants : perte d'appétit, voire anorexie sévère pendant plusieurs semaines avant la mort, yeux vitreux, une mamelle flasque, dyspnée expiratoire, haleine avec une odeur de « pomme verte ». Les signes de toxicité post-partum sont une diminution de production de lait, une diminution d'appétit, une consommation d'eau excessive [16].

### **I-1-2-3/ Le BACA et ses effets**

L'incidence de l'hypocalcémie est diminuée lorsque la valeur du BACA est plus faible. En effet, d'après l'ensemble des études, la relation entre le BACA et le risque d'hypocalcémie serait linéaire, ce qui n'est pas le cas de la relation entre la concentration en calcium dans la ration et le risque de fièvre de lait (cf. supra) [12]. La diminution du BACA est un moyen de palier au risque d'hypocalcémie à moyen terme.

Une ration avec un BACA de -170mEq/jour par kg de MS entraîne une diminution voire une disparition du risque de fièvre de lait. Une expérience sur 20 vaches laitières faite par Block E. en 1984 [8] a montré une incidence de 47,4 % de fièvre de lait chez des vaches nourries avec une ration à +450mEq/jour (l'étude ayant été faite 2 années consécutives). Les vaches nourries avec une ration à -170mEq/ jour n'ont présenté aucun signe de fièvre vitulaire. Les deux rations avaient des ratios Ca/P très proches (2,63 et 2,89).

En 1991, Oetzel montre que les teneurs en ions sulfate et sodium de la ration ont plus d'effets sur l'incidence de l'hypocalcémie que les ions calcium. La plus faible quantité d'ions sulfate augmente le risque de fièvre de lait de façon linéaire (ce qui confirme l'exactitude de la formule du BACA décrite précédemment) [12].

D'autres paramètres ont un effet sur l'incidence de fièvre de lait :

- une augmentation du magnésium dans la ration de 0,3 à 0,4% de la MS diminuerait le risque de 62% (le magnésium joue un rôle dans l'activité de la parathyroïde et dans la synthèse de la vitamine D)
- une augmentation du phosphore de 0,3 à 0,4% de la MS dans la ration augmenterait le risque de 18% ( $\text{PO}_4^-$  est régulé par la vitamine D3 et par les hormones parathyroïdiennes, et il existe un rétrocontrôle négatif des ions  $\text{PO}_4^-$  sur le calcium)
- une augmentation du potassium dans la ration augmenterait le risque par un effet négatif sur l'absorption du magnésium (cf. supra).

***Effets sur le métabolisme du calcium*** : la ration anionique a plusieurs effets sur le métabolisme calcique chez la vache. Elle entraîne une acidose métabolique légère (diminution de la concentration en ions bicarbonates dans le sang, diminution du pH urinaire, diminution de l'excès de bases urinaire [14] et du pH sanguin [17])

D'après les premières expériences de Block [8], la ration anionique acidogène entraînerait une diminution du pH intestinal, une meilleure solubilité du calcium dans le contenu intestinal et une augmentation de l'absorption passive du calcium. Mais ceci a lieu principalement lorsque la calcémie est inférieure à la concentration de calcium soluble dans le tractus digestif. Block observe aussi une augmentation de l'hydroxyproline dans le sang des vaches nourries avec une ration anionique ce qui indique une meilleure mobilisation du calcium osseux, même pour un ratio Ca/P de la ration élevé.

Par ailleurs, l'augmentation du calcium plasmatique chez une vache nourrie avec une ration plutôt anionique (par rapport au calcium plasmatique d'une vache nourrie avec une ration plutôt cationique) n'aurait lieu qu'après la mise bas. La diminution du pH urinaire est observée avant la mise bas. Il faut remarquer que l'augmentation du calcium plasmatique n'est pas significative chez les génisses ingérant une ration anionique en comparaison avec celles ingérant une ration cationique.

La diminution du pH sanguin serait aussi à l'origine de variations dans le métabolisme hépatorénal donc en partie dans le métabolisme de la 1,25 vitamine D3 (hydroxylée dans le rein).

Un BACA faible a un effet calciurique, ce qui expliquerait en partie qu'une ration avec un BACA faible sur le long terme ait l'effet inverse de celui recherché.

Pour une ration à -170mEq/kg de MS, on observe une augmentation de l'excrétion fractionnelle du calcium dans l'urine (Ca urinaire/Ca sanguin)/ (créatinine urinaire/ créatinine sanguine) [14]. Cette réponse, tout comme la diminution du pH sanguin, serait plus marquée chez les génisses. Ainsi, la régulation serait plus facile chez les primipares que chez les vaches multipares, puisque répondant mieux à l'ingestion d'une ration anionique dans le but de prévenir l'hypocalcémie [13]. Cette diminution de pH urinaire se poursuit environ une semaine après la mise bas, alors même que la ration distribuée est identique à celle d'une vache en lactation.

**Effet inverse :** la ration anionique, distribuée trop tôt dans la gestation peut avoir l'effet inverse de celui attendu, c'est à dire favoriser l'apparition d'une fièvre de lait. En effet, à moyen terme, un pH sanguin plus bas favoriserait la résorption osseuse pendant toute la durée de la distribution de la ration anionique. Cela conduit à un épuisement relatif des réserves calciques osseuses, et favoriserait au final l'apparition d'une hypocalcémie au moment de la mise bas. La distribution d'une ration avec un BACA négatif durant une trop longue période augmente le risque de fièvre de lait (une durée passant de 20 jours à 30 jours fait augmenter le risque de 37 à 42 % pour une même valeur du BACA) [12].

**Effet sur la quantité de la MSI :** certains auteurs n'observent aucune diminution de la MSI lorsqu'une ration anionique est distribuée [13, 14]. D'autres rapportent une diminution [8, 17], mais dans ces expériences, des sels anioniques sont utilisés pour créer un BACA faible et la diminution d'appétence serait probablement responsable de la diminution d'ingestion [14, 17]. En effet, les ions ammonium par exemple sont une source d'azote non protéique et leur toxicité est plus élevée. Ils seraient responsables de l'inappétence de ce type de ration.

La diminution de la quantité de MSI peut s'expliquer de 2 manières : la diminution de l'appétence des rations avec des sels anioniques et/ou l'apparition d'une acidose métabolique

qui conduit à une diminution de l'ingestion [14]. Cette diminution d'ingestion peut poser problème autour de la mise bas en entraînant un déficit énergétique qui est un facteur de risque de cétose.

**Effets sur les minéraux :** La ration avec un BACA faible, d'environ -3,41mEq/100g de MS aurait des effets sur la régulation des autres minéraux [13] :

- diminution de la concentration plasmatique du magnésium à la mise bas, puis augmentation une semaine plus tard
- concentration en magnésium urinaire diminuée
- absence d'influence sur la concentration de phosphate dans le sang, malgré sa libération normalement parallèle avec celle du calcium lors de la résorption osseuse
- augmentation des ions chlorures dans les urines seulement, positivement associés aux ions H<sup>+</sup>
- diminution de la durée de l'œdème grâce au BACA négatif (les ions sodium et potassium favorisant la formation d'œdème mammaire post-partum, et les ions chlorure inhibant l'activité de ces ions)

**Effets sur les fermentations ruminales :** plus on s'éloigne temporellement du repas, plus le pH diminue. Le ratio en ammoniac augmente dans le rumen, mais il y a peu d'effets sur les fermentations ruminales car il n'y a pas d'effet sur la quantité de propionate. Cependant, un BACA fortement négatif est un facteur de risque de l'acidose ruminale chronique.

#### **I-1-2-4/ L'utilisation de sels anioniques**

Une faible concentration en calcium dans la ration diminuerait le risque d'hypocalcémie. Un aliment comme l'ensilage de maïs a une concentration faible en calcium, mais en trop grande quantité dans une ration, il apporterait trop d'énergie à une vache en période sèche et entraînerait un risque plus important de cétose de type II autour de la mise bas.

L'ajout de sels anioniques semble alors nécessaire pour diminuer le BACA.

En général, les sels anioniques contiennent des quantités plus élevées d'ions  $\text{Cl}^-$  et en ions  $\text{S}^{2-}$  par rapport aux ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{K}^+$ . Il existe différents sels anioniques (chlorure de magnésium, sulfate de magnésium, chlorure de calcium, sulfate de calcium, chlorure d'ammonium, sulfate d'ammonium). L'expérience de Oetzel G.R *et al* [14] compare les effets de ces sels anioniques distribués individuellement sur 12 vaches Prim'Holsteins. Il attribue un sel à 2 vaches pendant une semaine, à une dose de 2Eq/vache/jour, soit une ration dont la balance acido-basique est -170mEq/kg de MS. Chaque sel entraîne l'augmentation de l'excrétion du calcium dans les urines, la diminution du pH urinaire et de l'excès de bases urinaire. Le chlorure d'ammonium permet une meilleure diminution du pH urinaire et de l'excès de bases. Le sulfate de calcium entraîne une meilleure augmentation de l'excrétion fractionnelle de calcium dans les urines (cf. tableau 2).

**Tableau 2 : Bilan : effets des sels anioniques sur les urines**

<b>Effets sur volume urinaire</b>	Chlorure d'ammonium l'augmente  Sulfate de magnésium le diminue car diminue la consommation d'eau
<b>Effets sur pH urinaire</b>	Diminue
<b>Effets sur excrétion urinaire de sodium</b>	Diminue
<b>Effets sur excrétion de calcium</b>	Augmente
<b>Effets sur excrétion de phosphate</b>	Diminue
<b>Effets sur excrétion de potassium</b>	Aucun

### **I-1-3/Traitement**

Le traitement de l'hypocalcémie est souvent réalisé sans analyse préalable sur des vaches avec des signes assez spécifiques. Une certaine rapidité d'intervention est nécessaire et toute mesure est impossible au chevet de l'animal. Avant le traitement, il conviendrait de faire un prélèvement de sang sur tube hépariné afin de mesurer la concentration des principaux ions calcium, magnésium, phosphore en cas d'échec du traitement de première intention [18].

Le traitement de la vache en hypocalcémie consiste en l'administration de calcium :

- par voie orale lors d'hypocalcémie de stade 1 : l'apport de calcium est alors modéré

- par voie systémique pour les autres stades plus avancés : l'action est très rapide. Le gluconate de calcium est à privilégier par rapport au chlorure de calcium qui est plus irritant.

Le volume à administrer est de 500 ml par voie intraveineuse, avec un débit lent à modéré.

Les administrations sous-cutanée et intramusculaire sont possibles, mais la distribution du calcium vers le secteur sanguin est plus lente, et donc l'effet moins rapide.

Dans la plupart des cas, ce traitement est très efficace si le diagnostic clinique est juste.

Dans le cas de vaches qui ne se relèvent pas, il est possible de pratiquer les analyses sur l'échantillon de sang prélevé avant le traitement de première intention. Une hypophosphatémie marquée, ou une hypomagnésémie marquée peuvent être la cause d'une non réussite du traitement.

**Conclusion partielle :** L'hypocalcémie sous sa forme clinique est facile à diagnostiquer et à traiter, et semble de mieux en mieux maîtrisée.

Par ailleurs, ses conséquences sur les risques d'apparition des autres maladies de production sont limitées. Par rapport au risque de cétose, lors d'hypocalcémie, la chute d'ingestion est observée sur une période très courte (1-2 jours) et reste faible si le traitement est fait rapidement. Ainsi, l'hypocalcémie n'aurait qu'un effet modéré sur le risque d'apparition de cétose.

## **I-2/ L'acidose ruminale chronique ou subaiguë**

### **I-2-1/ Définition**

L'acidose ruminale subaiguë (ARSA) correspond à une diminution du pH ruminal pendant plusieurs heures chaque jour. Elle se traduit par une modification de la distribution des populations microbiennes et des proportions anormales des produits de la fermentation ruminale. Ces modifications ne sont pas assez sévères pour que l'on observe des signes cliniques pathognomoniques, en début d'évolution [19].

La définition de l'acidose chronique est basée sur différents critères plus ou moins faciles à évaluer. Néanmoins selon Plaizier *et al.* [20], la définition est avant tout une

diminution du pH du liquide ruminal. La limite inférieure du pH est fixée à 5,5 lorsque le contenu ruminal est prélevé par ruminocentèse [19, 20, 21] (cf. infra).

Cette pathologie métabolique apparaît surtout sur des vaches laitières au moment de la transition alimentaire, avant, autour et juste après la mise bas, mais aussi au pic de lactation lorsque l'ingestion de concentrés, considérée seule ou globalement, est maximale. Aux USA, l'incidence a été évaluée à 19% [20], soit 20% [22] pour les vaches en début de lactation et 26% [20] pour les vaches en milieu de lactation. En Allemagne, l'incidence estimée est respectivement de 11% et 18% [21].

## **I-2-2 / Circonstances d'apparition et facteurs de risque**

### **I-2-2 -1/ Populations à risque**

#### **I-2-2 -1-A/ La vache en transition alimentaire**

Soixante pour cent des cas d'acidose ruminale subaiguë surviennent lors des deux premiers mois de lactation [23]. Ces vaches consomment des rations dont la densité énergétique est élevée ; elles sont donc soumises à une augmentation de la quantité de concentrés parfois élevée, et parfois de façon brutale (transition inférieure à 3 semaines) [23].

Par ailleurs, cette situation se produit également lorsque toutes les vaches reçoivent la même ration de mélange. Une baisse de la MSI autour de la mise bas entraîne une diminution de la consommation des fourrages par rapport aux concentrés. En outre l'estimation de la consommation de fourrages ne peut pas être exacte. La diminution de l'ingestion chez les vaches en fin de période sèche est simultanée à l'augmentation des concentrés ; ces circonstances sont très favorables à l'apparition de l'acidose ruminale.

Le développement des papilles ruminales n'est pas maximal tout comme la surface de muqueuse ruminale disponible, au début de la lactation : 21 jours sont nécessaires pour que la muqueuse ruminale soit optimale (Mackie, 1979).

De plus, à ce moment, une augmentation du nombre de bactéries et une modification des espèces prédominantes apparaissent. Les bactéries amylolytiques sont majoritaires car la proportion des substrats rapidement fermentescibles augmente [24].

Les AGV formés (acétate, et surtout butyrate et propionate) ont une concentration intra-ruminale plus élevée. Ils sont absorbés par la muqueuse ruminale (sous forme de BHB pour le butyrate). L'acide acétique va directement dans le sang. Le propionate est métabolisé dans le foie où il est transformé en glucose [21].

L'augmentation du pH du liquide ruminal n'est pas forcément due à une augmentation des AGV, il s'agit surtout d'un défaut d'absorption des AGV par la muqueuse ruminale.

La diminution du pH semble cependant nécessaire pour initier le processus d'adaptation de la muqueuse ruminale [24].

### **I-2-2 -1-B/ La vache au pic de lactation**

Ces vaches sont susceptibles de développer une acidose chronique lorsque la formulation de la ration n'est pas appropriée au moment où l'ingestion est maximale. Les rations à risque présentent des glucides facilement et rapidement fermentescibles en quantité élevée. Les autres facteurs sont le type et la taille des fibres, le mode et la fréquence de distribution, la MSI totale, le type de grain, la capacité tampon du fourrage, l'état corporel et la production laitière [19,24].

### **I-2-2-2/ Les principaux facteurs de risque alimentaires [23]**

La surconsommation de glucides rapidement et facilement fermentescibles de type blé, orge, triticales, tourteau de soja de même qu'une herbe riche en sucre favorisent la formation de propionate dans le rumen,.

Le manque d'éléments fibreux et/ou une fibrosité hétérogène dans la ration augmentent le risque d'ARSA. Ceci peut être dû à la constitution d'une ration mal équilibrée, mais aussi à un mauvais réglage de la vis de la mélangeuse, un hachage excessif ou irrégulier des ensilages.

Les ensilages trop acides sont des facteurs de risque d'acidose.

Le taux de la MS dans la ration doit être supérieur à 45%.

Concernant les vaches dans la période de transition alimentaire, un BACA trop faible pour prévenir le risque d'hypocalcémie peut entraîner une ARSA.

L'accès au foin étant moins évident pour les primipares ou pour les animaux dominés s'il y a peu de places à l'auge, ces animaux sont susceptibles de développer une ARSA.



## I-2-3/ Physiopathologie

### I-2-3-1/ Mécanismes de l'acidose ruminale

Le pH normal du fluide ruminal varie entre 6 et 6,8. Les différents tampons sont les bicarbonates de la salive, le phosphate et les sels d'AGV. Les bicarbonates sont les plus importants avec une concentration de 100-130 mmol/l dans la salive.

L'apport d'une grande quantité de composés organiques rapidement fermentescibles dans le rumen entraîne la production d'AGV. Les populations bactériennes (dont la croissance était au départ limitée par l'apport en énergie) ont une croissance accélérée car la compétition vis-à-vis des substrats qui leur sont nécessaires est moindre.

Il s'ensuit une augmentation de la quantité totale d'AGV dans le rumen, une diminution de leur absorption et une diminution du pH vers des valeurs comprises entre 6 et 5,6. La baisse du pH entraîne une diminution du nombre des bactéries cellulolytiques et des bactéries gram négatives et une croissance des coques. A ce stade, les protozoaires ont une croissance accélérée ce qui permet la transformation de l'amidon en butyrate. Lorsque le pH est compris entre 5 et 5,5, la population bactérienne majoritaire est *Streptococcus bovis* qui produit de l'acide lactique transformé par *Megashaera elselenii* en valérate. Les fermentations bactériennes sont plutôt orientées vers la synthèse de propionate [20,25, 26]. La population de protozoaires diminue alors fortement.

Si le pH atteint 5,2, *Megashaera elselenii* ne transforme plus le lactate et la population bactérienne est dominée par les bactéries du genre *Lactobacillus* qui ne synthétisent que du lactate [24].

Si l'augmentation de tous les AGV participe à la diminution du pH du liquide ruminal, l'étude de Enemark [25] montre que la concentration en propionate est responsable de 48% de cette variation.

Un facteur important est la fibrosité de la ration [20, 27, 28, 29]. Elle est évaluée avec la quantité de fibres au détergent neutre physiquement efficaces (peNDF) contenues dans la ration, c'est à dire le pourcentage de MS retenue par les mailles de 8-19 mm du séparateur de particules Benn State [20]. L'augmentation de la longueur des fibres dans une ration entraîne l'augmentation de la peNDF ingérée [28,30]. La peNDF est un meilleur indicateur de mastication et de la valeur acidogène de la ration que le pH ruminal, selon Plaizier *et al.* [20]. Le temps de rumination augmente la production quotidienne de salive ; à l'inverse cette

production diminue lorsque la vache rumine moins. Cependant, Yang [27] observe en 2007 que l'effet de la peNDF sur le temps de mastication et de rumination [30] n'existe que pour des rations dont la proportion de fourrages est de 60%. Une peNDF élevée associée à une proportion de fourrages égale à 35% n'entraîne pas une augmentation de la rumination.

Les auteurs concluent de cette étude que l'augmentation de la longueur des fibres fait augmenter le pH ruminal et le temps de mastication, mais seulement pour les rations dont le rapport fourrages/concentrés est supérieur au seuil précédemment indiqué. L'augmentation du pH ruminal est expliquée par une baisse de la digestibilité des matières organiques, des NDF et des fibres au détergent acide dans tout le tractus digestif lorsque la peNDF augmente [28]. Ainsi, la peNDF considérée seule, semble avoir assez peu d'influence sur le pH [30]. D'autre part, la peNDF de la ration n'est pas forcément représentative de la peNDF ingérée [30].

### **I-2-3-2/ Conséquences pathologiques de l'ARSA et signes cliniques**

Les difficultés pour diagnostiquer de l'ARSA sont liées en partie à la discrétion des signes cliniques, associée à une absence de test de laboratoire spécifique [24]. Néanmoins, plusieurs symptômes retrouvés à différentes reprises au sein d'un même élevage sont fortement suggestifs de l'existence de cette pathologie. Cependant, ces symptômes ne sont en aucun cas pathognomoniques.

#### *Diminution de la MSI*

L'appétit variable en fonction des repas est une indication de l'existence d'une acidose sublatente [21]. La diminution de la MSI serait plutôt due à l'augmentation de production de propionate dans le rumen, plutôt qu'à la nature et à la longueur des fibres de la ration. En effet, le remplacement du foin de luzerne par des granulés de luzerne dans une ration ne réduit pas la prise alimentaire [20]. La baisse d'appétit serait observée lorsque la chute de pH atteint 5,5 d'après Fulton, 1979.

#### *Boiteries et fourbure*

La fourbure est définie comme un ensemble de phénomènes physiopathologiques qui contribuent à provoquer une compression du pododerme entre l'os de la troisième phalange et la boîte cornée de l'onglon. Ce phénomène peut être localisé voire généralisé aux quatre membres [31].

Les signes peuvent être des lésions indolores du pied : une infiltration séro-hémorragique ou bleime, la maladie de la ligne blanche. L'abcès de la sole ou pododermatite septique, l'ulcère de la sole et l'abcès de la muraille sont douloureux à très douloureux et entraînent généralement des boiteries [31].

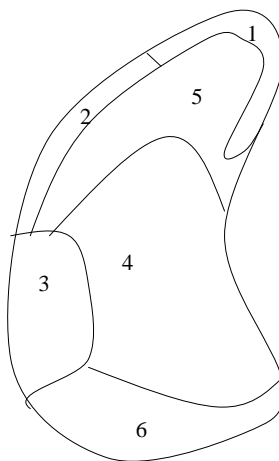
Dans les élevages où l'acidose chronique est présente, la fréquence des pododermatites aseptiques diffuses est souvent plus élevée que dans les autres élevages. On estime qu'un élevage avec des problèmes de pieds où la prévalence des affections podales est supérieure à 10% est fortement suspect de présenter des troubles du rationnement responsables d'acidose ruminale chronique. Dans certains élevages, chez les génisses, une morbidité de 50% est possible.

En 2004, Donovan *et al.* [32] ont évalué les effets de la ration sur la fourbure. Les lésions podales sont notées à l'aide d'un score à 45 jours avant la mise bas, puis 28 et 70 jours post partum. Le rationnement est différent sur la composition en énergie et en fibres pendant les 3 semaines qui précèdent le part et durant les 3 semaines post partum. Ils concluent que les vaches nourries avec une ration faible en énergie et riche en fibres avant la mise bas, puis une ration avec beaucoup d'énergie et peu de fibres ont des scores lésionnels plus élevés par rapport aux autres groupes. A l'inverse, Peterson montrait en 1979 que les vaches nourries avec de grandes quantités de concentrés en pré partum avaient plus de lésions podales.

Aucune corrélation n'est observée entre le pH ruminal et le nombre de lésions podales. Cependant il existe une faible corrélation entre le pH ruminal et les zones 3 et 4 du pied (cf. figure 2) qui sont souvent les zones les plus touchées [32].

**Figure 2 : Description des différentes régions du pied [32]**

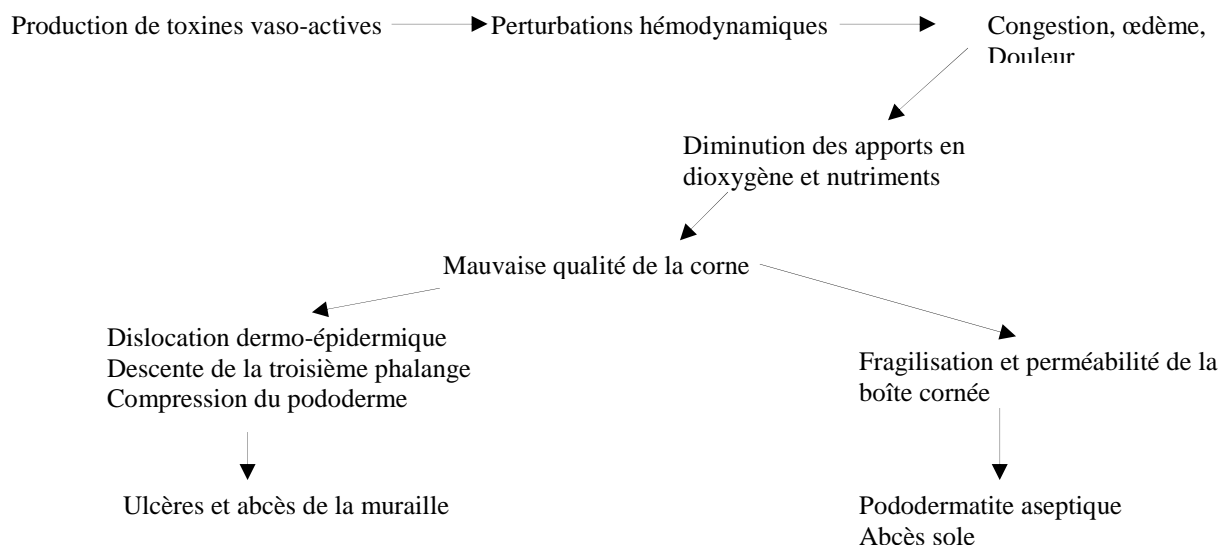
1. Ligne blanche
2. Ligne blanche abaxiale
3. jonction abaxiale avec la muraille du bulbe
4. Jonction sole-bulbe
5. Apex de la sole
6. Jonction sole-bulbe



Une anomalie de la sole reflète généralement une modification de l'alimentation ou un traumatisme qui est apparu 6 à 8 semaines avant l'observation de la lésion (Vermunt et Greenough, 1996). D'autres études montrent que le nombre de lésions de la sole est important entre 2 et 4 mois après la mise bas. La cause serait liée au changement de la ration pour des rations plus acidogènes [32].

Il faut remarquer que l'incidence de la fourbure dans un élevage est supérieure à l'incidence de boiteries, la fourbure étant une anomalie podale qui ne provoque pas toujours de douleur et donc de boiterie [24].

Les mécanismes de la fourbure ne sont pas encore bien connus. Une des principales hypothèses est celle émise par Nocek en 1997 : la diminution du pH ruminal permet la libération d'histamine et d'endotoxines dont les LPS d'origine bactérienne. Ces produits provoquent des dommages vasculaires (vasoconstriction, hypoxémie) sur la lamelle du pied, à l'origine d'une inflammation (pododermatite) [21]. En 2007, Gozho *et al.* [33] induisent une acidose subaiguë sur 4 vaches primipares fistulisées, avec du grain. Ils observent effectivement une augmentation de la concentration ruminale en LPS. Cependant, la concentration en LPS n'est pas détectable dans le sang périphérique entre l'induction et la fin de l'acidose, suggérant que ces produits microbiens ne peuvent pas atteindre le pododerme.



**Figure 3 : Mécanismes de la fourbure [31]**

#### *Abcès hépatiques et pulmonaires*

L'abaissement du pH ruminal provoque une parakératose (qui est un épaississement de la couche cornée de la muqueuse ruminale). L'aggravation entraîne une ruminite, et des

lésions de la muqueuse qui permettent l'entrée de bactéries telles que *Fusobacterium necrophorum*, et plus rarement *Arcanobacterium pyogenes*. Ces bactéries atteignent le foie où elles créent des abcès. Puis par diffusion à travers la paroi de la veine cave caudale, elles atteignent d'autres organes, notamment les poumons où se forment également des abcès. Une hémoptysie peut alors être observée [20, 21]. Plus rarement, des abcès sous-cutanés, ne pouvant pas être expliqués par une injection ou un traumatisme, peuvent apparaître à la suite de la localisation d'embolies [24].

#### *Tympanisme ruminal*

La viscosité du contenu ruminal augmente, provoquant un défaut d'élimination des gaz qui sont piégés dans le rumen. Il existe alors une baisse de la motilité ruminale.

Cette baisse de motricité, la diminution du pH, la production importante de mucopolysaccharides par les bactéries qui meurent provoquent un tympanisme ruminal qui peut être observé sur plusieurs vaches dans un élevage [21, 26].

#### *Acidose métabolique et immunité*

L'augmentation de la concentration en D-lactate est détectable lors d'acidose aiguë. Dans l'acidose ruminale chronique, cette modification est moins évidente. Les lactates pourraient cependant être à l'origine de l'inappétence observée au début de la lactation, lorsque l'ingestion diminue. Une acidose métabolique latente pourrait être à l'origine d'une diminution de la réponse à la sécrétion d'insuline (l'insuline est sans cesse sécrétée du fait d'un apport élevé de propionate) par rapport à la quantité de glucose. Il y a alors une augmentation de la sécrétion de cortisol qui possède un effet immunosuppresseur via une activité phagocytaire moindre, et une diminution de la vitesse de migration des neutrophiles [21].

Parallèlement à cette diminution des mécanismes de l'immunité cellulaire, les protéines de la phase aiguë telles que le sérum amyloïde A et l'haptoglobuline augmentent dans le sang périphérique, à la suite de l'augmentation de LPS selon Plaizier [20]. Gozho *et al.* n'avaient pas détecté le LPS dans le sang périphérique [33].

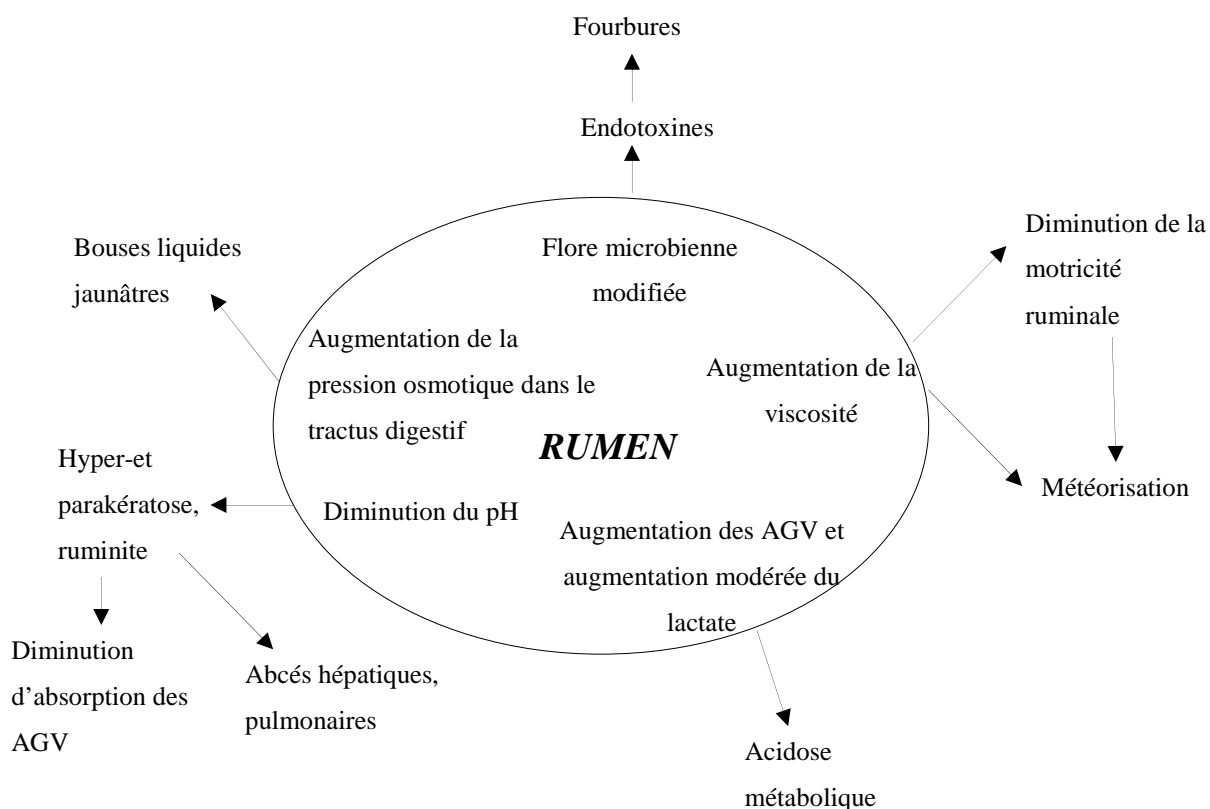
L'augmentation de la production d'histamine dans le rumen survient suite à l'augmentation d'ammoniac ruminal qui est un précurseur. L'histamine diffuse ensuite dans le sang [20]. Ces facteurs pourraient faciliter l'apparition d'une inflammation aiguë.

### *Influence sur la composition du lait*

Les effets de l'ARSA sur la composition du lait sont controversés. La concentration élevée en propionate entraîne une concentration élevée en insuline et une diminution de la lipolyse, d'où une baisse de la matière grasse exportée vers le lait. La diminution du TB serait corrélée ( $r=0,96$ ) à la réduction du rapport acétate/propionate [20, 25, 33]. En effet ce rapport expliquerait 32% de la variation du pourcentage de matière grasse dans le lait.

Le pourcentage de matière grasse du lait ne semble pas directement corrélé au pH ruminal selon Enemark *et al.* [25]. Griinari *et al.* en 1998, montrent que la diminution de pH entraîne la formation plus importante d'acide trans-octadécénoïque qui n'est pas utilisé pour la synthèse de la matière grasse du lait [20].

Cette réduction du TB, parallèlement à une augmentation du TP est observée lors d'acidose subaiguë expérimentale. Elle est variable selon la durée de l'acidose [20]. Le rapport TB/TP est ainsi significativement plus faible.



**Figure 4 :** Schéma récapitulatif de l'acidose ruminale subaiguë et de ses conséquences [26]

## I-2-4/ Prévention de l'acidose ruminale chronique

### I-2-4-1/ Le mode d'alimentation

Il s'agit de permettre l'adaptation de la microflore bactérienne et de la muqueuse ruminale en période péri partum. L'augmentation de peNDF est un moyen pour augmenter le temps de rumination et la production de salive. Les autres moyens de prévention sont présentés dans le tableau suivant.

**Tableau 3 :** Erreurs dans la conduite de l'alimentation pouvant provoquer une acidose ruminale chronique et corrections à mettre en oeuvre [106]

<i>Défauts</i>	<i>Correction</i>	<i>Effets de la correction</i>
Transition alimentaire inférieure à 4 semaines	Permettre une adaptation de 4-6 semaines	Développement optimal de la muqueuse et croissance de la flore ruminale [24, 32]
Transition trop intensive	Augmentation de 250g de concentrés/jour maximum	Le milieu ruminal absorbe et neutralise les AGV et le lactate [34]
Seulement une ration pour les tarées et une ration pour les vaches en lactation	Différentes rations pour les vaches selon leur stade de lactation	Energie de la ration correspond aux capacités de la muqueuse ruminale [24]
Erreurs dans la distribution de la nourriture (variation de matière sèche, d'énergie, et de fibrosité)	Constater et contrôler les sources d'erreurs	Stabilité du milieu ruminal, Stone, 2004 ; Shaver, 2005, [34]
Grains trop finement broyés	Analyses des particules des grains	Fermentation moins rapide des grains dans le rumen [34]
BACA faible	Addition de tampon ou augmenter les fibres pour stimuler la mastication et la rumination	Augmentation de l'effet tampon directement ou par l'intermédiaire de la production de salive [34]
Plus de 15% de longues particules fibreuses dans la ration	Analyse de la fibrosité avec des tamis superposés	[34]
Ration totale de mélange trop mixée (diminution de taille des particules)	Contrôler temps de mélange et les pales de la mélangeuse	Ration homogène pour un environnement ruminal stable, Mutsvangwa, 2003

### I-2-4-2/ L'ajout de substances tampons dans la ration

Une seule substance tampon est généralement utilisée ; le bicarbonate de sodium est le plus utilisé et le plus efficace. La combinaison de plusieurs substances tampons est possible. Il existe une influence positive de cette pratique sur la production et le pourcentage de matière grasse du lait et l'ingestion de matière sèche, selon Hutjens,

Selon les auteurs, une utilisation de substances tampons est surtout justifiée lorsque les troubles liés à l'acidose ruminale chronique sont sévères. Leur utilisation en routine pour compenser un défaut de rationnement chez la vache laitière n'est pas recommandée [21].

#### **I-2-4-3/ L'ajout de microorganismes directement dans la ration**

Les recherches sur les probiotiques et l'ajout de levures, mortes ou vivantes, dans la ration ont montré des effets variables sur l'incidence de l'acidose ruminale subaiguë. Cependant, en 2006, Nocek et al. [35] montrent qu'une réduction de la durée où le pH ruminal est anormalement acide est obtenue grâce à l'ajout de bactéries telles que *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus plantarum*, *Saccharomyces cerevisiae* à une concentration de 105 ufc/mL. La réponse la plus intéressante est observée par Wallace et Newbold en 1993 avec l'utilisation de *Saccharomyces cerevisiae* qui favorise la croissance de bactéries cellulolytiques dans le rumen [35].

A l'inverse, d'autres études, réalisées chez des taurillons à l'engrais, montrent une inefficacité de l'ajout de microorganismes dans l'alimentation [35].

L'intérêt de ces microorganismes n'est pas clairement démontré, leur incorporation dans la ration n'est pas justifiée [21].

#### **I-2-4-4/ L'immunisation**

Un vaccin vivant immunisant contre *Streptococcus bovis* a été étudié en Australie chez la brebis et chez la vache et diminuerait le risque d'acidose lactique. La possibilité de vacciner les vaches contre l'ARSA a été émise mais les recherches n'ont pas encore validé cette hypothèse (Shu et al. 1999 et 2000) [21].

**Conclusion partielle :** L'ARSA n'est donc pas un facteur de risque de cétose, mais sa prévention qui consiste en la limitation de l'apport en propionate dans la ration autour de la mise bas et au pic de lactation peut le devenir. Ce sont des moments où la vache a un besoin accru en énergie. Il est nécessaire de trouver un équilibre dans la prévention de l'ARSA pour limiter le risque d'apparition de cétose.

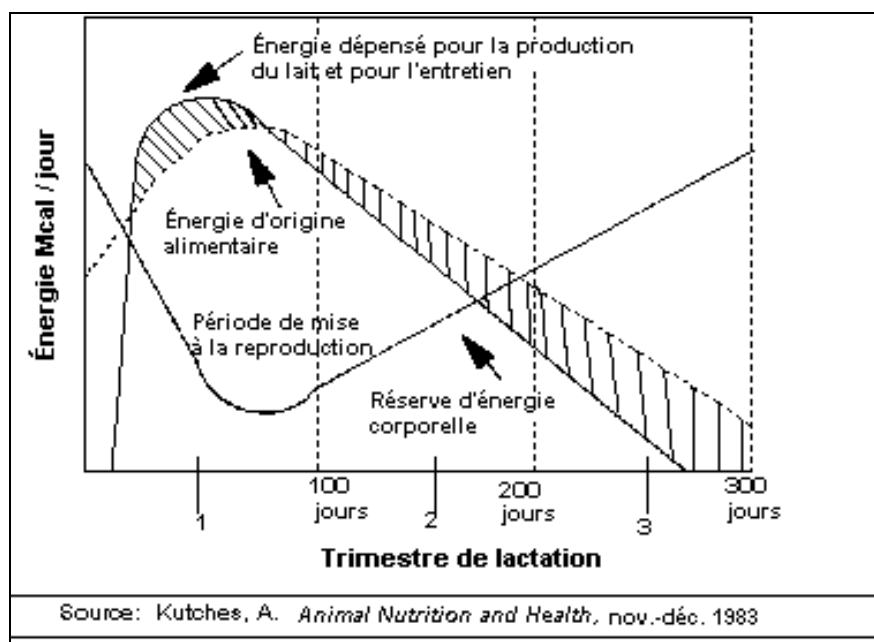


### I-3/ La cétose

#### **I-3-1/ Définitions et physiopathologie**

En fin de gestation, le volume du rumen diminue à cause de l'espace occupé par le fœtus dans la cavité abdominale. La capacité d'ingestion de la vache est limitée. Une réduction de la quantité de la MSI est souvent observée dans les 3 semaines précédant le vêlage. Cette diminution varie de 10 à 30% au cours de cette période [36, 37, 38].

Ainsi, l'énergie apportée par l'alimentation est assez souvent insuffisante par rapport à celle nécessaire à la croissance du fœtus et à la production de lait, d'autant plus que cette production ne fait que croître pour atteindre une valeur maximale vers la 6<sup>ème</sup> semaine après le part (figure 5).



**Figure 5** : Courbes énergétiques types pour la vache laitière en lactation [39]

Au cours des 24 à 48 heures qui précèdent le vêlage, un fort déficit énergétique apparaît dû à la fois au stress de la mise bas et à une diminution du volume ruminal, alors qu'il existe un accroissement brutal du besoin en énergie (libération de glucocorticoïdes avant la mise

bas). Ce besoin est encore accru après le vêlage par la production de lait. Le bilan énergétique est alors négatif dans la plupart des cas.

**Tableau 4 :** Calcul des besoins en énergie nette lors de la lactation en Mcal/jour pour les vaches et les génisses 2 jours avant et 2 jours après le vêlage [40]

	<b>Vaches de 725 kg</b>		<b>Génisses de 570kg</b>	
<b>Fonction</b>	<b>Pré-partum Mcal/jour</b>	<b>Au moment du vêlage Mcal/jour</b>	<b>Pré-partum Mcal/jour</b>	<b>Au moment du vêlage Mcal/jour</b>
Maintenance	11,2	10,1	9,3	8,5
Gestation	3,3	---	2,8	---
Croissance	---	---	1,9	1,7
Production de lait	---	18,7	---	14,9
<b>Total</b>	<b>14,5</b>	<b>28,8</b>	<b>14</b>	<b>25,1</b>

La lipomobilisation est importante tandis que l'utilisation du glucose dans les tissus autres que le parenchyme mammaire diminue. Des AGNE et des triglycérides sont libérés dans le sang à partir du tissu graisseux pour être transformés dans le foie où ils doivent subir une  $\beta$ -oxydation afin d'être utilisables pour la production d'énergie. Dans le cas où l'oxydation est partielle [41], il y a formation de corps cétoniques. Si la voie de  $\beta$ -oxydation est saturée, il y a alors formation de triglycérides dans le foie, mais la faible synthèse de VLDL empêche l'exportation de ces triglycérides vers le sang (cf. figure 6). L'apolipoprotéine B est la principale molécule de transport des triglycérides dans le sang. Or chez la vache en début de lactation, la transcription du gène codant pour l'apolipoprotéine B diminue, provoquant ainsi une diminution de la synthèse de cette protéine de transport [42].

Durant la première semaine de lactation, l'utilisation des réserves adipeuses permettrait de produire jusqu' à 7 kg de lait chaque jour (Pryce et al, 1999) [43].

La concentration de l'hormone de croissance augmente dans le sang pendant la parturition et sensibilise encore plus les tissus adipeux aux signaux lipolytiques (norépinéphrine).

La diminution d'insuline et l'augmentation du glucagon autour de la mise bas induisent une diminution du malonyl CoA, puis une augmentation de l'oxydation des acides gras.



cours des 6 semaines post partum. Elle est due à un déficit énergétique chez la vache laitière suite à l'augmentation de la production de lait qui atteint un maximum à cette période-là.

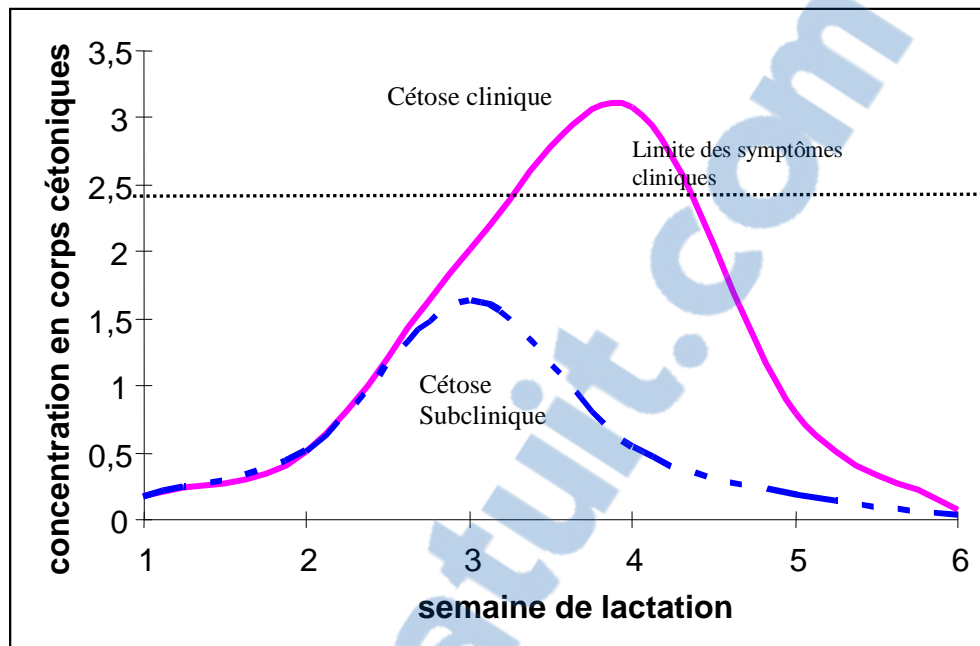
Pour cette raison, elle atteint plutôt les vaches hautes productrices [45]. Sa prévalence aux Etats-Unis et en Europe de l'Ouest serait de 2 à 15% [46, 47].

Les signes cliniques sont une diminution de la production de lait, un amaigrissement, une alternance diarrhée/constipation, un appétit capricieux (surtout pour les concentrés), l'isolement du reste du troupeau, et exceptionnellement, des signes nerveux.

Au contraire de la stéatose, il y a peu de surcharge graisseuse dans le foie de ces vaches.

La cétose subclinique correspond à une augmentation des corps cétoniques dans le sang, sans signe clinique patent. Elle peut aussi correspondre à un état pré clinique de la cétose [48]. Elle arrive souvent en début de lactation (dans le premier mois, avec une incidence maximale entre la deuxième et la troisième semaine de lactation [49]). Sa prévalence peut atteindre 15% dans certains troupeaux [50], elle est généralement comprise entre 6,9% et 14,1% dans les 2 premiers mois de lactation (selon certains auteurs, elle est de 8,9% à 34% dans le monde [46]). Elle ne peut être confirmée que par des analyses. Elle nécessite le recours à des examens de laboratoire pour mesurer la concentration en corps cétoniques [48].

Certaines études montrent que la prévalence de la cétose subclinique peut atteindre 50% des vaches laitières (59% avec une concentration en BHB > 1,2 mmol/l, 43% avec cette concentration > 1,4 mmol/l [46], 1,2 et 1,4 mmol/l étant les seuils retenus en fonction des études).



**Figure 7** : Courbe théorique de la concentration en corps cétoniques chez des vaches avec une cétose clinique ou en cétose subclinique qui guérissent [48]

### I-3-2-2/ Facteurs de risque

#### *Cétose primaire*

L'un des facteurs de risque de la cétose primaire est une production laitière élevée [10] alors que la densité énergétique de la ration ingérée durant le péri-partum est faible.

L'effet de la concentration énergétique de la ration avant et après la mise bas a été étudié par Mandebvu et son équipe. Ils ont étudié un groupe de vaches nourries avec une ration de référence, et un autre groupe nourris avec un complément énergétique (Nutrical®, contenant 43% de propionate) et la même ration, de 3 semaines pré-partum à 3 semaines post-partum. Puis les deux groupes sont nourries avec la ration de référence de 4 à 8 semaines post partum [51]. Les vaches mangent à volonté, et sont traitées 3 fois/jour. L'état corporel moyen était identique au début de l'expérience, tout comme la parité, le mois de mise bas et le potentiel génétique pour la production de lait

Les observations majeures sont :

- un TB plus faible de façon significative pour les vaches complémentées
- des concentrations en AGNE, PAL, Albumine dans le sang plus faibles pour les vaches complémentées

- une diminution de l'incidence de la cétonurie pendant les 2 premières semaines post partum
- aucune différence de la note d'état corporel

Notons que dans cette expérience, aucun corps cétonique n'a pas été mesuré dans le sang.

Ainsi, l'apport de propionate au groupe complémenté a facilité la néoglucogénèse et la formation d'énergie. Pour les autres vaches, le déficit énergétique a entraîné la mobilisation de matières grasses (AGNE) et surtout la formation des corps cétoniques suite à l'oxydation incomplète des AG.

Dans cette expérience, les corps cétoniques n'ont pas été mesurés dans le sang.

Aucune différence d'état corporel n'a été notée, ce qui prouve que l'état corporel n'est pas toujours un indicateur fiable pour détecter la cétose. Néanmoins, dans cette expérience, les vaches complémentées ont un apport supplémentaire de 86 g de propionate, ce qui semble insuffisant à la fois pour observer des variations des autres composants sanguins (ASAT, cholestérol, protéines, acides uriques, urée, bilirubine) et pour provoquer des différences de l'état corporel.

Une ration supplémentée en matières grasses, même si elle est plus énergétique, entraîne l'accumulation d'acides gras dans le foie, qui favorise la formation de corps cétoniques. Par ailleurs, l'apport de matières grasses trop élevé diminuerait la matière sèche ingérée [38]. La ration idéale est donc une ration qui apporte de l'énergie sous forme de propionate, mais en quantité adéquate pour ne pas contribuer à l'apparition d'une acidose subclinique. Selon Andersson L. [48], une ration avec une grande quantité de précurseurs de matières grasses et un faible apport en précurseurs de glucose peut être cétogène même si l'apport en énergie est plus grand.

Un autre facteur de risque lié à la composition de la ration est le taux de butyrate dans l'ensilage [38]. Les bactéries de la famille des *Clostridium* fermentent et forment de l'acide butyrique à la place de l'acide lactique. Ceci est facilement identifiable à l'odeur. Soixante quinze pour cent de cet acide butyrique serait transformé en BHB dans le rumen. Puis le BHB est converti en autres corps cétoniques. Ainsi, 50-100 g/jour d'acide butyrique pourraient causer une cétose, 200g/jour pourraient causer une cétose sévère, 450-900 g/jour

entraîneraient une cétose sévère chez n'importe quelle vache en début de lactation [38]. L'effet céto-gène de l'acide butyrique est d'autant plus important que la glycémie est faible [48].

D'autres facteurs influencent le risque de cétose tels que l'âge de la vache (les vaches plus âgées ont plus de risque de développer une cétose clinique et cette relation n'existerait pas pour la cétose subclinique [46]), la saison de vêlage, la gestion de l'élevage (fractionner les repas diminue le risque de cétose dans un élevage [46]).

En conclusion il y aurait 3 types de cétose primaire à distinguer d'après Oetzel G.R [38]:

- le BHB augmente dans les 4 premiers jours après la mise bas : c'est une stéatose ou cétose de type II (traitée en 1-2)
- le BHB augmente entre 14 et 21 jours après la mise bas : c'est une cétose de type I, primaire
- le BHB augmente avant 50 jours : cétose de type I primaire qui serait plutôt associée au butyrate des ensilages

Comme indiqué plus haut, la production laitière joue un rôle dans l'apparition de la cétose clinique et/ou subclinique. Fleischer *et al* [9] montrent que le niveau de production de la lactation précédente influence positivement et significativement le risque de cétose, alors que ce n'est pas le cas pour le niveau de production de la lactation qui débute.

Le risque de cétose augmente avec le numéro de lactation si on considère une même production, mais il augmente aussi avec la production pour un même numéro de lactation.

Le nombre de céto-ses au cours de la carrière de production d'une vache intervient également dans le risque (une cétose en première lactation entraîne 17% de risque de cétose en deuxième lactation, alors que l'absence de cétose en première lactation ne modifie pas le risque de cétose de 4% en deuxième lactation [52]). La gravité d'une cétose à la lactation précédente serait elle aussi importante.

### ***Cétose secondaire***

Les facteurs de la cétose secondaire sont les maladies péri partum qui entraînent une diminution de la MSI telles que le déplacement de caillotte, la fièvre de lait, la métrite

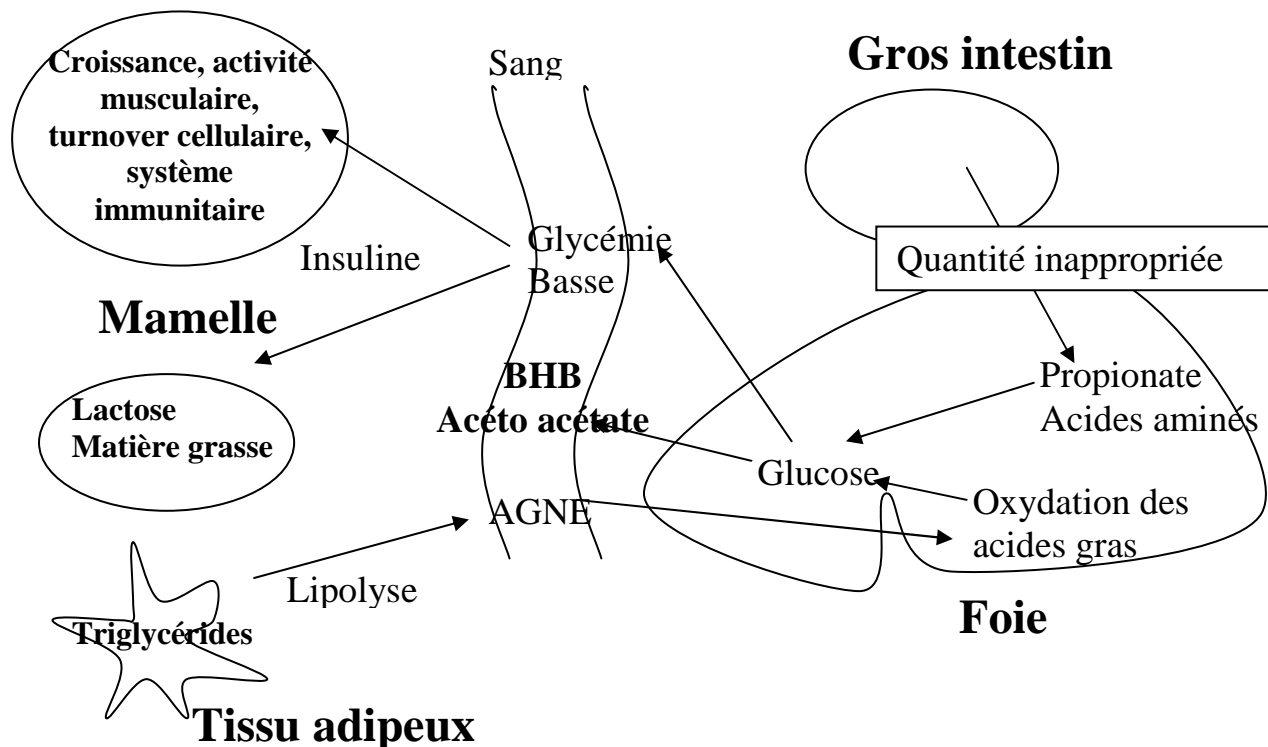
puerpérale, la rétention placentaire, les mammites. Nielsen distingue dans son étude de modélisation du risque de cétose [52] un indicateur de risque de base, qui est la concentration en BHB dans le lait et les variations de cette concentration, et des facteurs de risque additionnels dont les maladies péri partum, l'état d'engraissement à la mise bas, le pic de lactation, la gestion de la saison sèche.

### **I-3-2-3/ Pathogénie**

La cétose, clinique ou subclinique, apparaît lorsqu'il existe un déficit énergétique, peu après la mise bas, de telle sorte qu'il y a une augmentation de la néoglucogénèse. En effet, pendant la lactation, le besoin en glucose serait multiplié par 2,66 [53]. Si le déséquilibre énergétique est vraiment très grand (cas d'une production laitière élevée, d'une faible densité de la ration, d'une fasciolose, d'intoxication avec des plantes (Séneçon de Jacob) ou avec des mycotoxines), les éléments nécessaires à la néoglucogénèse tels que les AGV à 2 carbones sont insuffisants, et la cétogénèse devient plus marquée afin de synthétiser des corps cétoniques à partir des triglycérides (acides gras à chaîne longue) et de l'énergie. Le BHB provient d'une part de l'oxydation incomplète des acides gras dans le foie, et d'autre part de l'absorption de butyrate ruminal converti facilement en BHB (75% du butyrate est transformé en BHB qui à son tour est transformé en acéto-acétate [38,48]).

Le BHB est utilisé dans la mamelle pour la synthèse des matières grasses du lait. Ainsi, il existe toujours une quantité minimale de BHB dans le lait.





**Figure 8** : Mécanismes de la cétose (Oetzel G.R., *Herd level ketosis-diagnosis and risque factors*)

La mobilisation du tissu adipeux conduit à une baisse d'état. Cette baisse d'état est corrélée positivement à la production et à l'âge de la vache [43]. Ainsi, des vaches perdant 0,75 point ou plus (sur l'échelle de 1 à 5 de notation de l'état corporel) après la mise bas ont souvent une concentration en BHB dans le sang qui va dépasser la valeur seuil de 1,2mmol/l et une cétose subclinique.

Des vaches qui perdent moins de poids après la mise bas (chute d'état < 0,75 point) produisent plus de lait sur les 240 premiers jours de lactation [43].

Simultanément, le TB du lait augmente, tandis que suite à la diminution de l'énergie disponible, le TP diminue.

### **I-3-3/ La cétose de type II, ou stéatose**

#### **I-3-3-1/ Circonstances d'apparition et signes cliniques**

Elle apparaît autour de la mise bas, chez les vaches qui ont un état d'engraissement marqué en fin de tarissement. La stéatose est aussi appelée cétose de type II (à différencier de la cétose secondaire).

L'état d'engraissement est trop élevé (note supérieure ou égale à 4 [38] sur une échelle américaine de 1 à 5 ce qui équivaut à une note de 3 sur l'échelle française de 0 à 5).

Les signes cliniques associés à la stéatose sont variables : anorexie, chute de production, abattement, plus rarement des signes nerveux tels que l'opisthotonos, l'amaurose. Ces derniers signes sont peu indicatifs [7]. L'hypertrophie du foie peut rarement être mise en évidence par palpation.

La stéatose hépatique a des conséquences importantes sur la production de lait, la vache s'amaigrit rapidement (diminution de plus de 1,5 points de l'état corporel). Suite à un bilan énergétique négatif, la reprise d'état post partum apparaît tardivement et le pic de lactation sera moins élevé, l'allure de la courbe de lactation est quelque fois anormalement plate [54]. Après 105 jours de lactation, la stéatose n'a généralement plus d'influence sur le métabolisme de la vache. Il existe d'autres conséquences à la stéatose telles que l'hypofertilité, une baisse de l'immunité (cette fonction consommant une grande quantité d'énergie) d'où des infections plus fréquentes comme métrite, mammite ou pneumonie [38]. Les déséquilibres minéraux qui ont lieu autour de la mise bas (cf. supra) sont également aggravés par la stéatose.

L'accumulation de triglycérides dans le foie entraîne un dysfonctionnement des enzymes hépatiques, notamment de la PEPCK qui permet la transformation du propionate en glucose (néoglucogénèse). Par ailleurs, une ration riche en énergie avant la mise bas permet un apport de glucose directement disponible qui est suffisant, d'où une diminution d'activité de la PEPCK avant la mise bas [55]. Du fait de son caractère auto aggravant, la stéatose peut quelquefois être létale.

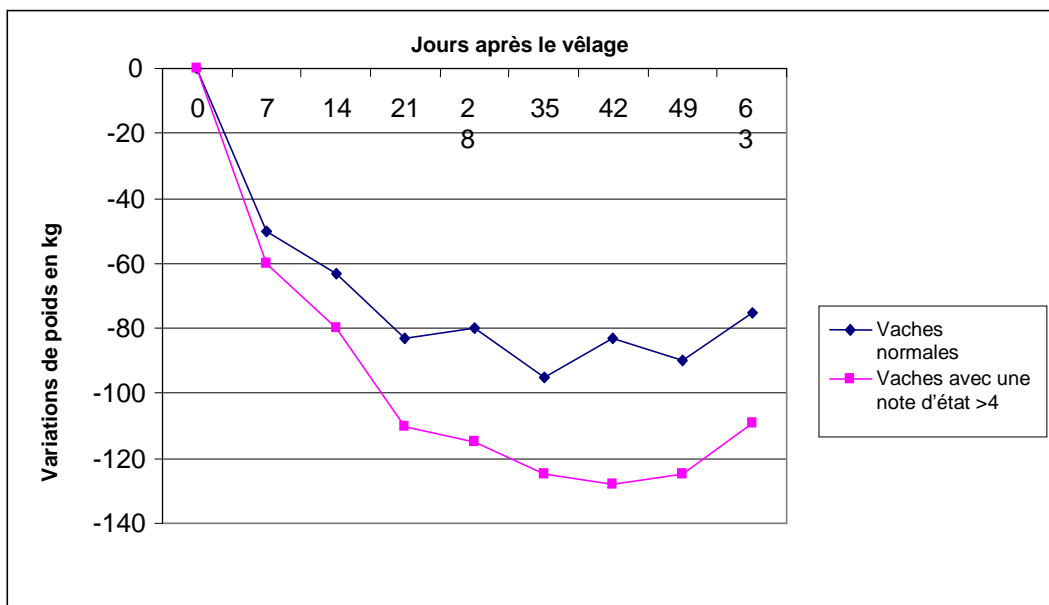
### **I-3-3-2/ Facteurs de risque de la stéatose**

#### *Etat corporel au vêlage*

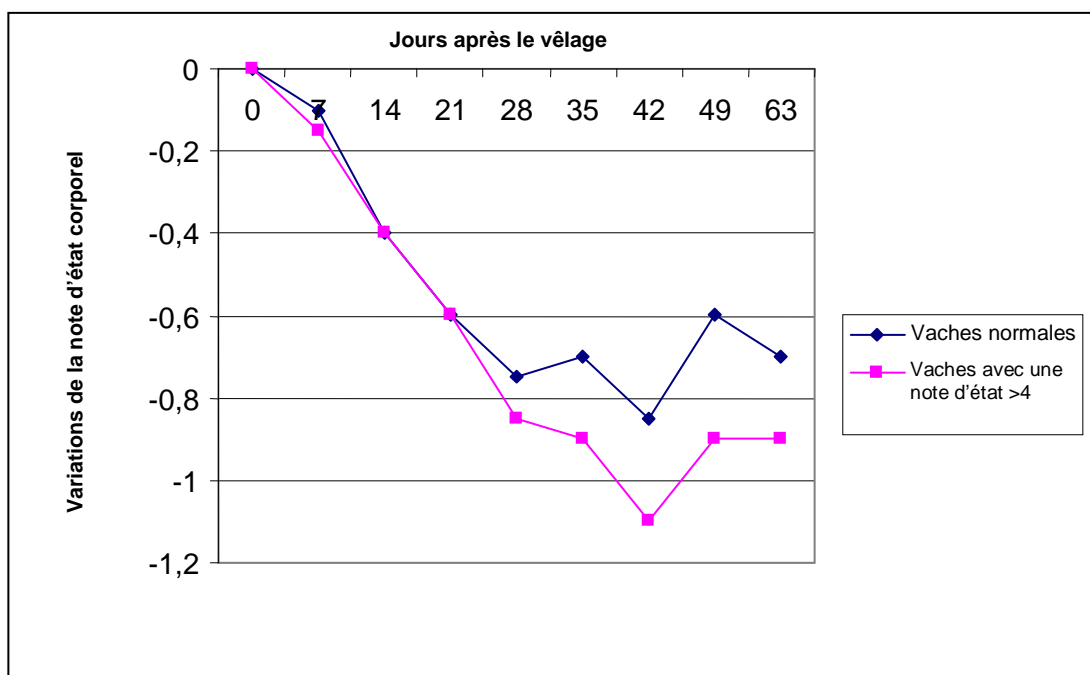
Les vaches à risque sont les vaches qui, en fin de période sèche, ont une note supérieure à 3,5-3,75 (sur une échelle de 1 à 5) ou à 2,5 à 2,75 (sur une échelle de 0 à 5) [56]. La plupart de ces vaches sont susceptibles de perdre plus de 0,75-1 point en début de lactation [57]. Pour Nielsen [52], un état corporel inférieur à 2,75 n'a aucune influence sur le risque de stéatose, et une vache avec un état corporel de 3,75 au vêlage, a 2 fois plus de risque d'avoir une cétose de type II par rapport à une vache dont la note d'état est de 2.

Des vaches ayant une baisse d'état corporel de plus de 1 point après la mise bas sont souvent celles dont l'état corporel est proche de 4 avant la mise bas. Elles présentent alors une augmentation de la concentration sanguine en AGNE ( $>0,7$  mmol/l) qui apparaît après la mise bas ; ces vaches sont généralement en hypoglycémie et on observe chez elles une augmentation de l'activité de l'ASAT dans le sang ainsi qu'une urémie anormalement élevée [43].

Notons qu'un état corporel observé à un instant donné reflète la balance énergétique durant la période qui précède, alors que les variations de l'état corporel depuis la visite précédente reflètent la balance énergétique en cours [57].



**Figure 9 :** Variation du poids des vaches dont la note d'état est normale comparées aux vaches note d'état supérieure à 4 dans les jours suivant la mise bas, [58]



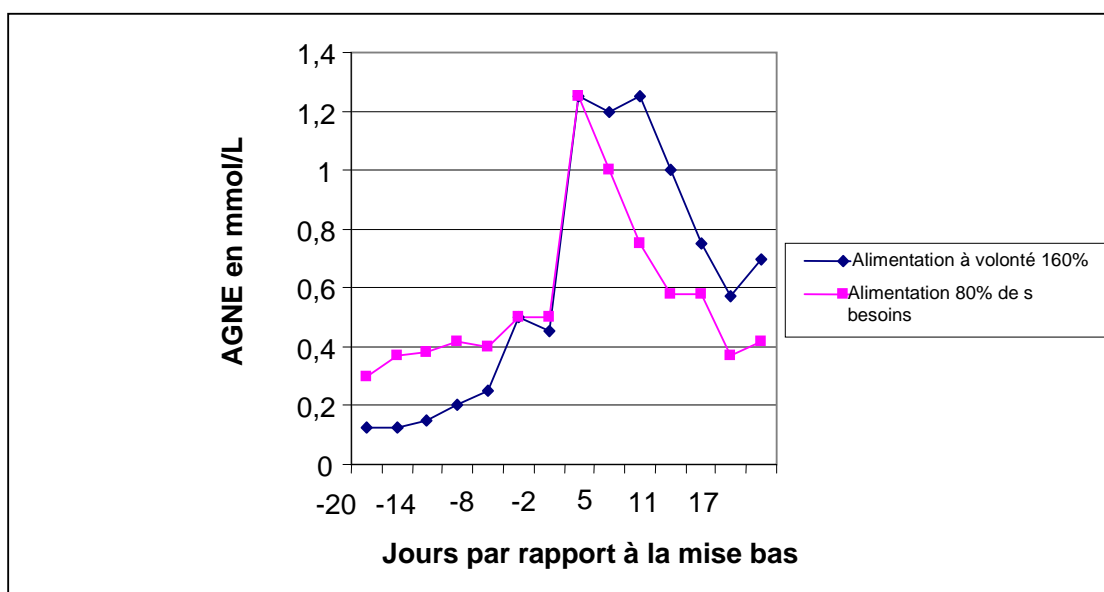
**Figure 10 :** Variation de l'état corporel des vaches dont la note d'état est normale comparées aux vaches note d'état supérieure à 4 dans les jours suivant la mise bas, [58]

### Apport énergétique de la ration

Différentes études ont recherché l'influence de la période sèche sur la période post-partum, en analysant l'intérêt d'une ration hypo énergétique et/ou d'une ration supplémentée en matière grasse lors du tarissement [37, 59].

### Relation apport énergétique au tarissement et stéatose

Douglas *et al* [37] ont étudié les effets d'une alimentation pré partum contrôlée (avec 80% des besoins énergétiques) ou à volonté (avec 160% des besoins énergétiques) sur l'apparition de la stéatose. On remarque une augmentation de la concentration en AGNE et donc un bilan énergétique négatif qui persiste plus longtemps pour les vaches nourries à volonté par rapport aux vaches nourries à 80% de leur besoin en énergie.



**Figure 11** : Concentration en AGNE dans le sang autour de la mise bas de vaches alimentées à volonté (160% des besoins en énergie) comparées aux vaches chez lesquelles l'apport énergétique est restreint (80% des besoins en énergie) [37]

Dann *et al* [60], ont étudié un groupe de vaches nourries à volonté et un groupe de vaches nourries avec une ration permettant 80% des besoins énergétiques. Ils ont montré que des vaches chez lesquelles l'apport est restreint entre 60 jours pré partum et la mise bas ont une capacité d'ingestion plus faible pendant cette période. La concentration sanguine en insuline et en glucose est inférieure et la concentration en AGNE est supérieure, 14 jours avant le

vêlage, par rapport à l'autre groupe. Mais, la MSI au 7e jour est moins élevée pour les vaches restreintes par rapport aux vaches nourries à volonté (7% vs 31%). Au même moment, les concentrations de BHB, et des AGNE, du glucose et de l'insuline dans le sang sont proches entre les 2 groupes. L'augmentation de la concentration en AGNE est d'environ 66% pour les vaches à volonté puisque faible au départ, alors qu'elle est de 28% pour les vaches chez qui 80% des besoins énergétiques sont couverts. Le lendemain du vêlage, pour les 2 groupes, les quantités de lipides totaux et le triacylglycérol (mesurés dans des échantillons obtenus après biopsie hépatique) augmentent dans le foie, alors que le glycogène diminue ; les vaches nourries à volonté ont une activité enzymatique de l'ASAT plus élevée.

Ainsi, on constate qu'une alimentation des vaches tarées non maîtrisée du point de vue de l'apport énergétique, à la fin de la période sèche conduit à un risque plus grand de stéatose hépatique autour du vêlage. Le métabolisme du tissu adipeux est largement modifié avant la mise bas pour les vaches nourries sans excès par rapport au besoin recommandé. Pour les vaches avec un apport excédentaire, le métabolisme hépatique est moins bien adapté [61].

Les génisses grasses sont une population qui est d'autant plus à risque qu'elles sont mises en lot à proximité du vêlage alors que les vaches fraîches vêlées sont dominantes et les empêchent d'accéder correctement à la table d'alimentation [38]. Notons aussi que les mouvements de vaches d'un parc à un autre en péripartum, ainsi que le surpâturage constituent des risques de stéatose dans certains types d'élevage.

### **Importance du début de la période sèche**

Dann et al [36] ont montré que la ration de début de période sèche joue un rôle plus important dans le métabolisme péri partum que la ration des trois dernières semaines de la période de transition.

En début de période sèche, des vaches recevant un apport correspondant à 150% des recommandations du NRC de l'Illinois ont des concentrations d'AGNE et de BHB dans le sang plus élevées, ainsi qu'une perte de poids plus marquée avant le vêlage par rapport à des vaches nourries soit à 100% soit à 80% des besoins NRC.

Par ailleurs, durant la période post-partum, chez les vaches suralimentées, ces concentrations sont également plus élevées, et la balance énergétique, ainsi que la quantité de

MSI, sont plus faibles pendant les 10 premiers jours de la lactation. La quantité de lait produite n'est pas significativement différente.

Dann et al montrent que c'est surtout la ration de début de période sèche qui a un rôle important sur le métabolisme autour de la mise bas. La ration des 3 dernières semaines de la période sèche affecterait aussi le métabolisme pré partum, mais surtout le métabolisme post-partum.

Une suralimentation après le tarissement, associée à une sous-alimentation en fin de période sèche, a un effet négatif sur le métabolisme pré partum. Ceci peut être comparé à la situation réelle où la figure diminue fortement en fin de gestation [36].

Une restriction énergétique en début de période sèche améliore donc l'ingestion et le statut énergétique au début de la lactation

### **La supplémentation en matière grasse**

En 2004, Douglas et al. [59] montrent que la supplémentation de la ration en matière grasse permet une diminution plus progressive de la MSI et la limitation du déficit énergétique pendant les 3 dernières semaines de la période sèche. Ceci permet également une moindre perte de poids et d'état corporel en post-partum.

En pratique, il convient de distribuer une ration constituée de foin de graminées à brins longs, de qualité moyenne. A l'inverse, un ensilage de maïs est fortement déconseillé pour prévenir la cétose (alors qu'il est conseillé pour prévenir l'hypocalcémie). Puis pour permettre la fin de la croissance du fœtus sans que la vache ne prenne de poids, il est possible d'ajouter un complément à haute teneur en fibres et à basse teneur en protéines, servi en quantité contrôlée pour compléter la ration de foin [62].

Lors de la mise en place de la ration complète dans un élevage, il est donc important de distinguer la ration des lots des vaches en début et en fin de période sèche, de celles fraîchement vêlées.

### **I-3-4/ Traitement de la cétose clinique**

Le traitement de la cétose consiste à apporter de l'énergie afin de limiter le déficit énergétique ou à diminuer les besoins énergétiques, donc l'exportation.

Le propylène glycol est un précurseur du pyruvate pouvant servir à la néoglucogénèse ou entrer dans le cycle de Krebs. Le propylène glycol est administré par voie orale. L'apport d'énergie peut être réalisé par des perfusions lentes de soluté glucosé à 5%.

Le déficit énergétique peut être limité grâce à la diminution de la production de lait, en administrant des glucocorticoïdes à la vache.

La vitamine B12 et/ou la méthionine sont utilisables dans ce cas en tant que cofacteurs du cycle de Krebs. La méthionine stimule aussi la synthèse de l'apoprotéine B dans le foie et donc l'exportation des triglycérides.

### **I-3-5/ Cétose et reproduction**

La fonction de reproduction requiert également un certain apport énergétique. Ainsi, la cétose est associée à un retard dans la reprise de l'activité ovarienne et la formation d'ovaires kystiques après la mise bas [50, 48]. On ignore si les corps cétoniques dans le sang ont une influence directe sur la reprise de cette activité, ou si cette dernière est seulement liée au déficit énergétique global.

Pour des vaches ayant une concentration en BHB au dessus de la normale pendant la première ou la deuxième semaine de la lactation, la probabilité d'une gestation après la première insémination est réduite de 20%. Pour les vaches ayant une concentration en BHB au dessus de la normale pendant la première et la deuxième semaine, la probabilité d'une gestation après la première insémination est réduite de 50%. La concentration élevée en BHB dans le sang ainsi que la durée de cette élévation sont corrélées négativement avec les chances de gestation après la première insémination [63].

Pour un élevage avec un nombre élevé de cétozes cliniques, l'intervalle vêlage-vêlage moyen est augmenté de 2 jours, et la réussite en première insémination diminue de 4% [50]. La cétose subclinique quant à elle aurait plutôt un effet sur l'intervalle vêlage-premières chaleurs [46], les intervalles vêlage-première insémination et vêlage-dernière insémination [48].



### **I-3-6/ Relations des deux types de cétose avec les autres maladies péri partum**

Plusieurs publications montrent des relations entre les deux types de cétose et les maladies du péri partum. Parmi elles, les plus fréquentes sont la fièvre de lait, le déplacement de la caillette à gauche, les mammites clinique ou subclinique, la métrite, l'apparition de kystes ovariens. Ces maladies ont également un gros impact économique.

La relation entre la cétose et certaines maladies est souvent bidirectionnelle.

D'après Duffield T. [48], la cétose subclinique serait un facteur augmentant le risque de métrite et de cétose clinique. Cependant, la cétose favorise moins souvent la métrite que l'inverse.

La rétention placentaire augmenterait le risque de cétose subclinique [48].

La relation entre le déplacement de la caillette à gauche et la cétose paraît clairement bidirectionnelle [48].

Une concentration en BHB dans le sang à 1 mmol/l prédisposerait au déplacement de la caillette. Si cette concentration atteint 1,4 mmol/l 3 semaines après la mise bas, le risque de déplacement de la caillette triple [48].

Par ailleurs, une cétose clinique ou subclinique a un effet inhibiteur sur l'activité des leucocytes, les fonctions immunitaires nécessitant une grande quantité d'énergie, et la sensibilité aux infections comme les mammites, métrites semblent augmenter.

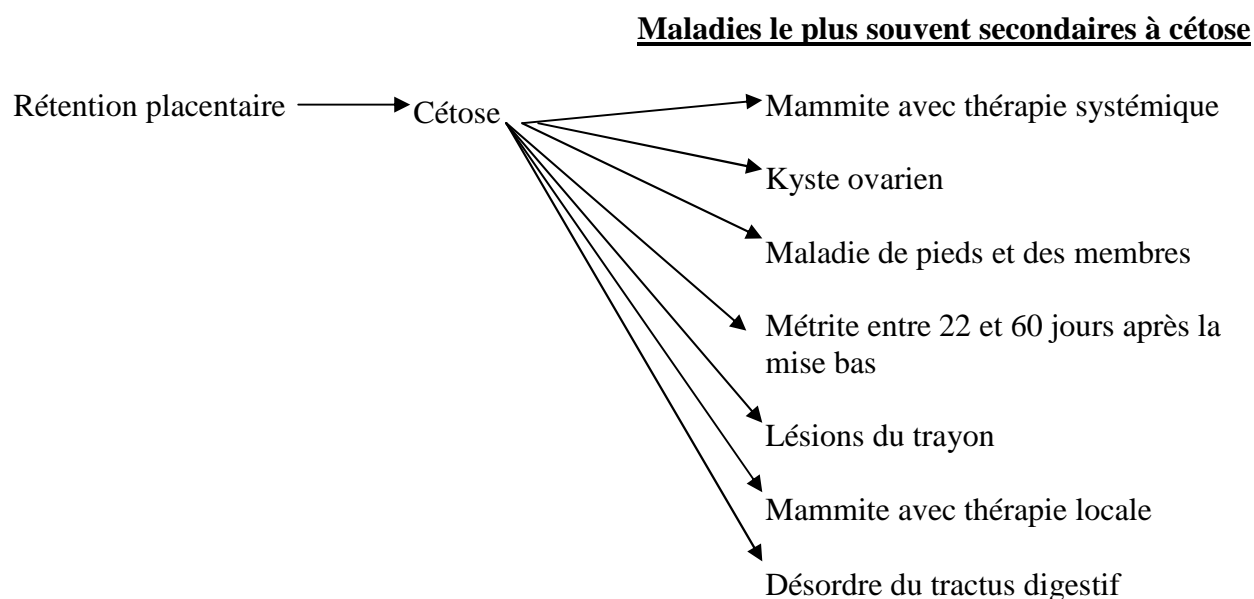
Dohoo I.R. et al [64] ont étudié les rapports entre les différentes maladies du péri partum mais aussi la chronologie de ces maladies les unes par rapport aux autres. Pour cela, ils ont analysé 2875 lactations. La cétose subclinique apparaît dans les 25 jours qui suivent la mise bas.

Les facteurs principaux de la cétose clinique sont :

1. une cétose au cours de la lactation précédente
2. un déplacement de la caillette
3. une affection des pieds, ou des membres
4. une rétention placentaire à la lactation précédente

Une cétose à la lactation précédente est le 2ème facteur de risque de l'hypocalcémie et le 2ème facteur de risque de l'apparition d'un kyste ovarien.

On peut établir ce diagramme d'après les observations de Dohoo I.R et al :



**Figure 12 : Relation entre la cétose et les autres maladies [64]**

Dans cette étude, aucune information n'est donnée sur la relation déplacement de la caillette-cétose, ce qui n'implique pas que la cétose ne puisse pas être consécutive à un déplacement de la caillette.

Il a été constaté que la présence d'une maladie lors de la lactation précédente augmente le risque d'apparition de cette maladie sur la lactation en cours.

Cette équipe montre aussi une relation positive de la fréquence de la cétose subclinique avec l'âge et l'intervalle vêlage-vêlage et seulement une relation positive entre la cétose clinique avec l'âge.

### **I-3-7/ Incidence économique de la cétose et de la stéatose**

La cétose, qu'elle soit clinique ou subclinique, entraîne des pertes économiques non négligeables, liées à la diminution de la production laitière, en plus de celle des performances de reproduction et de l'augmentation de l'incidence des maladies du péri partum.

La cétose clinique a une influence sur la production de lait pendant la cétose mais aussi pendant toute la lactation. Il en est de même pour la cétose subclinique qui provoque une diminution de la production de lait, continue, sans suspicion clinique ou sans qu'une insuffisance de la production soit notée [50].

La cétose subclinique précède souvent la cétose clinique. Ainsi, la chute de production débute souvent 2-4 semaines avant le diagnostic de cétose. Puis dans de nombreux cas, les pertes continuent encore 2 semaines après le traitement [65].

La perte de lait totale est estimée à 126 kg de lait si la cétose apparaît au cours de la lactation n°1, et de 535 kg pour la lactation n°2.

Pour Duffield T., la cétose subclinique serait à l'origine d'une perte de 300-450 kg de lait par lactation, perte variant selon la sévérité de la maladie [46].

**Tableau 5** : Incidence de la cétose subclinique sur la lactation avant l'apparition des signes cliniques [65]

Numéro lactation	Pertes de -28 à -14 jours avant diagnostic	Pertes de -14 jours à 0 jours avant diagnostic	Perte totale
1	1,2kg/jour	1,7kg/jour	40,6kg
2	1,5kg/jour	2,7 kg/jour	58,8kg
3	1,2kg/jour	1,5kg/jour	37,8kg
4	2,1 kg/jour	4,9 kg/jour	98kg

Les pertes de lait lors de la déclaration clinique de la maladie au moment du diagnostic ne sont pas présentées dans ce tableau.

Une étude a été réalisée dans l'Ontario [66] pour mettre en évidence les relations entre les maladies autour de la mise bas et un index qui estime la différence entre le revenu lié à la production de lait et le coût de l'alimentation. Une association maladie-revenu y était recherchée.

Les conclusions de cette étude montrent que la cétose subclinique et la cétose clinique étaient associées à l'index économique de façon significative. Mais la cétose clinique est positivement associée à l'index, tandis que la cétose subclinique l'est négativement (notons que dans cette étude, 2,9% des vaches ont eu une cétose clinique, et qu'il s'agissait pour la plupart de vaches hautes productrices ; Fleischer P. et al [9] ont trouvé sur un total de 1734 lactations une incidence de la cétose clinique de 1,7%, et de 0,5% sur les primipares). Par

ailleurs, dans cette étude, 30% des éleveurs distribuaient du propylène glycol à toutes leurs vaches en début de lactation à titre préventif.

Deux semaines après le part, la prévalence de la cétose subclinique était de 30%. On note une association positive entre la cétose clinique et la cétose subclinique.

La cétose clinique est souvent associée à une production de lait élevée par rapport à la moyenne du troupeau. Mais les pertes occasionnées par cette cétose restent inférieures à la quantité de lait produite en plus, sur l'année, par rapport à la moyenne de production du troupeau. La perte est estimée à 2-6 kg/jour/vache pour 2% des vaches (incidence moyenne de la cétose clinique). Ainsi les vaches atteintes ont une diminution de la production de 44,3 kg de lait en moyenne, alors que leur production est de 141 kg supérieure à la moyenne de production du troupeau d'après Duffield [46], ce qui expliquerait cette corrélation positive.

Au contraire, pour la cétose subclinique, il y aurait une réduction sur l'ensemble de la lactation, d'environ 1-1,5 kg/jour/vache pour 50% des vaches, ce qui globalement provoque une réduction plus forte de la production totale de lait comparée à celle engendrée par la cétose clinique. La cétose subclinique a donc une incidence cumulée très marquée sur la diminution de la production de lait. L'estimation de ces pertes est de 0,015\$/vache/jour/pourcentage de vaches atteintes de cétose subclinique dans un élevage [66], en ne tenant pas compte des effets secondaires sur la reproduction.

## **Partie II : Diagnostic des maladies métaboliques dites de production chez la vache laitière à l'échelle de l'élevage**

### **II-1/ Analyses sur le troupeau en fin de tarissement et autour de la mise bas**

#### **II-1-1/ Etude de la prévalence de la stéatose**

##### **II-1-1-1/ Mesure de la concentration en AGNE dans le sang**

Le dosage des AGNE permet d'évaluer le statut énergétique de la vache et de vérifier l'existence d'une balance énergétique négative, notamment dans les 2 dernières semaines de gestation. A ce moment-là la concentration sanguine des AGNE varie fortement s'il existe un déficit. Ce dosage reste informatif jusqu'à 5 jours après le vêlage.

La valeur de référence des AGNE dans le sang chez la vache laitière durant la période sèche est inférieure à 0,4 mmol/l, et inférieure à 0,7 mmol/l pour une vache en lactation. Le dépassement de ces valeurs indique le développement d'une stéatose. Les dosages sont possibles à partir du sérum ou du plasma prélevé sur tube hépariné. Le dosage est réalisé par des laboratoires spécialisés.

La concentration en AGNE varie en fonction de l'alimentation et du stress subi par les animaux [48].

D'après Oetzel G.R. [38], entre le 3e et le 35e jour pré partum, si la concentration en AGNE est supérieure à 0,3 mmol/l, la vache a 3 fois plus de risque d'avoir un déplacement de la caillette après le part. Entre 0 et 6 jours après le vêlage, les vaches avec une concentration sanguine d'AGNE supérieure à 0,5 mmol/l ont un risque de déplacement de la caillette multiplié par 3,6.

##### **II-1-1-2/ Evaluation de la glycémie**

Chez les bovins, la glycémie est normale si les valeurs sont comprises entre 0,47 et 0,75 g/l c'est à dire entre 2,5 et 4,2 mmol/l [67]. Les valeurs usuelles varient cependant selon les auteurs et les publications. La glycémie est donc inférieure à celle des autres espèces et c'est pourquoi les analyseurs portables utilisés en médecine humaine sont certes pratiques sur le terrain, mais leur précision est médiocre.

La mesure de ce paramètre reste un mauvais indicateur du statut énergétique chez les bovins car les variations journalières de la glycémie sont grandes, et le prélèvement de sang sur des animaux à jeun n'est pas possible chez les ruminants.

L'hypoglycémie apparaît facilement pendant la période de transition chez les vaches laitières [68]. Une hypoglycémie apparue dans les 28 jours avant la mise bas va favoriser l'hypoglycémie post-partum et donc une balance énergétique négative. Par ailleurs l'hypoglycémie pré partum entraîne une lipolyse marquée en début de lactation, d'où une concentration en AGNE dans le sang, 1 jour après le part, qui est supérieure à celle des vaches dont la glycémie pré partum est normale.

Les vaches hypoglycémiques en pré partum ingèrent moins de matière sèche à la fois avant et après la mise bas, et cette hypoglycémie influe aussi sur le poids : entre 1 et 14 jours post-partum, les vaches dont la glycémie est faible ont un poids inférieur.

L'hypoglycémie pré partum a plusieurs facteurs prédisposants, dont l'alimentation et la génétique.

Si l'hypoglycémie favorise la stéatose, la mesure de la glycémie n'est cependant pas le meilleur indicateur de la stéatose. Lors de stéatose, on observe indifféremment une hypo ou une hyperglycémie.

Une glycémie inférieure à 0,5 g/l dans le sang serait un indicateur peu spécifique d'une balance énergétique négative, même si selon Reist *et al.* [69], ayant étudié des vaches laitières entre 1 et 10 semaines post partum, la glycémie serait aussi bon indicateur de déficit énergétique que le BHB.

### **II-1-1-3/ Mesure de la concentration en BHB dans le sang**

Lors d'une stéatose, le BHB augmente également, mais dans une moindre mesure que lors d'une cétose de type I. Le dosage des AGNE peut être fait dans les jours précédant et suivant la mise bas (globalement une semaine avant et une semaine après), alors que le dosage du BHB se fait surtout dans les jours qui suivent la mise bas (après la première semaine de lactation, cf. infra).

Lors de stéatose (cétose de type II), la concentration de BHB augmente dans les 14 premiers jours de lactation, et de façon moins marquée que lors d'une cétose de type I. Les augmentations observées par la suite correspondent plutôt à des cétozes de type I (cf. tableaux en annexes 1 et 2)

#### **II-1-1-4/ La biopsie hépatique [57]**

La biopsie hépatique est certes un examen invasif, mais il permet de vérifier de façon quasi-certaine l'existence d'une stéatose. En outre, cette méthode est un moyen de connaître l'intensité de l'infiltration graisseuse.

La ponction hépatique se fait un travers de main en dessous de l'apophyse transverse au niveau du 10<sup>ème</sup> espace intercostal, à droite de la vache [70].

Le test de flottaison est réalisé en plaçant trois morceaux de parenchyme hépatique dans des solutions de densité différente : une solution d'eau distillée, une solution de sulfate de cuivre ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) à 3,18% ( $d=1,025$ ) et une autre solution à 8,11% de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  ( $d=1,055$ ).

**Tableau 6 : Interprétation du test de flottaison sur une biopsie hépatique**

<b>Solution d'eau distillée</b>	<b>Solution de <math>\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}</math> de densité 1,055</b>	<b>Solution de <math>\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}</math> de densité 1,055</b>	<b>Infiltration de lipides dans le foie</b>
Flotte	Flotte	Flotte	34% de lipides, symptômes cliniques manifestes
Ne flotte pas	Flotte	Flotte	Entre 25 et 34% de lipides, animaux modérément affectés
Ne flotte pas	Ne flotte pas	Flotte	Entre 13 et 25% de lipides, vaches peu affectées cliniquement
Ne flotte pas	Ne flotte pas	Ne flotte pas	Moins de 13% de lipides Absence de signe clinique

L'examen histologique du foie permet également de classer les échantillons en fonction de l'intensité du dépôt graisseux dans les hépatocytes :

- Grade 0 : hépatocytes normaux
- Grade 1 : vacuoles graisseuses intra cytoplasmiques de petite taille
- Grade 2 : vacuoles graisseuses intra cytoplasmiques de taille moyenne

- Grade 3 : vacuoles graisseuses intra cytoplasmiques de grande taille (bon pronostic)
- Grade 4 : nombreux noyaux pycnotiques en plus (réservé)
- Grade 5 : vacuoles graisseuses intra cytoplasmiques dans presque tout le cytoplasme et presque tous les noyaux sont pycnotiques (très réservé)

Les risques et les conséquences de la biopsie hépatique doivent être pris en compte. Lors d'une étude sur les maladies métaboliques réalisée chez des vaches normales et des vaches obèses [58], Smith T. et al. ont analysé les effets de la biopsie hépatique (effets sur la production de lait, sur la consommation de foin et sur la consommation de concentrés et d'ensilage). Les résultats sont issus de 132 biopsies hépatiques. Seule la diminution de l'ingestion de concentrés et d'ensilage par rapport aux valeurs de référence établies le jour de la biopsie est significative, mais elle n'est ni spectaculaire, ni soutenue. Cet examen semble donc être faisable en pratique sans risques excessifs. La mise en œuvre de cet examen est cependant relativement chronophage.

## **II-1-2/ Etude du risque d'hypocalcémie dans un troupeau**

### **II-1-2-1/La mesure du pH urinaire**

Le pH urinaire est, chez la vache, le reflet du BACA de la ration. Une diminution du BACA chez la vache est associée à une diminution du pH sanguin. Rappelons que cette diminution du pH sanguin permet entre autres, une meilleure absorption du calcium par la muqueuse intestinale et une meilleure résorption osseuse [14]. Cette acidification sanguine se reflète dans le pH urinaire qui est plus bas [13, 14, 17].

Une vache, qui dans les 48h autour de la mise bas, a un pH urinaire inférieur à 7 est considérée comme une vache ayant peu de risque de faire une hypocalcémie.

La mesure du pH urinaire sur plusieurs vaches dans les 12-48 heures précédant le vêlage permet d'évaluer le risque d'hypocalcémie du troupeau. Un troupeau est considéré « à risque » quand la moyenne du pH des échantillons urinaires est supérieure à 7 [34].

Cette mesure est en général faite pour évaluer une ration anionique (trop ou trop peu acide), mais peut aussi être utilisée sur des vaches recevant une ration non complémentée en sels anioniques pour évaluer le risque d'hypocalcémie [71].



### **II-1-2-2/La mesure de la calcémie**

Un autre moyen de détection chez les vaches faisant partie du lot à risque, est la mesure de la concentration en calcium total ou ionisé dans le sang.

La valeur de la concentration en calcium total ne doit pas être inférieure à 2 mmol/l, et celle du calcium ionisé ne doit pas être inférieure à 1 mmol/l [34]. La corrélation entre la concentration du calcium ionisé et celle du calcium non ionisé est bonne et indépendante du stade physiologique. C'est pourquoi, même si le calcium ionisé est le seul actif dans l'organisme, la mesure de la concentration en calcium total est un bon indicateur [3].

Cette mesure permet surtout d'identifier les vaches atteintes d'hypocalcémie, avec ou sans signes cliniques. Elle n'évalue pas le risque d'hypocalcémie, mais plutôt l'incidence de cette maladie.

## **II-2/ Etude du troupeau en début de lactation**

### **II-2-1/ Etude du risque d'ARSA dans un troupeau**

#### **II-2-1-1/Observation et identification des signes d'appel dans le troupeau**

Dans les cas où le prélèvement de jus de rumen n'est pas possible, il convient de faire un bilan global des signes d'appel d'ARSA dans un troupeau. Ces signes sont divers et sont les conséquences cliniques de l'acidose.

##### **II-2-1-1-A/ Boiteries et fourbure**

L'observation de troubles locomoteurs en relation avec des affections du pied quels que soient leurs types peut orienter vers une suspicion d'ARSA dans un troupeau laitier. Un seuil de l'incidence des boiteries de 10% a été proposé. Les lésions observées sont une croissance anormale de la corne, des fissures de la muraille dans la région dorsale, des ulcères de la sole, des hémorragies de la sole [72].

#### II-2-1-1-B/ Observation des bouses

Des bouses jaunes à jaunâtres et très molles, avec de nombreux grains plus ou moins entiers font suspecter un apport trop grand de glucides rapidement fermentescibles. Des fibres entières de 1-2 cm évoquent plutôt un manque de digestibilité des fibres.

Le pH des bouses n'est pas informatif pour le diagnostic d'une acidose subaiguë [21].

#### II-2-1-1-C/ Rumination

Quel que soit le moment de la journée, 40 à 80% des vaches doivent être observées en train de ruminer. Cela donne une indication sur la fibrosité de la ration [21, 25].

#### II-2-1-1-D/ Tympanisme ruminal

Des vaches avec un rumen distendu, au contenu aérique suggèrent une baisse de la motilité du rumen et une production anormalement élevée de gaz et de mucopolysaccharides suite à la lyse des bactéries.

#### II-2-1-1-E/ Composition du lait

Les analyses de lait (données du contrôle laitier par exemple) à plusieurs dates consécutives doivent être examinées. Un TB individuel qui est faible (inférieur de 0,5% par rapport à la moyenne du troupeau) fait suspecter une ARSA, mais seulement après 30 jours de lactation car le TB dépend de beaucoup d'autres facteurs (notamment la présence d'un bilan énergétique négatif, qui provoque une augmentation du TB en début de lactation). Un ratio TB/TP inférieur à 1 est très évocateur d'ARSA [21, 71, 73].

Un taux butyreux moyen supérieur à 45 g/l et une moyenne du rapport TB/TP > 1,5 suggèrent fortement la présence d'un déficit énergétique. Cependant en début de lactation, d'autres phénomènes tels que l'ARSA peuvent modifier la composition du lait.

### II-2-1-1-F/ Autres signes

- Baisse générale d'appétit, baisse d'état corporel donc augmentation de la proportion en concentrés distribués qui entraîne une aggravation
- Abscesses sous cutanés ne pouvant être expliqués par des injections
- Taux de renouvellement du troupeau par an supérieur à 45%
- Taux d'euthanasie supérieur à 30%
- Hémoptysie, épistaxis [72]

### II-2-1-2/La mesure du pH ruminal

La diminution du pH est fortement corrélée à la concentration en propionate, butyrate et en AG à courte chaîne dans le rumen. Néanmoins, le propionate à lui seul explique 48% de la variation du pH. La concentration en propionate est le prédicateur essentiel du pH ruminal, mais sa mesure est moins facile à réaliser que celle du pH [25].

#### II-2-1-2-A/ La ruminocentèse

Le site est localisé 15-20 cm caudo-ventralement par rapport à la jonction costo-caudale de la dernière côte. Une zone de 7x7 cm est rasée et nettoyée. Une sédation de 20-25 mg de xylazine en IV est recommandée pour une vache de 450kg. L'entrave reste néanmoins indispensable. La queue doit être tenue [19, 71, 73]. L'aiguille est passée dans le tissu sous cutané et une pause est marquée. Quand l'animal reprend son calme, l'aiguille est introduite dans le rumen. La seringue est montée sur l'aiguille et un volume de 10-20 mL de jus de rumen est aspiré.

La mesure du pH est faite après avoir évacué l'air de la seringue.

Le pH doit être mesuré rapidement et préférentiellement avec un pH-mètre.

L'interprétation du pH est difficile.

Au dessus de 5,8, le pH est considéré comme normal, entre 5,6 et 5,8 il est critique, inférieur à 5,5, il est anormal [19] et confirme une ARSA.

### II-2-1-2-B/Le prélèvement à l'aide d'une sonde ruminale

La sonde ruminale lestée est une solution peu chère, mais la position de la sonde dans le rumen n'est pas maîtrisée.

Il suffit d'insérer le tube dans l'œsophage jusqu'au cardia et de pénétrer dans le rumen, la remontée du jus de rumen est facile. Cependant, cette technique a un gros inconvénient qui est la contamination du prélèvement par la salive, ce qui induit un biais dans la mesure de la valeur du pH.

Il existe des sondes dont l'une décrite par Enemark J.M.D. et al. [25], qui possède un clapet à l'extrémité entrant dans le rumen, qui n'est ouverte qu'une fois que la sonde a été introduite dans un sac ruminal. Ceci limiterait la contamination salivaire.

### II-2-1-2-C/Comparaison ruminocentèse - sonde ruminale

Les 2 techniques ont des inconvénients, et les seuils de pH mesurés sont différents selon la technique employée, cf. tableau 7.

**Tableau 7 : ruminocentèse / sonde oro-gastrique**

Technique	Inconvénients	Seuil de pH
<b>Ruminocentèse</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Caractère invasif : risque d'abcès, de péritonite, de baisse de forme. Nordlund K.V. rapporte 1-2% des animaux touchés sur 100 prélevés [19], tandis que sur 164 animaux, Kleen <i>et al.</i> rapportent 5,5% d'altération au site et 2% de vache dont l'état général est altéré [74]. En 2007, sur seulement 11 vaches, un rapport des conséquences cliniques mais aussi anatomopathologiques (une semaine après la ponction) avait montré 90% d'hématome en regard de la zone de ponction [75].</li><li>▪ Mauvaise réaction des animaux : certains ne peuvent pas être prélevés car la manipulation est dangereuse [74].</li></ul>	Si inférieur à 5,5 : positif Entre 5,5 et 5,8, le risque existe, zone marginale Supérieur ou égal à 5,8 : négatif [21, 71, 73, 75, 76, 77]
<b>Prélèvement par sonde ruminale</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Contamination du prélèvement par la salive, donc influence sur le pH : il faut éliminer les premiers 200 mL prélevés et faire faire la mesure sur les 200 mL suivants (différence de 0,1 unité pH entre les 2) [77] 9,9% des prélèvements sont contaminés [19].</li><li>▪ Site de prélèvement inconnu. D'après</li></ul>	Si inférieur à 5,9 : positif [20] Il y aurait une différence de 0,35 à 0,33 unité pH avec la technique de ruminocentèse [20]

	Duffield T. <i>et al.</i> , les mesures du pH obtenues sont corrélées aux sites central et crânio-dorsal du rumen prélevés par canule ce qui montre bien que la sonde ne pénètre pas correctement la couche fibreuse.	voire de 1,1 unité pH [19]. Un pH inférieur à 6 par ruminocentèse correspondrait à un pH de 6,67 si le fluide est collecté par sonde orale avec un clapet protecteur [25].
--	---	--

La technique de choix est donc la ruminocentèse [19, 25]. Il convient néanmoins de choisir et de prélever les animaux les plus calmes parmi ceux considérés à risque, ou bien de tranquilliser les animaux avant la mise en œuvre du prélèvement. Les mouvements de l'animal qui font bouger l'aiguille lorsque celle-ci est dans le rumen entraînent des lésions tissulaires [19].

### II-2-1-3/La flore ruminale

Un prélèvement de jus de rumen permet la réalisation d'autres tests pour évaluer l'activité de la flore ruminale.

*Le test au bleu de méthylène* : ajout de 12 ml de jus de rumen à 1 ml de bleu de méthylène à 0,03% : le temps de décoloration (retour à la couleur initiale) est observé.

**Tableau 8** : Interprétation du test de réduction au bleu de méthylène [70]

<b>Ration mixte</b>	Réduction en 3 minutes
<b>Ration riche en concentrés</b>	Réduction en 1 minute
<b>Ration riche en fourrage</b>	Réduction en 3 à 6 minutes
<b>Large anneau bleu persistant</b>	Inactivité biologique
<b>Persistance</b>	Plus de 15 minutes pour un pH <5,5 => acidose

*Mesure de l'activité cellulolytique* : un fil de coton attaché à une bille de plomb dans 10 ml de jus de rumen, à 39°C. Si au bout de 48h, la bille de plomb n'est pas au fond du tube, l'activité cellulolytique est insuffisante [70].

#### **II-2-1-4/Température du fluide ruminal**

Une étude canadienne réalisée en 2008 [78] rapporte que la température ruminale, augmentant lors d'ARSA, pourrait permettre de déterminer le pH ruminal et donc diagnostiquer l'ARSA. Cette étude n'est basée que sur 6 individus.

#### **II-2-2/ Etude de la prévalence de la cétose subclinique**

L'intérêt de déterminer la prévalence de la cétose subclinique est de connaître le risque de cétose clinique d'une part, et d'autre part d'expliquer très souvent pourquoi les capacités de production et de reproduction ne sont pas maximales [48].

##### **II-2-2-1/ Les différents tests disponibles au chevet de l'animal et leurs valeurs diagnostiques**

Le dosage le plus utilisé pour le diagnostic de la cétose est celui des corps cétoniques (acétone, acéto-acétate, ou BHB). La nature du prélèvement à utiliser est variable : sang, urine et lait. Certains tests ne sont pas commercialisés en France, mais existent dans d'autres pays. Selon la matrice utilisée et selon le test, la sensibilité et la spécificité sont très différentes.

La mesure des corps cétoniques peut se faire en routine pour un diagnostic individuel ou pour un diagnostic de troupeau.

La valeur maximale tolérée du BHB dans le sang a longtemps été fixée à 1,4 mmol/l, mais certains auteurs ont proposé d'abaisser cette limite à 1,2 mmol/l [79, 80].

Les variations diurnes de la concentration des corps cétoniques dans le sang sont très élevées et cela limite leur rôle d'indicateurs de la cétose subclinique [48].

Il faut noter que la mesure de la glycémie n'a pas grand intérêt. En effet, comme attendu, une vache hypercétonémique peut être hypoglycémique, mais ce n'est pas toujours le cas. La possibilité d'une glycémie normale chez des vaches hypercétonémiques existe comme pour la stéatose.

Concernant la cétose, la biopsie est peu recommandée, elle est plutôt utilisée lors de suspicion de stéatose. L'échographie du foie est également assez peu utile.

#### II-2-2-1-A/ Méthodes analytiques sur le sang

II-2-2-1-A-a/ Les différentes méthodes de mesure au laboratoire : chromatographie gazeuse, cinétique de réaction, spectrophotométrie et fluorométrie

Plusieurs techniques peuvent être utilisées pour doser les corps cétoniques dans le sang.

La méthode enzymatique a été décrite par Williamson et Mellandy en 1962 [48,81].

Cette méthode utilise la réaction incomplète :

$\text{BHB} + \text{NAD}^+ \rightleftharpoons \text{acetoacetate} + \text{NADH}, \text{H}^+$  (Réaction catalysée par la BHBDHase, et déplacée vers la gauche à un pH basique, ou vers la droite à un pH acide).

Cette réaction a donné lieu à plusieurs techniques de mesure des corps cétoniques comme l'actéto-acétate et le BHB, soit ensemble, soit séparément. Différents protocoles ont été décrits.

Le sang doit être conservé dans de la glace fondante. La BHBDHase provient le plus souvent de la bactérie *Rhodopseudomonas spheroides*, purifiée sur colonne.

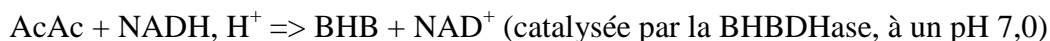
En 1977, Siegel L. et son équipe [82] rendent la réaction  $\text{BHB} + \text{NAD}^+ \Rightarrow \text{aceto-acétate} + \text{NADH}, \text{H}^+$  totale en ajoutant du  $\text{NAD}^+$  en grande quantité. Puis la réaction avec du butanone dilué entraîne la formation d'acétone dont la quantité est mesurée par chromatographie gazeuse. On obtient ainsi la concentration totale en corps cétoniques.

L'équipe de Hansen J.L. et Freier E.F. [83] a utilisé en 1978, un analyseur du type GEMSAEC Analyser System, Electro-nucleonics afin de déterminer les concentrations en lactate, pyruvate, BHB et acéto-acétate (cf. tableau en annexe 3)

A la suite de ces mélanges, l'analyseur opère à 30°C, en faisant une première lecture au bout de 10 secondes pour les deux corps cétoniques mesurés ensemble, et une deuxième à 40 secondes pour le BHB et à 60 secondes pour l'acéto-acétate. L'analyseur calcule ainsi les concentrations selon la cinétique de la réaction en établissant un ratio.

Néanmoins, lors de cette étude, il n'est fait aucune comparaison avec d'autres moyens de mesure, seul un essai clinique a été présenté, où cette méthode était appliquée.

D'autres chercheurs ont utilisé cette méthode (avec l'analyseur Multistat III) en associant la mesure de l'acéto-acétate et du BHB. En 1988, l'équipe de Nuwayhid et al [84] utilise le principe de réduction totale de l'acéto-acétate dans l'échantillon à doser. Pour cela, il fait réagir de la BHBDHase et du NADH en excès, ce qui entraîne une réaction complète :



Le BHB ainsi obtenu est égal au BHB endogène et à celui produit lors de la réaction (donc au BHB endogène et à l'acéto-acétate endogène). Le BHB est alors totalement réduit en acéto-acétate par la réaction inverse, dont la cinétique est mesurée.

Lors de cette réaction, une mesure de l'absorbance est réalisée toutes les 2 minutes à 340 nm. On obtient alors une cinétique avec plusieurs points (8 intervalles de 30s). La moyenne des variations d'absorbance donne la concentration de l'acéto-acétate selon un graphique de type linéaire. Et on obtient ainsi la concentration totale en BHB et en acéto-acétate endogènes. Dans cette étude, la concentration totale est comparée à l'addition des 2 concentrations mesurées par une autre méthode. Les résultats étaient très proches avec une variation de  $\pm 2\%$ . En 1989, la même équipe réitère l'expérience en mesurant en parallèle les concentrations combinées de lactate et de pyruvate [85,86].

Notons que cette méthode ne nécessite que 2µl de sang.

En 1982, Maughan R.J. [87] utilise la fluorimétrie, avec un volume de sang de 200 µl.

Il utilise la même réaction pour la mesure de BHB et d'acétoacétate, seul le pH du milieu de réaction diffère (pH 9,5 ou pH 7). Une incubation de 60 minutes est nécessaire. Pour l'oxydation du BHB, l'hydrazine est ajoutée pour qu'elle réagisse avec le corps cétonique formé, ce qui permet de rendre cette réaction totale, en présence d'un excès de  $\text{NAD}^+$ .

La mesure de la fluorescence à 340 nm traduit la concentration en  $\text{NADH}$ ,  $\text{H}^+$  et donc en BHB. Le témoin négatif n'a aucune fluorescence intrinsèque. Pour les échantillons étudiés, la comparaison de la courbe de fluorescence se fait avec des courbes standard afin de connaître la concentration de BHB dans l'échantillon.

Harano Y. *et al* [88] utilisent aussi une méthode par fluorimétrie en couplant l'acéto-acétate de l'échantillon à du fluoborate de nitrobenzène-diazonium. Ceci donne un composé hydrazoïque qui par réaction avec la soude, donne le sel de sodium d'un composé azoïque et dont l'absorbance est mesuré à 650 nm. Il obtient alors la concentration en acéto-acétate de l'échantillon. Le dosage de corps cétoniques totaux est alors fait par oxydation du BHB en



acéto-acétate dont la concentration totale est mesurée de la même manière que celle décrite ci-dessus.

On obtient alors la concentration en BHB de l'échantillon. La comparaison avec la méthode enzymatique de Williamson a pour résultat une corrélation de 0,99 pour les corps cétoniques totaux et pour le BHB.

#### II-2-1-1-A-b/ Mesure du BHB sanguin avec l'appareil portable Optium Xceed®

Le seul appareil de mesure des corps cétoniques dans le sang est l'appareil portable destiné à la surveillance de l'état acido-cétosique chez les personnes diabétiques en médecine humaine. Il mesure le BHB sanguin. Il utilise la réaction utilisée par Williamson en 1962, et applicable sur le sang bovin.

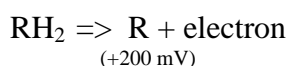
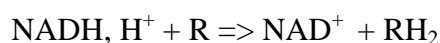
#### **Utilisation de l'instrument Optium® Xceed avec les bandelettes Optium® β-Cétone : description et évaluation de l'appareil**

L'évaluation de cet appareil a été faite par 4 hôpitaux. Les mesures de BHB réalisées à l'aide des bandelettes et de l'appareil portable ont été comparées à des mesures faites en laboratoire avec le Randox Ranbut assay kit (RB1007) (Randox Laboratories Ltd).

#### **Description de la méthode de mesure du BHB avec les bandelettes Optium® β-Cétone [89]**

La réaction utilisée est une réaction d'oxydoréduction. La BHBDHase, présente sur la bandelette, catalyse l'oxydation du BHB par le NAD en acétate. NAD accepte donc un électron et devient NADH. Un réactif médiateur réagit alors avec NADH, récupère l'électron. Il est donc réduit. Puis il est oxydé au contact de l'électrode au niveau de laquelle apparaît alors le courant électrique proportionnel à la quantité de BHB au départ.

##### Réactions d'oxydoréduction :



### **Etude de l'exactitude [89]**

Il s'agissait de la comparaison des mesures effectuées avec l'Optium® Xceed sur le sang (obtenu par piqûre au bout du doigt ou de la ponction de sang veineux) avec les mesures faites en laboratoire. Chaque échantillon était analysé 2 fois avec des bandelettes issues d'un même lot. Trois lots ont été testés et donc, il y avait 6 mesures faites avec les bandelettes pour chaque échantillon.

Une bonne corrélation a été trouvée entre les mesures effectuées en laboratoire et celles faites avec l'appareil portable. Le coefficient de corrélation était 0,98.

La moyenne du biais était de 0,1 mmol/l pour des échantillons avec une concentration inférieure à 1,5 mmol/l, et de 10% pour des concentrations supérieures à 1,5 mmol/l.

### **Etude de la précision [89]**

L'évaluation s'est faite à 5 niveaux de concentration de BHB dans le sang veineux. Trois lots de bandelettes ont été utilisés. La mesure à partir d'un échantillon de sang veineux hépariné a été répétée 20 fois successivement.

Pour les concentrations inférieures à 1,5 mmol/l, la déviation standard était de moins de 0,04 mmol/l en moyenne à travers les trois lots de bandelettes. Pour les concentrations supérieures à 1,5 mmol/l, le coefficient de variation était de 3,1 à 3,8% en moyenne quel que soit le lot de bandelettes.

### **Etude du volume de sang nécessaire [89]**

Le test était effectué en appliquant des volumes de 1,2, 1,5 et 2,5 µl de sang veineux à des concentrations de 0,5, 2,5 et 5 mmol/l. Ce test était fait sur trois lots de bandelettes. On a mesuré alors le biais par rapport au volume de contrôle de 5µl.

**Tableau 9 : Effet du volume de l'échantillon : moyenne de biais (mmol/l ou %) vs volume de contrôle de 5µl**

	Volume		
BHB, mmol/l	1,2µl	1,5 µl	5µl
0,5	Aucun déclenchement de l'appareil	0,01 mmol/l	0,02 mmol/l
2,5	Aucun déclenchement de l'appareil	1,8%	1,4%
5,0	Aucun déclenchement de l'appareil	0,4%	0,4%

### **Etude de l'effet de l'hématocrite [89]**

Trois lots de bandelettes ont été testés dans cette étude, avec 3 concentrations de BHB et 6 niveaux d'hématocrite. (30, 35, 40, 45, 55, 60%). Pour chaque lot, à chaque niveau de concentration de BHB, et chaque hématocrite, le biais moyen était inférieur ou égal à 0,06 mmol/l ou 24% par rapport à l'hématocrite de référence de 45%.

### **Etude des interférences avec d'autres substances [89]**

Cette partie de l'étude est particulièrement importante pour les essais de mesure du BHB dans le lait avec cet appareil.

Plus de 50 substances avec des concentrations normales ou à des concentrations thérapeutiques, 5 anticoagulants et pH différents ont été testés en suivant le même protocole que précédemment.

Dans cette étude, 24 substances et 2 sucres ont été testés.

Un échantillon de sang avec une concentration de 1 mmol/l de BHB est divisé en 2 aliquotes pour chaque test : une partie à laquelle est ajouté un volume d'une solution concentrée de la substance à tester, l'autre à laquelle est ajouté le même volume de solvant ayant servi à préparer la solution de la substance à tester.

26 expériences (26 substances) ont été réalisées pour chaque échantillon de sang. Une interférence est identifiée si la substance produit un biais de plus de 0,3 mmol/l et est confirmée par des tests de dose-réponse à des concentrations différentes de la substance interférente.

Ainsi, aucune des 26 substances testées, avec trois anticoagulants aux différents pH, n'interfère avec la mesure

Parmi celles-ci, quatre substances nous intéressent plus particulièrement : l'acide acétylsalicylique, l'acide lactique, l'acide pyruvique et l'acide urique qui sont testés à des concentrations différentes, et qui font varier le pH du sang testé (cf. tableau annexe 4).

Une solution de pH 2,93 ajoutée à l'échantillon de sang n'interfère pas avec la mesure du BHB dans le sang par l'appareil Optium® Xceed.

### **Réapplication de l'échantillon [89]**

La réapplication de sang après un premier dépôt insuffisant en volume est possible et n'interfère pas avec la mesure si elle est faite avant 30 secondes.

### **Effet de l'altitude [89]**

Des mesures sont faites avec trois lots de bandelettes à 0 et à 3048 mètres d'altitude, avec différentes concentrations de BHB dans le sang. La différence moyenne entre la valeur donnée par le test avec la bandelette et la valeur de contrôle est de moins de 4,5%.

#### **II-2-1-1-B/ Tests réalisables sur l'urine**

Le dosage semi-quantitatif des corps cétoniques dans l'urine est possible avec des tests utilisables sur le terrain.

La méthode la plus courante est la réaction avec le nitroprussiate de sodium (associé à de la glycine, du dissodium phosphate et à du lactose). C'est le réactif qui est couramment utilisé sur les bandelettes urinaires (ex : Multistix SG 8®, Bayer) et sur des bandelettes urinaires ne mesurant que les corps cétoniques : Acetest®, Bayer ; Ketostix strip®, Bayer ; Utrecht powder®, University of Utrecht, Utrecht, Pays Bas. Cette réaction détecte seulement l'acéto-acétate dans les urines, voire l'acétone. C'est un test semi quantitatif [38, 57, 90]. Le problème de ce type de test est sa faible spécificité.

Un autre test, utilisé à l'origine pour la mesure du BHB dans le lait, a été évalué par certains auteurs sur l'urine, malgré l'absence de recommandations pour cette matrice. Ce test est connu sous différents noms : Keto Test® (Elanco Animal Health, Canada), Ketolac® BHBA (Hoechst, Germany) ou Sanketopaper® (Sanwa Kagaku Kenkyusho Co., Ltd, Nagoya, Japan) [38].

Ce test fait intervenir une réaction enzymatique colorimétrique, basée sur la conversion de BHB en acéto-acétate par la BHBDHase. Une échelle de couleurs permet de déterminer des concentrations de BHB dans les urines de 0, 50, 100, 200, 500, 1000  $\mu\text{mol/l}$ . La détection de BHB dans l'urine a été interprétée comme un résultat positif, quelle que soit la concentration mesurée.

La spécificité est aussi un point faible de ce type de test réalisé à partir de l'urine.

La spécificité et la sensibilité de chaque test urinaire sont présentées dans le tableau 10.

**Tableau 10** : Sensibilité et spécificité des tests urinaires par comparaison avec le dosage du BHB sanguin [38, 80, 90]

Test /études	Limite BHB sanguin $\mu\text{mol/l}$	Nombre d'élevages testés	% cétose	Nombre d'échantillons	Sensibilité	Spécificité
<b>Acetest tablet®</b> (Nielsen <i>et al.</i> , 1994)	1400	18	11,3	124	<b>100%</b>	<b>59%</b>
	1200	18	17	124	<b>91%</b>	<b>61%</b>
<b>Ketostix® <math>\geq</math> trace 5 mg/dl d'acéto-acétate</b> (Carrier <i>et al.</i> , 2004)	1400	1	7	741	<b>90%</b>	<b>86%</b>
	(Oetzel, 2004) 1400	6	12	83	<b>90%</b>	<b>75%</b>
<b>Ketostix® <math>\geq</math> faible 15 mg/dl d'acéto-acétate</b> (Carrier <i>et al.</i> , 2004)	1400	1	7	741	<b>78%</b>	<b>96%</b>
	(Oetzel, 2004) 1400	6	12	83	<b>80%</b>	<b>92%</b>
<b>Ketostix® <math>\geq</math> modérée 40 mg/dl d'acéto-acétate</b> (Carrier <i>et al.</i> , 2004)	1400	1	7	741	<b>49%</b>	<b>99%</b>
	(Oetzel, 2004) 1400	6	12	83	<b>70%</b>	<b>97%</b>
<b>Ketostix® <math>\geq</math> augmenté 80 mg/dl d'acéto-acétate</b> (Carrier <i>et al.</i> , 2004)	140	1	7	741	<b>12%</b>	<b>100%</b>
<b>Ketostix® <math>\geq</math> très augmenté 160 mg/dl d'acéto-acétate</b> (Carrier <i>et al.</i> , 2004)	1400	1	7	741	<b>4%</b>	<b>100%</b>
<b>Keto Test®</b> (Carrier <i>et al.</i> , 2004)	1400	1	18,2	159	<b>97%</b>	<b>60%</b>

Le test Ketostix® est un test au nitroprussiate pour lequel on observe à la fois une relativement bonne spécificité, en même temps qu'une bonne sensibilité comparé à la mesure sanguine de BHB (avec une limite de 1400 µmol/l). Il mesure uniquement l'acéto-acétate [90].

Remarque : le fabricant de Ketostix® recommande de lire la bandelette au bout de 15 secondes. Dans l'expérience de Carrier *et al.*, 2004 [90], cette lecture est faite au bout de 5 à 10 secondes seulement, et c'est dans cette expérience que l'on observe la meilleure spécificité. En effet, Carrier *et al.* [90] observent que la bandelette trempée dans les urines noircit très rapidement à la lumière, ce qui est à l'origine de la faible spécificité du test observé dans les autres expériences où les auteurs réalisaient la lecture au bout de 15 secondes.

#### II-2-2-1-C/ Tests réalisables sur le lait

Dans le lait, la concentration en BHB est plus faible que dans le sang et la limite inférieure a été fixée à 100 µmol/l, voire 70 µmol/l (pour un test individuel) ; pour un suivi en élevage, la valeur limite dépend du test utilisé (cf. infra) [79, 91, 92].

Les variations diurnes de la concentration en BHB dans le lait sont beaucoup moins marquées que dans le sang, d'où l'intérêt de doser cette molécule dans le lait. Le deuxième intérêt est la facilité d'obtention du prélèvement comparée à un prélèvement de sang [46, 92].

La limite inférieure de la concentration de l'acéto-acétate dans le lait est de 100 µmol/l pour les tests au nitroprussiate de soude [46, 91].

La limite inférieure de la concentration en acétone dans le lait est de 400 µmol/l [93] ; au dessus de cette valeur, on considère qu'il y a une cétose. En effet, 400 µmol/l d'acétone dans le lait correspondraient à une concentration de 1500 µmol/l de BHB dans le sang (correspondant à une cétose subclinique). Dans le lait, une concentration de 700 µmol/l d'acétone correspond à 2700 µmol/l de BHB dans le sang (cétose clinique) [46, 92].

Des tests au nitroprussiate de sodium sont également utilisables sur le lait, et permettent la détection de l'acéto-acétate et de l'acétone : Ketocheck powder® (Great States St Joseph), Bioketone powder® (Société d'analyses biopharmaceutiques, Laval, QC, Canada), Utrecht

powder®(University of Utrecht, Utrecht, Pays Bas), Pink test liquid® (profs.products.com, Germany), Rapignost®(Behring, Germany), Uriscan® ( Heiland, Germany) [38, 79, 91, 92].

De nombreux auteurs ont évalué plusieurs tests au nitroprussiate sur du lait de façon à connaître la spécificité et la sensibilité.

Dans la plupart des cas, les tests au nitroprussiate réalisés sur le lait ont une faible sensibilité (cf. tableau 11).

**Tableau 11** : Sensibilité et spécificité des tests au nitroprussiate à partir du lait par comparaison avec la valeur du BHB sanguin [38, 80, 90, 91, 92]

Test /études	Limite BHB sanguin μmol/l	Nombre d'élevages testés	% cétose	Nombre d'échantillons	Sensibilité	Spécificité
<b>Utrecht powder®</b> (Nielen <i>et al.</i> 1994)	1400 1200	18 18	10,3 14	185 185	<b>89%</b> <b>73%</b>	<b>96%</b> <b>98%</b>
(Geishauser <i>et al.</i> 1998)	1200	25	16,4	529	<b>43%</b>	<b>100%</b>
<b>Ketochek powder®</b> (≥trace) (Geishauser <i>et al.</i> 1998)	1200	25	16,4	529	<b>28%</b>	<b>100%</b>
(Carrier <i>et al.</i> , 2004)	1400	1	7,5	878	<b>42%</b>	<b>99%</b>
<b>Bioketone powder®</b> (≥trace) (Geishauser <i>et al.</i> 1998)	1200	25	16,4	529	<b>33%</b>	<b>100%</b>
<b>Pink test®</b> (Geishauser <i>et al.</i> 2000)						
≥ 100 μmol/l d'acéto acétate	1400	21	12	469	<b>76%</b>	<b>93%</b>
≥ 300 μmol/l d'acéto acétate	1400	21	12	469	<b>38%</b>	<b>98%</b>
<b>Uriscan®</b> ≥ 500 μmol/l d'acéto acétate (Geishauser <i>et al.</i> 2000)	1400	21	12	469	<b>13%</b>	<b>100%</b>
<b>Rapignost ®</b> ≥ 500 μmol/l d'acéto acétate (Geishauser <i>et al.</i> 2000)	1400	21	12	469	<b>3%</b>	<b>100%</b>
<b>Ketostix ®</b> (Geishauser <i>et al.</i> 1998)	1200	25	16,4	529	<b>4,6%</b>	<b>100%</b>

On constate que la sensibilité (76%) et la spécificité (93%) du Pink test® est meilleure que celle des autres tests (gold standard : 1400μmol/l de sang, résultat ≥100μmol/l). Tous les autres tests montrent une faible sensibilité lorsqu'ils sont utilisés sur du lait.

Les tests mettant en jeu une réaction enzymatique avec la BHBDHase ont été évalués avec le lait également : Keto Test® (Elanco Animal Health, Canada), Ketolac® BHBA (Hoechst, Germany) ou Sanketopaper® (Sanwa Kagaku Kenkyusho Co., Ltd, Nagoya, Japan)

[38] (cf. paragraphe précédent). Ce sont actuellement les tests les plus prometteurs pour l'évaluation de la cétose subclinique à partir du lait.

De nombreux auteurs ont évalué la spécificité et la sensibilité de ces tests, en faisant varier le gold standard utilisé pour mesurer le BHB dans le sang et la concentration détectée par le test à partir de laquelle le résultat est considéré comme positif (vache atteinte de cétose subclinique). Ces tests sont semi quantitatifs. L'échelle des valeurs détectées est la suivante : 0, 50, 100, 200, 500, 1000 $\mu$ mol/l [94].

**Tableau 12** : Sensibilité et spécificité des tests Ketolac® ou Keto Test® sur le lait, comparés au BHB sanguin [38, 79, 92]

Test /études	Limite BHB sanguin $\mu$ mol/l	Nombre d'élevages testés	% cétose	Nombre d'échantillons	Sensibilité	Spécificité
<b><math>\geq 50 \mu\text{mol/l}</math></b> (Geishauser <i>et al.</i> , 2000)	1400	21	11,9	469	<b>91%</b>	<b>56%</b>
(Geishauser <i>et al.</i> , 1998)	1200	25	16,4	529	<b>92%</b>	<b>55%</b>
(Carrier <i>et al.</i> , 2003)	1400	1	7,6	883	<b>88%</b>	<b>88%</b>
(Oetzel, 2004)	1400	17	17,2	221	<b>89%</b>	<b>80%</b>
<b><math>\geq 100 \mu\text{mol/l}</math></b> (Geishauser <i>et al.</i> , 2000)	1400	21	11,9	469	<b>80%</b>	<b>76%</b>
(Enjalbert <i>et al.</i> , 2001)	1200	-	19,2	125	<b>96%</b>	<b>63%</b>
(Carrier <i>et al.</i> , 2004)	1400	1	7,6	883	<b>73%</b>	<b>96%</b>
(Oetzel, 2004)	1400	17	17,2	221	<b>87%</b>	<b>83%</b>
(Jorritsma <i>et al.</i> , 1998)	1400	8	8,4	190	<b>88%</b>	<b>82%</b>
(Duffield <i>et al.</i> , 2003)	1400	5	27,2	235	<b>81%</b>	<b>63%</b>
(Geishauser <i>et al.</i> , 1998)	1200	25	16,4	529	<b>72%</b>	<b>89%</b>
<b><math>\geq 200 \mu\text{mol/l}</math></b> (Geishauser <i>et al.</i> , 2000)	1400	21	11,9	469	<b>59%</b>	<b>90%</b>
(Carrier <i>et al.</i> , 2004)	1400	1	7,6	883	<b>27%</b>	<b>99%</b>
(Oetzel, 2004)	1400	17	17,2	221	<b>45%</b>	<b>97%</b>
(Jorritsma <i>et al.</i> , 1998)	1400	8	8,4	190	<b>75%</b>	<b>92%</b>
(Duffield <i>et al.</i> , 2003)	1400	5	27,2	235	<b>73%</b>	<b>83%</b>
(Geishauser <i>et al.</i> , 1998)	1200	25	16,4	529	<b>45%</b>	<b>97%</b>



Les valeurs du test obtenues ne sont pas les mêmes selon les auteurs, voire totalement différentes en partie à cause du nombre de mesures réalisées et de prévalences variables.

**Tableau 13** : Sensibilité et spécificité des tests Ketolac® ou Keto Test® sur le lait calculées sur le pool d'animaux des différentes études (avec un gold standard de BHB sanguin de 1400 µmol/l)

Pool	% cétose	Nombre d'échantillons	VP	FN	FP	VN	Sensibilité	Spécificité
<u>≥50 µmol/l</u>	10	1573	144	17	318	1094	<b>89%</b>	<b>77%</b>
<u>≥100 µmol/l</u>	12,05	1998	194	47	280	1477	<b>80%</b>	<b>84%</b>
<u>≥200 µmol/l</u>	12,05	1998	129	112	100	1657	<b>54%</b>	<b>94%</b>

On arrive à des prévalences moyennes de cétose proches de la prévalence moyenne rapportée par certains auteurs.

**Tableau 14** : Valeurs prédictives des tests Ketolac® ou Keto Test® sur le lait calculées sur la totalité des animaux des différentes études (avec une référence du BHB sanguin de 1400 µmol/l)

Pool	VPP	VPN	% cétose
<u>≥50 µmol/l</u>	31,2%	98,5%	10
<u>≥100 µmol/l</u>	41%	97%	12,05
<u>≥200 µmol/l</u>	<b>56%</b>	<b>94%</b>	<b>12,05</b>

Finalement, Geishauser *et al.* déterminent en 2000 la probabilité d'avoir un test positif avec Pink Test® ou avec Ketolac BHB® lorsqu'une vache est en hypercétonémie [91] (cf. tableau 15).

**Tableau 15** : Probabilité d'un test positif pour les différents niveaux de résultats du Pink Test® et du Ketolac BHB® [91]

Test	Niveau (µmol/l)	Taux de probabilités
PINK TEST®	0	0,3
	<b>100</b>	<b>6,3</b>
	300	15
	500	75
KETOLAC BHB®	0	0,2
	50	0,6
	<b>100</b>	<b>1,5</b>
	<b>200</b>	<b>3,7</b>
	500	21
	1000	38

Un résultat supérieur ou égal à 100 µmol/l avec le Pink Test® a 6 fois plus de chance de provenir d'une vache en cétose subclinique que d'être issu d'une vache qui n'est pas en cétose. La valeur minimale de 100 µmol/l d'acéto-acétate pour ce test réalisé à partir du lait peut être retenue, pour identifier une cétose subclinique [91].

Pour Ketolac® BHB, un résultat supérieur ou égal à 200 µmol/l a 4 fois plus de chance de provenir d'une vache hypercétonémique que d'une vache qui n'est pas en cétose. C'est le seuil de 200 µmol/l que retient l'auteur pour le diagnostic de la cétose subclinique pour ce test, dans le cadre d'un suivi d'élevage.

En diminuant le seuil de positivité à 100 ou 50 µmol/l de BHB estimé avec Ketolac® BHB, on diminue la spécificité et on peut même atteindre 50% de faux positifs [91].

Augmenter le seuil de positivité conduit dans les deux cas à une diminution de la sensibilité.

En 2001, Enjalbert et al. [79] mesurent les trois corps cétoniques dans le lait.

La concentration en acétone est déterminée à pH neutre par chromatographie gaz-liquide.

La concentration en acéto-acétate est mesurée quantitativement par une méthode enzymatique.

Le BHB est à la fois déterminé quantitativement par une méthode enzymatique (kit colorimétrique) et de façon semi quantitative par le test Ketolac® BHB. Le seuil de BHB dans le sang est fixé à 1200 µmol/l.

Enjalbert a défini alors des seuils pour chaque test, en privilégiant la sensibilité (>90%) par rapport à la spécificité (coût économique d'un faux négatif plus important).

Il montre ainsi que le seuil à choisir pour le test Ketolac® est de 100-199 µmol/l (sensibilité : 95,8%, spécificité : 63,4%, cf. figure 28), avec une valeur seuil de 70 µmol/l de BHB dans le lait (sensibilité : 91,7%, sensibilité : 64,4%).

#### II-2-2-1-D/ Relation entre les concentrations en corps cétoniques dans le lait et dans le sang

En 2001, Enjalbert et al. [79] étudient les corrélations et les relations entre les concentrations des corps cétoniques dans différents milieux biologiques.

Les concentrations en acéto-acétate et acétone dans le sang sont fortement corrélées ( $r=0,8$ ).

La corrélation entre le BHB dans le sang et l'acéto-acétate dans le sang est de 0,71 ; il s'agit d'une corrélation forte, et voisine de celle observée par Kauppinen [95] en 1983 ( $r=0,869$ ), alors que ce dernier avait analysé le sang de la veine mammaire et non celui de la veine caudale.

Aucune variation du rapport Acéto-acétate/BHB n'est observable, que les vaches soient hypercétonémiques ou non. En 1979, Filar avait pourtant indiqué qu'il existait une augmentation de ce rapport de 0,08 à 0,14 chez les vaches en hypercétonémie, mais cette observation n'a pas été confirmée.

Dans la mitochondrie, lors de cétose, le rapport NADH/NAD augmente, mais il diminue dans le cytosol où se fait la transformation du BHB en acéto-acétate, d'où un rapport Acéto-acétate/BHB qui augmente (la réaction étant :  $\text{AcAc} + \text{NADH}, \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{BHB} + \text{NAD}^+$ ).

Les corps cétoniques ont une concentration différente selon qu'ils se trouvent dans le sang ou dans le lait. Les corrélations données par Enjalbert et al. [79] sont les suivantes :

**Tableau 16** : Coefficients de corrélation entre les concentrations en corps cétoniques dans le lait et le sang [79]

	Sang			Lait		
	Acétone	Acétoacétate	BHB	Acétone	Acétoacétate	BHB
<b>Sang</b>						
Acétone	1					
Acétoacétate	0,8	1				
BHB	0,53	0,71	1			
<b>Lait</b>						
Acétone	<u>0,96</u>	0,77	0,58	1		
Acétoacétate	0,74	<u>0,74</u>	0,62	0,75	1	
BHB	0,65	0,65	<u>0,66</u>	0,68	0,72	1

La corrélation observée entre le BHB dans le sang et dans le lait est de 0,66. Différentes études ont montré un coefficient de corrélation très variable, compris entre 0 et 0,87 selon les auteurs [79, 96].

Le rapport [BHB dans le lait]/ [BHB dans le sang] est de 0,12 dans les essais d'Enjalbert [79], et Anderson en 1984 avait trouvé un rapport très proche : 0,13.

Le meilleur test reste la mesure quantitative du BHB dans le sang, ou dans le sérum, pour le diagnostic de troupeau de la cétose subclinique.

Les données décrites précédemment montrent bien que les tests sur l'urine et le lait, du fait de leur manque de spécificité ou de sensibilité, respectivement, ne permettent pas une évaluation de la prévalence de la cétose subclinique dans un élevage.

### **II-3/ Choix des d'animaux, détermination du nombre d'animaux à prélever et interprétation des résultats selon les critères choisis**

#### **II-3-1/ Interprétation des résultats des tests diagnostiques [38,34]**

Deux approches interprétatives des résultats des différents tests présentés précédemment sont possibles :

- en prenant en compte la proportion de vaches d'un lot au-dessus ou en-dessous d'un seuil donné. Cette proportion doit elle-même être inférieure à un certain seuil.
- en considérant la moyenne des différents résultats du test, et en comparant cette moyenne à un seuil donné.

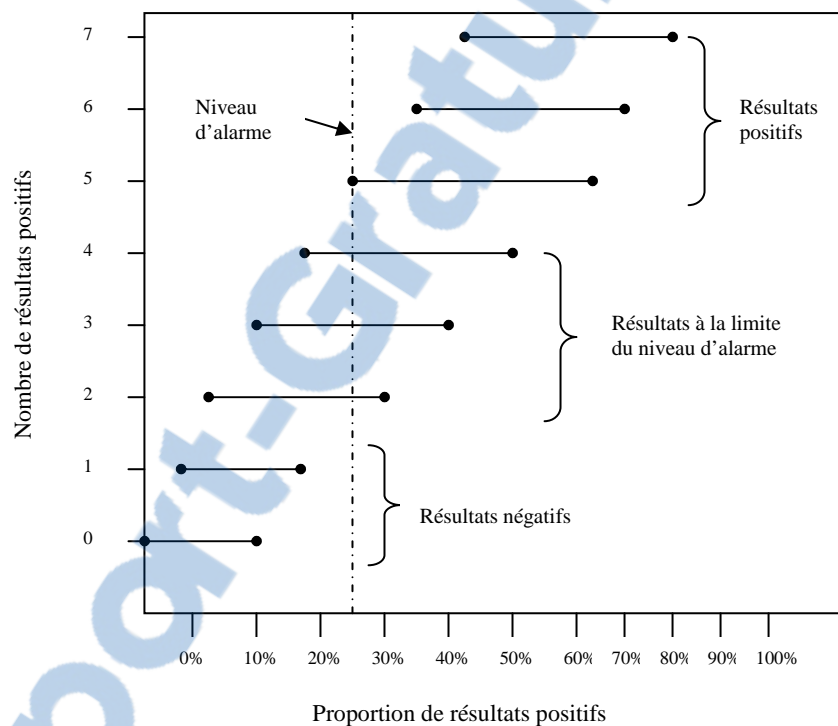
Selon les maladies étudiées et les tests utilisés, l'une ou l'autre des 2 méthodes est plus appropriée. Ces méthodes sont énoncées dans le tableau II-3-1-2 (cf. infra).

A l'échelle individuelle, l'intervalle de confiance choisi pour un test diagnostique est le plus souvent 95 %. Mais ce n'est pas le cas pour les diagnostics à l'échelle du troupeau. L'intervalle de confiance choisi est de 75%, car en plus du test, les cliniciens disposent d'autres éléments cliniques que les résultats du test pour prendre une décision [34].

Un nombre de 12 animaux au sein d'un groupe « à risque » est proposé. Dans certains cas, ce nombre peut être réduit à 8 [34] (cf. infra).

Dans les petits élevages, le nombre de 8 ou 12 vaches à prélever est quelquefois difficilement atteignable. Dans ce cas, il faut échelonner les prélèvements, et les réaliser chaque fois qu'il y a des vaches au stade physiologique à considérer [34].

**Figure 13** : Exemple d'interprétation des résultats [34] : Interprétation de la mesure du pH ruminal sur 12 bovins d'un groupe de 100, avec un niveau d'alarme fixé à 25% (intervalle de confiance de 75%)



Le nombre de vaches à prélever doit être augmenté si les problèmes cliniques sont discrets et si le résultat obtenu est à la limite du niveau d'alarme. Il doit toujours être confronté aux observations cliniques, d'autant plus si le niveau d'alarme est proche de la limite fixée.

**II-3-2/ Tableau 17 : Récapitulatif des tests et indicateurs diagnostiques des maladies métaboliques de production**

Maladie explorée	Tests réalisés/indicateurs	Animaux à tester	Nombre d'animaux du lot	Seuil du test	Niveau d'alarme	Stratégie à mettre en place
<b>Stéatose</b>	<i>Mesure de la concentration en AGNE dans le sang</i>	De 14 jours avant la mise bas à 6 jours après la mise bas	12 vaches minimum	Avant la mise bas : <0,4 mmol/l Après la mise bas : <0,7 mmol/l	Plus de 10% des animaux au dessus du seuil	Alimentation des taries à revoir (trop énergétique), durée du tarissement trop important...
<b>Hypocalcémie</b>	<i>Mesure du pH urinaire</i>	Entre 48h et 24h avant la mise bas pour les vaches ayant eu une ration anionique depuis plus de 24h ou celles qui n'en ont pas	8 vaches minimum	pH urinaire entre 6 et 7	La moyenne des 8 ou plus pH n'est pas comprise entre 6 et 7	-Si >7 : Alimentation des vaches en fin de tarissement spécifique : instauration d'un BACA faible dans l'alimentation, voire ajout de sels anioniques
	<i>Mesure de la calcémie</i>	12-24 h après mise bas Eviter les primipares dont le risque est moindre	12 vaches minimum	Calcium total > 2 mmol/l Calcium ionisé >1 mmol/l	Plus de 30% de vaches en hypocalcémie	Ration de fin de tarissement peu riche en calcium -Si <6 : BACA de l'alimentation trop faible, risque d'acidose métabolique.
<b>Cétose subclinique</b>	<i>Mesure de la concentration en BHB dans le sang</i>	De la 2 <sup>ème</sup> à la 6 <sup>ème</sup> semaine après la mise bas	12 vaches minimum	1200 µmol/l, ou 1400 µmol/l selon les auteurs	Plus de 10% des animaux sont au dessus du seuil de concentration	Besoins énergétiques supérieurs aux apports de la ration, vaches vêlant avec trop peu ou trop d'état...
<b>Acidose ruminale subaiguë</b>	<i>Ruminocentèse et mesure du pH ruminal</i>	2 lots de vaches : un en début et en milieu de lactation (au pic de lactation)	8 vaches minimum Calmes	pH ruminiaux ≤5,5	Plus de 25% des animaux en dessous du seuil	Transition alimentaire brutale, manque de fibrosité dans la ration, grain trop broyé...
	<i>TB et TP</i>	Après 30 jours post partum	Tout le troupeau (document contrôle laitier sur plusieurs mois)	TB/TP <1	Moyenne des TB/moyenne des TP < 1,2	Apport très important de glucides facilement fermentescibles
	<i>Présence de fourbures</i>	Toutes les vaches, car différée par rapport à l'épisode d'acidose	Tout le troupeau	Présence de lésions du pied +/- boiterie	>10%	Episode antérieur d'acidose subaiguë chronique
	<i>Temps de rumination</i>	2 lots de vaches : 1 en début et 1 en milieu de lactation (au pic de lactation)	Tous les animaux des deux lots	Rumination vs non rumination à un instant t	Moins de 40% des vaches observées ruminent	Défaut de fibrosité de la ration

## **Partie III : Etude de la mesure du BHB dans le lait avec l'appareil portable Optium Xceed®**

### **III-1/But de l'expérience**

Comme nous l'avons vu précédemment, les tests disponibles pour identifier la présence de corps cétoniques dans le lait ont une sensibilité insuffisante pour la détection de la cétose subclinique (excepté Ketolac BHB® dont les valeurs diagnostiques sont plus élevées, mais ce test n'est pas disponible en France).

Le lait est facile à prélever chez la vache laitière, comparé au sang et à l'urine ; des prélèvements systématiques sont déjà réalisés tous les mois pour la mesure de la concentration des cellules dans le lait. En outre, dans les élevages qui utilisent un automate de traite, ces analyses peuvent être réalisées à l'aide d'un compteur directement connecté au circuit de collecte du lait. Il est possible d'imaginer que, dans le futur, d'autres équipements puissent être utilisés pour détecter des anomalies de la composition du lait. Il manque cependant beaucoup d'informations avant que cette approche, notamment pour le diagnostic de la cétose, soit possible.

Par ailleurs, le lait possède certains avantages par rapport aux autres milieux. Par exemple, les variations de la concentration des corps cétoniques dans le lait sont moindres par rapport à celles du sang. Le lait permet donc de s'affranchir, en partie des variations diurnes de la concentration dans le sang.

Les objectifs de l'essai que nous avons réalisé était i) d'évaluer la possibilité d'utiliser l'appareil portable Optium Xceed® pour la mesure quantitative de la concentration du BHB dans le lait, et ii) de tester les performances de cet appareil pour cette mesure dans le lait. Cette technique d'analyse a été appliquée à des échantillons de lait individuels obtenus à partir de cas cliniques, mais aussi d'échantillons prélevés chez des vaches de deux troupeaux laitiers, dans le cadre d'un suivi réalisé par l'ENVT.

Les mesures obtenues avec l'appareil ayant été cohérentes, nous avons cherché à déterminer s'il était possible d'utiliser cette technique de dosage pour évaluer la prévalence de la cétose subclinique au sein d'un élevage.

## **III-2/Matériel et méthodes**

### **III-2-1/ Description des animaux**

#### **Critères d'inclusion**

Quatre-vingt huit vaches ont été incluses dans cette étude. Un tableau récapitulatif des prélèvements réalisés pour cette étude est présenté en annexe 5.

Vingt et une vaches faisaient partie des bovins hospitalisés de septembre 2007 à février 2008 à la Clinique bovine de l'Ecole vétérinaire de Toulouse. Deux vaches ont été ajoutées à ce groupe, alors qu'elles avaient été prélevées à l'occasion de visites dans des élevages de Moselle. Ces 2 dernières vaches sont désignées PH1 et PH2.

Pour les autres prélèvements, il s'agit de 52 vaches issues d'un élevage laitier du Tarn, (désigné ci-après élevage 1), et de 13 vaches qui proviennent d'un deuxième élevage laitier de Haute-Garonne, (désigné élevage 2). .

L'élevage 1 et l'élevage 2 faisaient l'objet d'un suivi de reproduction par l'ENVT. Les visites ont eu lieu tous les mois de septembre 2007 à février 2008.

L'expérience repose sur l'utilisation de 89 échantillons, une vache de la clinique bovine ayant été prélevée 2 fois, à 10 jours d'intervalle.

#### **Critères d'exclusion**

Seuls 86 échantillons ont été exploités pour l'étude de la mesure du BHB dans le lait avec l'appareil Optium Xceed ® du fait de l'absence de prélèvement de lait sur certaines vaches qui venaient d'être traites.

#### **Facteurs de risque de cétose**

Nous avons recensé l'ensemble des informations relatives aux facteurs de risque de la cétose subclinique d'après Nielsen, et qui étaient disponibles pour les vaches recrutées [52].



### Rang de lactation

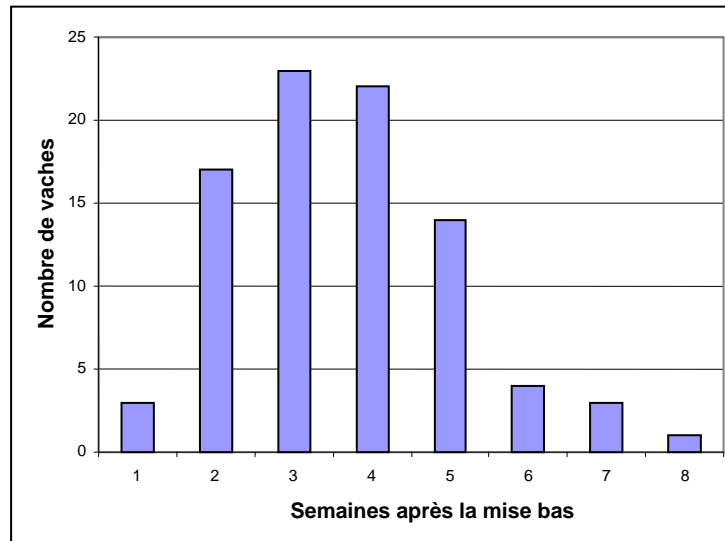
La figure 14 présente la distribution du rang de lactation. La moyenne des rangs de lactation était de 3,19 ( $\pm 2,08$ ). Le numéro de lactation de trois vaches n'est pas connu.



**Figure 14** : Distribution du rang de lactation

### Intervalle mise bas-prélèvement

Les vaches ont été choisies en fonction du nombre de jours de lactation. Elles ont été prélevées entre 3 et 50 jours après la mise bas, car cet intervalle correspond à la période où le risque de cétose est maximal. La moyenne des intervalles entre la mise bas et le jour du prélèvement est de 22,77 ( $\pm 10$ ) jours. Cette distribution est présentée à la figure 15. Pour 2 vaches, la date de vêlage n'était pas connue précisément ; elles n'ont pas été incluses.



**Figure 15 : Répartition des intervalles mise bas-prélèvement**

Les échantillons prélevés entre la 2ème et la 5ème semaine de lactation soit entre le 7e et le 35e jour de lactation environ, représentent 87% des échantillons. Cet intervalle correspond au moment où la cétose est la plus fréquente ; ces valeurs valident la pertinence de l'échantillonnage réalisé.

### **III-2-2/Facteurs de risque de cétose et maladies post-partum**

Certaines vaches incluses dans l'étude avaient ou (avaient eu) une ou plusieurs maladies du post-partum, en particulier les vaches hospitalisées à la clinique bovine de l'ENVT. Ces maladies ont été répertoriées dans le tableau en annexe 5.

Le tableau 19 résume l'ensemble des maladies observées avant ou après le prélèvement. De même, les facteurs de risque de cétose ont été évalués pour chaque vache qui a fait l'objet d'un prélèvement dans les élevages en suivi. Ces maladies sont, pour certaines des facteurs de risque de cétose, d'autres sont considérées comme des affections favorisées par la cétose. Pour certaines vaches, plusieurs facteurs de risque et/ou maladies étaient présents.

**Tableau 18 : Nature et fréquence des facteurs de risque de cétose et des différentes pathologies post-partum**

Facteurs de risque et maladie post-partum	Nombre de vaches atteintes
DCG	8
$\geq 3$ à la MB	6
Perte d'état de 0,5 points après la MB	5
Suspicion DC	4
Métrite	4
DCD	3
Mammite	3
MB difficile+ jumeaux	3
Rétention placentaire	3
Production +++	2
Fièvre de lait	1
Stéatose	1

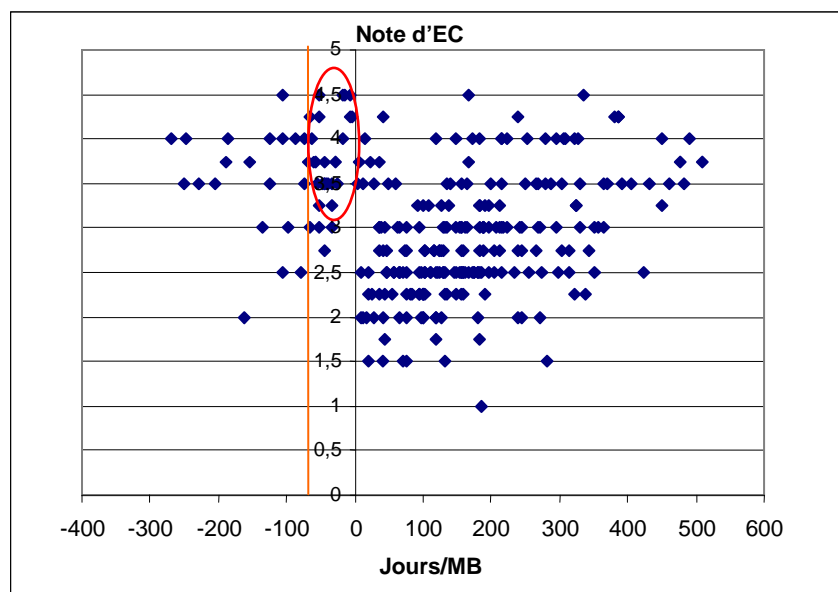
### **Note d'état corporel (élevage #2 seulement)**

Un autre facteur de risque a été pris en compte lors de cette étude : la note d'état corporel. Ce paramètre a été précisément enregistré et étudié pour les vaches de l'élevage #2. Les notes d'état corporel rapporté pour l'ensemble de l'élevage sont présentées en fonction du nombre de jours par rapport à la mise bas (cf. figure 16).

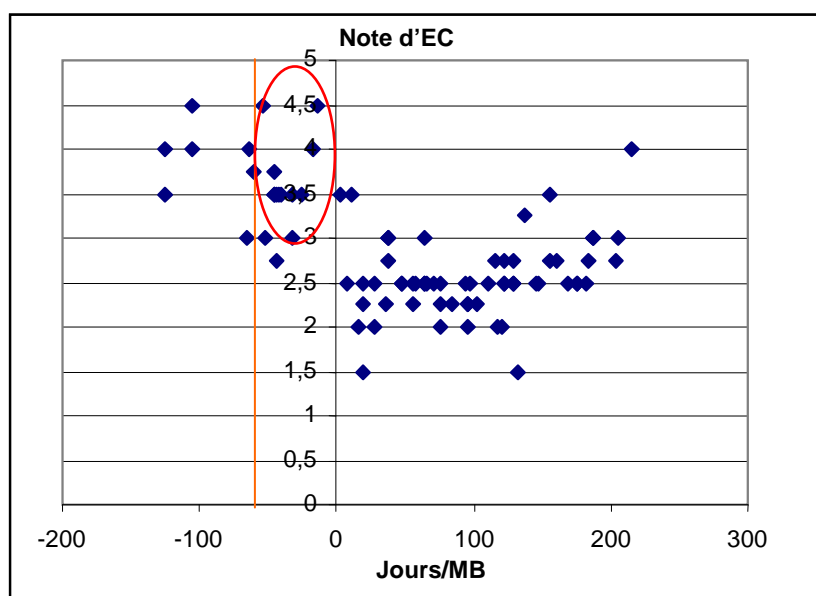
Cette répartition fait apparaître des notes d'état corporel qui sont pour la plupart supérieures à 3 dans la période de 60 jours qui précède la mise bas ; cet excès d'embonpoint des vaches tarées est un facteur qui favorise l'apparition de la cétose de type I et de type II après la mise bas.

Dans cet élevage, seules 13 vaches ont été prélevées. L'évolution de l'état corporel de ces 13 vaches est présentée dans la figure 17.

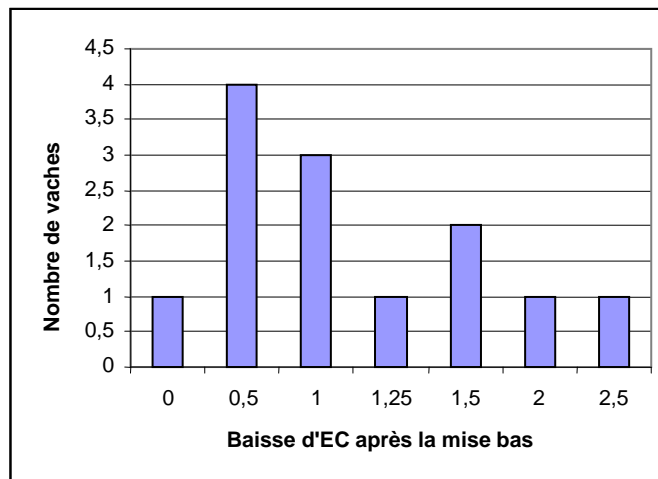
Ce diagramme montre des états corporels en majorité supérieurs à 3, avant la mise bas. On remarque aussi une diminution générale assez marquée de la note d'état corporel après la mise bas, qui est confirmée par la représentation des écarts de la note d'état corporel entre la mise bas et le prélèvement, figure 18.



**Figure 16 :** Représentation graphique de l'évolution de la note d'état corporel de toutes les vaches appartenant à l'élevage 2



**Figure 17 :** Représentation graphique de l'évolution de la note d'état corporel des vaches de l'élevage 2 ayant été prélevées dans le cadre de cette étude



**Figure 18** : Variation de la note d'état corporel entre la mise bas et le jour du prélèvement pour les vaches de l'élevage 2 ayant fait l'objet d'un prélèvement

Huit des 13 vaches prélevées ont une diminution de la note d'état corporel supérieure ou égale à 1 point. Cette proportion est au-delà des recommandations et constitue un facteur de risque d'apparition de la cétose.

**Conclusion partielle** : La population étudiée a été choisie parmi les vaches qui avaient le plus grand nombre de facteurs de risque de cétose clinique et/ou subclinique. Les vaches prélevées sont donc des vaches chez qui la probabilité d'observer une acétonémie élevée à très élevée, est grande. Nous avons choisi arbitrairement de prélever cette population dans le but de tester l'analyseur Optium Xceed® sur des échantillons dont la valeur de la concentration du BHB était élevée.

### III-2-3/ Protocole expérimental

#### II-2-3-1/ Prélèvements

Les prélèvements de lait et de sang ont été réalisés de septembre 2007 à mai 2008.

Le sang a été prélevé à la veine coccygienne sur un tube sans anticoagulant ; les tubes ont ensuite été centrifugés (3000 rpm, 10 min) afin de séparer le sérum.

Les échantillons de lait ont été prélevés à partir d'un seul quartier sain par vache. Les vaches des élevages 1 et 2 ont été prélevées après la traite, et après distribution de la ration, en

début voire en fin de matinée. Les autres vaches ont été prélevées aux hôpitaux ou dans des élevages, à un moment aléatoire de la journée.

Le dosage de BHB dans le sang a été réalisé lors de l'hospitalisation de la vache 07-1266 (qui avait par ailleurs, une note d'état corporel de 4/5 au moment du vêlage, et une augmentation très rapide de la production laitière). La valeur était donc connue au moment de l'inclusion ; la concentration de BHB dans le sang était de 1,9 mmol/l.

Une partie du prélèvement de lait réalisé pour cette vache a été centrifugée à 2500 rpm, à 4°C, pendant 20 minutes, afin de séparer la matière grasse et les cellules et pour isoler la phase protéique du lait.

Les échantillons de sérum et de lait ont été conservés à -80°C jusqu'au moment de l'analyse.

Aucun additif n'a été ajouté pour la conservation. Les dosages ont été regroupés et réalisés en mai 2008, après que les prélèvements sont restés congelés pendant une durée de 1 à 9 mois.

### **II-2-3-2/ Réalisation de la mesure**

Les mesures ont toutes été effectuées de façon identique quelle que soit la matrice utilisée (lait, sérum, mélange lait+sérum...). La décongélation de l'échantillon a été effectuée à température ambiante. La bandelette est insérée dans le lecteur. Deux microlitres du prélèvement biologique sont déposés (à l'aide d'un micro-pipeteur) dans l'emplacement prévu à cet effet sur la bandelette, lorsque le lecteur l'indique. Le résultat est lu au bout de 10 secondes.

### **II-2-3-3/ Evaluation de la répétabilité de la mesure**

Pour évaluer la répétabilité de la mesure de la concentration de BHB dans le lait, nous avons utilisé les échantillons de lait de deux vaches de la clinique bovine.

Les échantillons ont été choisis parmi ceux disponibles, en considérant un rapport entre le BHB du lait et le BHB sanguin de 0,12, comme indiqué par Enjalbert et al. [79]. Ils provenaient essentiellement de deux cas cliniques :

1. Vache 07-1266 : la valeur de la concentration en BHB dans le lait théorique devait être approximativement de 0,2 mmol/l. Cette concentration est théoriquement détectable avec l'Optium Xceed®. Le dosage est fait 3 fois avec l'appareil Optium Xceed® sur la phase protéique et sur le lait total, dans le but de tester la répétabilité.

2. Vache 07-1373 : cette vache a un état corporel de 4/5 à la mise bas, et avait fait l'objet d'un dosage de BHB lors de son hospitalisation, dont le résultat était de 2,4 mmol/l (05/12/07).

Le prélèvement de sérum qui a été utilisé pour cette étude (réalisé le 03/12/07), avait une concentration en BHB mesuré avec l'appareil Optium Xceed®, de 3,4 mmol/l.

Pour ces échantillons, le lait total et la phase protéique (obtenue après décongélation du lait, puis centrifugé à 2500rpm, à 4°C, pendant 20 minutes) ont été utilisés et la mesure a été répétée trois fois.

#### **II-2-3-4/ Effet de la conservation**

Deux modes de conservation « courante » du lait ont été testés :

- une nouvelle mesure a été faite sur le lait total et sur la phase protéique après conservation des échantillons au réfrigérateur pendant 48 heures à +4°C.
- une mesure a été faite sur du lait mélangé à du bronopol

1. Les échantillons de lait total et la phase protéique (vache 07-1273) ont été conservés au réfrigérateur pendant 48 heures. Une mesure a été réalisée sur le lait total, et un nouveau test de dilution a été fait avec la phase protéique et des proportions de 90%, 60% et 30%.

2. Pour déterminer si le conservateur est susceptible d'interférer avec la mesure, le sérum de PH1 (7,7 mmol/l de BHB avec l'Optium Xceed®) a été dilué dans un échantillon de lait total négatif qui avait été prélevé sur du bronopol, avec des proportions variables : 25, 50, 75, 87,5 et 93,75% de lait puis mesure de la concentration en BHB du mélange, en répétant deux fois la mesure pour chaque dilution.

### **II-2-3-5/ Evaluation de l'exactitude de la mesure sur la matrice lait**

Pour évaluer la capacité de l'appareil portable Optium Xceed ® à mesurer la valeur vraie de la concentration de BHB dans le lait, plusieurs approches différentes ont été utilisées :

- préparation d'une solution de concentration de BHB connue à l'aide d'un échantillon de lait dont la teneur est inférieure au seuil de détection (échantillon négatif) et d'une solution de BHB préparée à partir d'une source commerciale de BHB (Sigma, ref.).

- dilution d'échantillons (de lait ou de sérum), dans lesquels la concentration de BHB est élevée, dans un échantillon de lait négatif afin de produire une gamme de dilutions, et vérifier la linéarité de la mesure.

1. Une solution de BHB de concentration 1M a été préparée. Pour cela nous avons solubilisé 500 mg de BHB (SIGMA, MW=) dans 3,96 ml d'eau purifiée.

Cette solution est diluée au 50ème pour obtenir 20 ml de solution à 0,02 mol/l. La valeur du pH de la solution obtenue a été mesurée à l'aide d'un pH-mètre ; elle est égale à 7,80.

Puis la solution à 0,02 mol/l est diluée dans le lait d'une vache dont la concentration en BHB est inférieure au seuil de détection, afin d'obtenir les concentrations suivantes : 2, 1, 0,5, 0,25, 0,125, 0,0625 et 0,031 mmol/l.

La concentration du BHB dans chacune des solutions ainsi préparées a été mesurée avec l'appareil Optium Xceed®.

2. Vache 07-1266 : les dilutions de la phase protéique avec la phase protéique d'un lait de vache dont la concentration de BHB est nulle, ont été effectuées afin de préparer une série d'échantillons avec des concentrations variables. Les dilutions réalisées correspondaient ainsi à 90%, 60%, 30% et 10% de la phase protéique de la vache 07-1266.

3. Cet essai a été répété avec un échantillon différent (Vache 07-1273) en utilisant une gamme de dilutions différente : dilution au 2/3, 1/2 et 1/3 de la phase protéique du lait de cette vache.



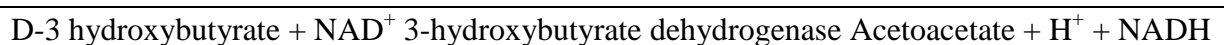
4. Pour le dernier échantillon (Vache 1083), les mesures sont effectuées sur du lait total, à différentes proportions : 90%, 70%, et 40%, dans un lait total négatif, et la répétabilité de la mesure a été évaluée pour chaque dilution, (trois répétitions pour chaque dilution préparée)

5. Mélange d'un sérum (vache 07-1266) de concentration connue 2 mmol/l de BHB (mesurée avec l'Optium Xceed®) avec des proportions variables de lait total négatif : 50, 40, 30 et 10% de sérum puis, mesure de la concentration en BHB du mélange deux fois pour chaque dilution.

### **II-2-3-6/ Corrélation entre les valeurs mesurées dans le sang et dans le lait**

La mesure de la concentration du BHB a été réalisée avec l'appareil Optium Xceed®. Sur tous les échantillons de sérum et de lait. La corrélation entre la concentration dans le sérum et la concentration dans le lait a été calculée, et une relation entre les 2 valeurs est recherchée.

Certains échantillons ont été choisis pour un dosage par un laboratoire d'analyse tiers (NBVC, ville) afin de comparer les concentrations données par l'appareil Optium Xceed® à celles données par l'analyseur Hitachi 717 (utilisation du kit Ranbut D-3-hydroxybutyrate). Cette dernière analyse met en jeu la réaction :



et une mesure d'absorbance est réalisée à 340 nm, ce qui permet de déduire la concentration en NADH. La méthode est donc une méthode spectrophotométrique.

Différents échantillons correspondant à des concentrations faibles, moyennes ou élevées en BHB ont été testés.

### **III-3/ Résultats**

#### **III-3-1/Evaluation de la répétabilité**

Le tableau 19 représente les résultats des différents tests de répétabilité effectués sur les échantillons de 2 vaches.

**Tableau 19 : Test de répétabilité**

	<b>Echantillon 1 (07-1266)</b>		<b>Echantillon 1 (07-1373)</b>	
	<b>lait total</b>	<b>phase protéique</b>	<b>lait total</b>	<b>phase protéique</b>
<b>mesure 1 (mmol/l)</b>	0	0,1	0,4	0,4
<b>mesure 2 (mmol/l)</b>	0	0,1	0,3	0,4
<b>mesure 3 (mmol/l)</b>	0	0,1	0,4	0,4
<b>moyenne</b>	0	0,1	0,37	0,4
<b>écart type</b>	0	0	0,04716991	0
<b>CV</b>	0	0	12,7%	0

Sur la phase protéique, les écarts types sont de 0, la méthode semble répétable. Sur le lait total, cet écart type est une fois de 0 et une fois de 0,047 (ce qui est relativement élevé). Néanmoins, la mesure semble répétable.

Par ailleurs, nous remarquons que pour le premier échantillon (07-1266), le dosage à partir de la phase protéique donne une concentration de 0,1 mmol/l, alors que le dosage sur le lait total donne une valeur nulle.

Pour le deuxième échantillon (vache 07-1373), entre la moyenne des valeurs obtenues avec la phase protéique et la moyenne de celles obtenues pour le lait total, on observe une différence de 0,03 mmol/l.

#### **III-3-2/Evaluation de la conservation**

1. Pour évaluer l'effet du stockage et de la réfrigération pendant 48 heures sur la mesure à partir du lait total ou à partir de la phase protéique, les résultats suivants ont été obtenus : la mesure sur le lait total passe de 0,4 mmol/l à 0,1 mmol/l. Celle sur la phase protéique ne varie pas.

Ce résultat suggère fortement que la conservation du lait total au réfrigérateur modifie la concentration de BHB dans le lait. Alors que ce n'est pas le cas pour la phase protéique.

Ainsi, si la mesure est réalisée à partir de lait total, elle doit être réalisée rapidement après le prélèvement.

2. Lors du prélèvement de grandes séries d'échantillons de lait pour la mesure de la concentration des cellules dans le lait (ou CCS), les flacons de prélèvement contiennent un anti-bactérien (le bronopol) afin de permettre la conservation du lait entre le moment du prélèvement et celui de l'analyse.

Concernant l'utilisation de ce support de prélèvement pour le dosage du BHB dans le lait, nous avons cherché à savoir si cette substance pouvait interférer avec le dosage du BHB dans le lait.

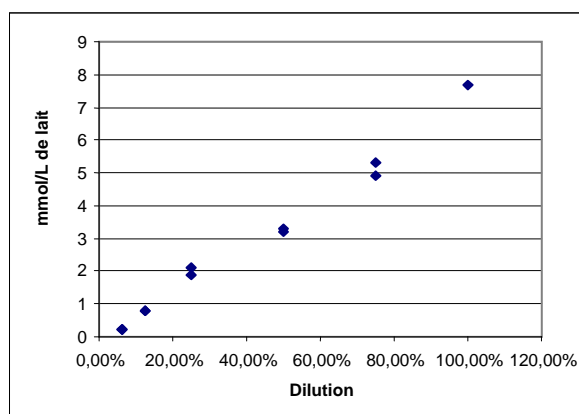
Pour cela, le sérum de PH1, évalué à 7,7 mmol/l de BHB est dilué dans un échantillon de lait négatif qui avait été mélangé à du bronopol. Les résultats sont les suivants :

**Figure 19** : Dilution de sérum de la vache PH1 dans du lait négatif prélevé sur bronopol ; A. valeurs numériques, B. représentation graphique

**A**

Proportion de sérum	mmol/l de (lait + bronopol)	Valeur théorique attendue mmol/l
6,25%	0,2	0,5
6,25%	0,2	0,5
12,50%	0,8	1
12,50%	0,8	1
25%	1,9	1,9
25%	2,1	1,9
50%	3,2	3,8
50%	3,3	3,8
75%	4,9	5,8
75%	5,3	5,8
100%	7,7	7,7

**B.**



Le coefficient de corrélation est de 0,99.

La présence de bromopol n'interfère donc pas avec le dosage du BHB dans le lait.

### III-3-3/Exactitude de la mesure

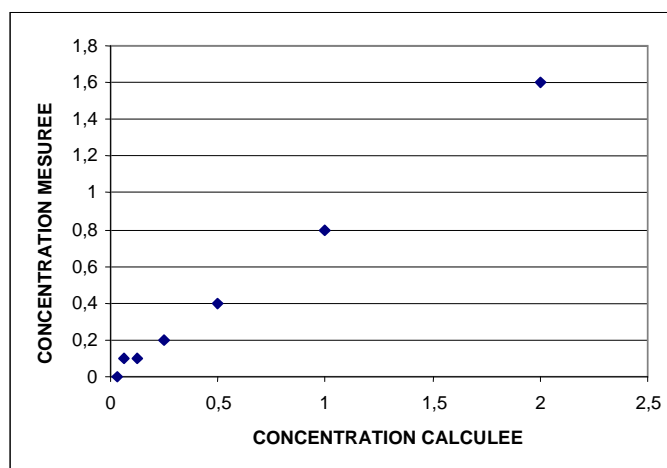
Les résultats de dosage du BHB après dilution de la solution de BHB pur dans du lait de vache négatif sont présentés figure 20.

**Figure 20** : Dilution d'une solution de BHB dans du lait de vache négatif : A. résultats numériques, B. représentation graphique

**A**

Concentration calculée	Concentration mesurée
2	1,6
1	0,8
0,5	0,4
0,25	0,2
0,125	0,1
0,0625	0,1
0,031	0

**B**



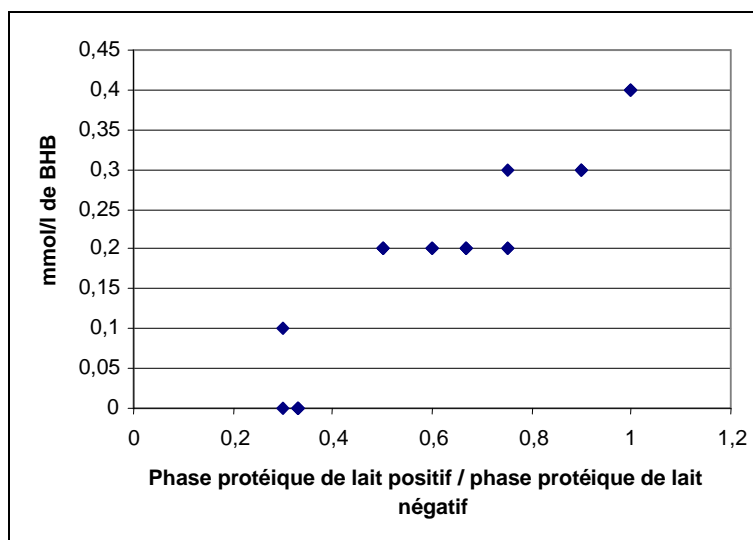
Le coefficient de corrélation entre la concentration théorique et celle donnée par l'analyseur est très élevé ( $r^2=0,999$ ). Il nous indique que l'appareil Optium Xceed® semble sous estimer les valeurs de la concentration en BHB, notamment pour des valeurs supérieures à 0,5 mmol/l.

**Figure 21** : Dilution de la phase protéique du lait de la vache 07-1373 avec une phase protéique négative : A. valeurs numériques, B. représentation graphique

**A**

Phase protéique de lait positif / phase protéique de lait négatif	BHB (mmol/l)
1	0,4
1	0,4
0,9	0,3
0,9	0,3
0,75	0,2
0,75	0,2
0,75	0,3
0,67	0,2
0,67	0,2
0,67	0,2
0,6	0,2
0,6	0,2
0,5	0,2
0,5	0,2
0,5	0,2
0,33	0
0,33	0
0,33	0
0,3	0
0,3	0,1

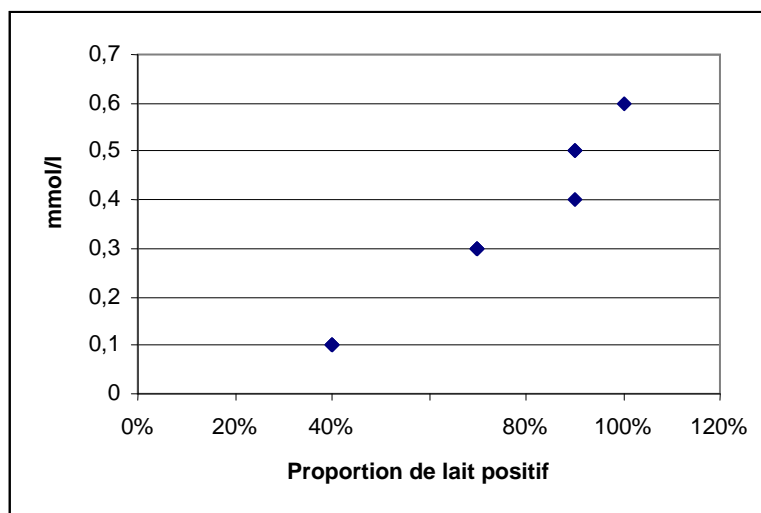
**B**



Les résultats du test de dilution pour l'échantillon (vache 07-1373) montrent une corrélation de 92,7% entre la valeur mesurée après dilution et la valeur attendue de la concentration en BHB.

Pour la série de dilutions du lait total de la vache 1083 avec du lait total de vache négative, on obtient un coefficient de corrélation  $r^2 = 0,98$  (cf. figure 22), qui est très proche.

**Figure 22** : Dilution du lait de la vache 1083 avec un lait négatif : représentation graphique



Deux mesures indépendantes de l'effet de la dilution, afin de créer artificiellement une gamme de valeurs correspondant aux valeurs physiologiques habituellement mesurées chez la vache, ont montré que l'appareil est capable de mesurer avec une bonne exactitude la concentration du BHB dans un échantillon de lait.

Pour obtenir des valeurs plus élevées, nous avons procédé de la même manière en utilisant comme source de BHB un sérum dans lequel la concentration était plus élevée.

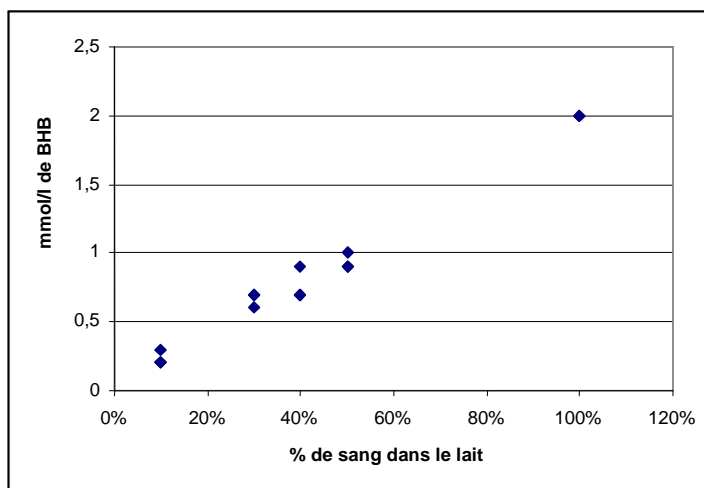
Les dilutions du sérum (dont la concentration initiale est de 2 mmol/l) dans du lait total négatif ont donné les résultats suivants (Figure 23)

**Figure 23** : Dilution de sérum de la vache 07-1266 dans du lait négatif ; A. valeurs numériques, B. représentation graphique

**A**

% de sérum	Valeur théorique attendue mmol/l	Valeur obtenue mmol/l
100%	2	2
100%	2	2
50%	1	1
50%	1	0,9
50%	1	0,9
40%	0,8	0,9
40%	0,8	0,7
40%	0,8	0,7
30%	0,6	0,7
30%	0,6	0,7
30%	0,6	0,6
10%	0,2	0,3
10%	0,2	0,2
10%	0,2	0,2

**B**



Pour ce test de dilution, le coefficient de corrélation est de 0,99.

Pour l'ensemble des mesures qui ont été réalisées, après avoir dilué des échantillons de concentration connue afin de créer une gamme de concentrations, nous observons une excellente corrélation entre la valeur attendue et la valeur donnée par l'appareil.

**Conclusion partielle** : la mesure de la concentration en BHB dans le lait de vache avec le lecteur semble répétable sur du lait total, sur la phase protéique et sur du lait mélangé à du bronopol. La valeur donnée par le lecteur est proche de la valeur vraie de la concentration de BHB dans le lait. Cependant, la mesure doit être faite le plus rapidement possible au risque de modifier le résultat donné par le lecteur.

### III-3-4/ Estimation de la prévalence de la cétose subclinique dans le groupe d'étude

Avec un seuil de 1,2 mmol/l de BHB dans le sérum, on observe sur les 89 échantillons prélevés, une prévalence globale de la cétose de 44%. Si un seuil de 1,4 mmol/l est utilisé, la prévalence est alors de 34%. En privilégiant le prélèvement d'animaux pour lesquels un ou

plusieurs facteurs de risque étaient connus, nous avons très significativement augmenté le recrutement de cas de cétose, et ainsi augmenté le nombre de prélèvements dont la concentration de BHB était élevée à très élevée.

Cela a été possible notamment en réalisant des prélèvements de sang et de lait chez des vaches hospitalisées à la clinique bovine de l'ENVET, alors qu'elles présentaient pour la plupart une pathologie qui pouvait être à l'origine d'une cétose secondaire. Pour la suite de l'étude, chaque groupe d'animaux est étudié séparément.

### *Elevage 1*

Dans l'élevage #1, 34% des vaches prélevées ont une concentration en BHB dans le sérum supérieure ou égale à 1,2 mmol/l. Cinquante vaches, au même stade entre 1 semaine et 8 semaines de lactation ont été prélevées, ce qui est largement supérieur au nombre de 12 animaux à risque à prélever, recommandé par Oetzel [34]. On peut donc conclure que la prévalence de la cétose subclinique, est anormalement élevée dans l'élevage 1.

### *Elevage 2*

92,31% des animaux prélevés ont une concentration en BHB supérieure ou égale à 1,2 mmol/l de sérum. Dans ce cas, 13 animaux à risque au même stade physiologique, sont prélevés, ce qui est toujours supérieur aux recommandations de Oetzel [34]. Il est donc possible de conclure que cet élevage a également une forte incidence de cétose subclinique.

### *Cas cliniques (Clinique bovine et clientèle)*

Comme nous l'avons déjà évoqué précédemment, la plupart de ces animaux avaient une pathologie primaire, raison de leur hospitalisation, qui a provoqué l'apparition d'une cétose secondaire. Néanmoins, les prélèvements ont été faits en grande majorité dans les 2 mois suivants la mise bas, considérée comme la période d'incidence maximale de la cétose primaire. La prévalence de la cétose subclinique dans ce groupe est de 43,48%, ce qui est particulièrement élevé.



### III-3-5/ Corrélation entre la mesure dans le sang et celle dans le lait

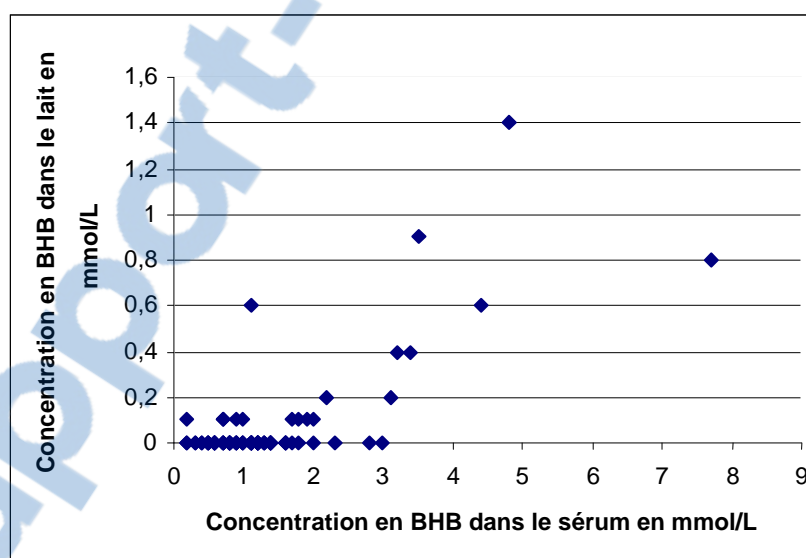
Les mesures ont été faites sur les 86 prélèvements de lait et de sérum. Les résultats sont donnés en annexe 6. Les échantillons de trois vaches ne sont pas exploitables pour cette partie de l'étude.

Le coefficient de corrélation entre la concentration en BHB dans le lait et celle dans le sang est de 0,74.

Concernant la relation entre les deux concentrations, elle semble être linéaire (pente de 0,14, ordonnée à l'origine de -0,12). Ainsi, le rapport BHB dans le lait par rapport à la concentration du BHB dans le sang serait ici de 0,14.

La représentation graphique de la concentration en BHB dans le lait en fonction du BHB dans le sérum est présentée figure 24.

**Figure 24** : Concentration en BHB dans le lait en fonction de la concentration en BHB dans le sérum, mesurées par l'appareil Optium Xceed®



### III-3-6/ Valeurs du test

Si on fixe le seuil de positivité de la cétose subclinique à 1,2 mmol/l dans le sérum, on constate que de nombreuses vaches dont la valeur mesurée dans le sérum est au-dessus de ce

seuil ont une valeur en BHB dans le lait nulle. Les résultats sont représentés en tableau 20 A, B, C et D.

**Tableau 20** : Valeurs du test avec l'appareil Optium Xceed®, en fonction du seuil de positivité fixé dans le sérum

**A**

	Lait (limite : 0,1 mmol/l)		
Sérum (limite de 1,2 mmol/l)	Positif	Négatif	
Positif	12	27	Sensibilité =31%
Négatif	6	41	Spécificité =87%

**B**

	Lait (limite : 0,1 mmol/l)		
Sérum (limite de 1,4 mmol/l)	Positif	Négatif	
Positif	12	16	Sensibilité =43%
Négatif	6	52	Spécificité =90%

**C**

	Lait (limite : 0,2 mmol/l)		
Sérum (limite de 1,2 mmol/l)	Positif	Négatif	
Positif	8	31	Sensibilité =21%
Négatif	1	46	Spécificité =98%

**D**

	Lait (limite : 0,2 mmol/l)		
Sérum (limite de 1,4 mmol/l)	Positif	Négatif	
Positif	8	20	Sensibilité =29%
Négatif	1	57	Spécificité =98%

### III-3-7/ Mesures avec l'appareil Hitachi 717 et le kit Ranbut D-3-hydroxybutyrate

L'essai de mesure de BHB sur le lait total avec cette méthode de laboratoire a montré des messages d'erreur sur 6 échantillons parmi les 20 qui ont été testés. Les résultats numériques obtenus ne sont donc pas considérés comme fiables et n'ont donc pas été pris en compte. Le dosage du BHB dans le lait n'est donc pas possible par cette technique.

### III-4/ Utilisation du test à l'échelle de l'élevage : exemple du cas particulier de l'élevage n°2

Les prélèvements dans différents groupes d'animaux ont permis de déterminer 3 groupes (élevages) avec 3 prévalences vraies associées à 3 prévalences apparentes différentes.

**Tableau 21 : Prévalence vraie (PV) et prévalence apparente (PA) de la cétose subclinique dans les différents groupes**

Valeur Optium Xceed®	≥0,1 mmol/l, seuil de positivité de 1,4 mmol/l dans le sérum	
Prévalence	Apparente (lait)	Vraie (sérum)
	6,00%	<b>18,00%</b>
	38,46%	<b>84,62%</b>
	43,48%	<b>34,78%</b>
<b>Coeff. de corrélation</b>	0,60089391	
<b>Ordonnée à l'origine</b>	0,15802851	
<b>Pente</b>	1,02330732	

Valeur Optium Xceed®	≥0,2mmol/l, seuil de positivité de 1,4 mmol/l dans le sérum	
Prévalence	Apparente (lait)	Vraie (sérum)
	0,00%	<b>18,00%</b>
	30,77%	<b>84,62%</b>
	21,74%	<b>34,78%</b>
<b>Coeff. de corrélation</b>	0,87124074	
<b>Ordonnée à l'origine</b>	0,12393948	
<b>Pente</b>	1,90857505	

Valeur Optium Xceed®	≥0,1 mmol/l, seuil de positivité de 1,2 mmol/l dans le sérum	
Prévalence	Apparente (lait)	Vraie (sérum)
	6,00%	<b>34,00%</b>
	38,46%	<b>92,31%</b>
	43,48%	<b>43,48%</b>
<b>Coeff. de corrélation</b>	0,52442773	
<b>Ordonnée à l'origine</b>	0,32953599	
<b>Pente</b>	0,80651941	

Valeur Optium Xceed®	≥0,2 mmol/l, seuil de positivité de 1,2 mmol/l dans le sérum	
Prévalence	Apparente (lait)	Vraie (sérum)
	0,00%	<b>34,00%</b>
	30,77%	<b>92,31%</b>
	21,74%	<b>43,48%</b>
<b>Coeff. de corrélation</b>	0,82213334	
<b>Ordonnée à l'origine</b>	0,28128335	
<b>Pente</b>	1,6264257	

Il existe donc quatre manières de modéliser la prévalence vraie en fonction de la prévalence apparente, selon la valeur de positivité choisie (0,1 ou 0,2 mmol/l).

Modèle 1 : Pour 0,1 mmol/l dans le lait et 1,4 mmol/l dans le sérum,  $PV = 1,02 \times PA + 0,16$  avec un coefficient de corrélation de 0,60

**Modèle 2 : Pour 0,2 mmol/l dans le lait et 1,4 mmol/l dans le sérum,  $PV = 1,9 \times PA + 0,12$  avec un coefficient de corrélation de 0,87**

Modèle 3 : Pour 0,1 mmol/l dans le lait et 1,2 mmol/l dans le sérum,  $PV = 0,8 \times PA + 0,32$  avec un coefficient de corrélation de 0,52

**Modèle 4 : Pour 0,2 mmol/l dans le lait et 1,2 mmol/l dans le sérum,  $PV = 1,62 \times PA + 0,28$  avec un coefficient de corrélation de 0,82**

Les modèles 2 et 4 avec une meilleure corrélation sont choisis. Il est possible d'en déduire les prévalences apparentes observées selon les prévalences vraies.

**Tableau 22** : Prévalence apparente observée avec le test Optium Xceed® sur le lait selon la prévalence vraie de la cétose subclinique du troupeau

<b>PV</b>	5%	10%	15%	20%	25%	30%
PA avec le modèle 2	2,57%	5,2%	7,83%	10,46%	13,1%	15,72%
PA avec le modèle 4	2,9%	6%	9,1%	12,17%	15,26%	18,35%

Le seuil qui semble le plus approprié d'après l'ensemble des données est celui de 0,2 mmol/l dans le lait et 1,2 mmol/l dans le sérum (modèle 4) car, malgré un coefficient de corrélation plus faible (0,82), les valeurs des prévalences apparentes sont plus proches de celles des prévalences vraies.

Néanmoins, le nombre de groupes d'animaux étudié n'est que de 3 (correspondant à 2 élevages et un groupe d'animaux venant de différents élevages), ce qui ne représente pas une assez grande quantité de données pour établir la relation entre la prévalence vraie et la prévalence apparente avec ce test.

Ces résultats peuvent être exploités en prélevant un minimum de 30 vaches entre 1 et 8 semaines de lactation. Le niveau d'alarme serait atteint quand 4 vaches sont positives, en choisissant un intervalle de confiance de 75%.

### III-4-1/ Les états corporels des vaches de l'élevage 2

L'analyse des notes d'état corporel permet de suspecter la présence de vaches en stéatose dans l'élevage 2. En effet, d'une part les vaches ont un état d'engraissement anormalement élevé avant le vêlage, et d'autre part, la diminution de l'état corporel est supérieure à 0,75 point pour 8 des 13 vaches étudiées (cf. supra).

Ces données sont une première indication sur l'origine du problème, et le diagnostic de stéatose et cétose subclinique est confirmé par notre étude des valeurs du BHB dans le sang (cf. tableau en annexe 6). Ces troubles peuvent expliquer les troubles de la reproduction qui ont été observés dans cet élevage.

### III-4-2/ Analyse des paramètres de la reproduction

**Tableau 23** : Analyse des paramètres de reproduction, service de reproduction, ENVT

Paramètre	Pourcentage au 20/04/08	Pourcentage au 17/05/08	Limite
Vêlage-chaueur >60 jours	44%	43%	<25%
Vêlage-IA 1>90jours	21%	18%	/
Réussite en IA1	45%	45%	>20%
Pourcentage de 3IA et plus	32%	33%	<50%
Vêlage-IA fécondante>120jours	25%	18%	<21%
Pourcentage de retours tardifs	26%	27%	<15%

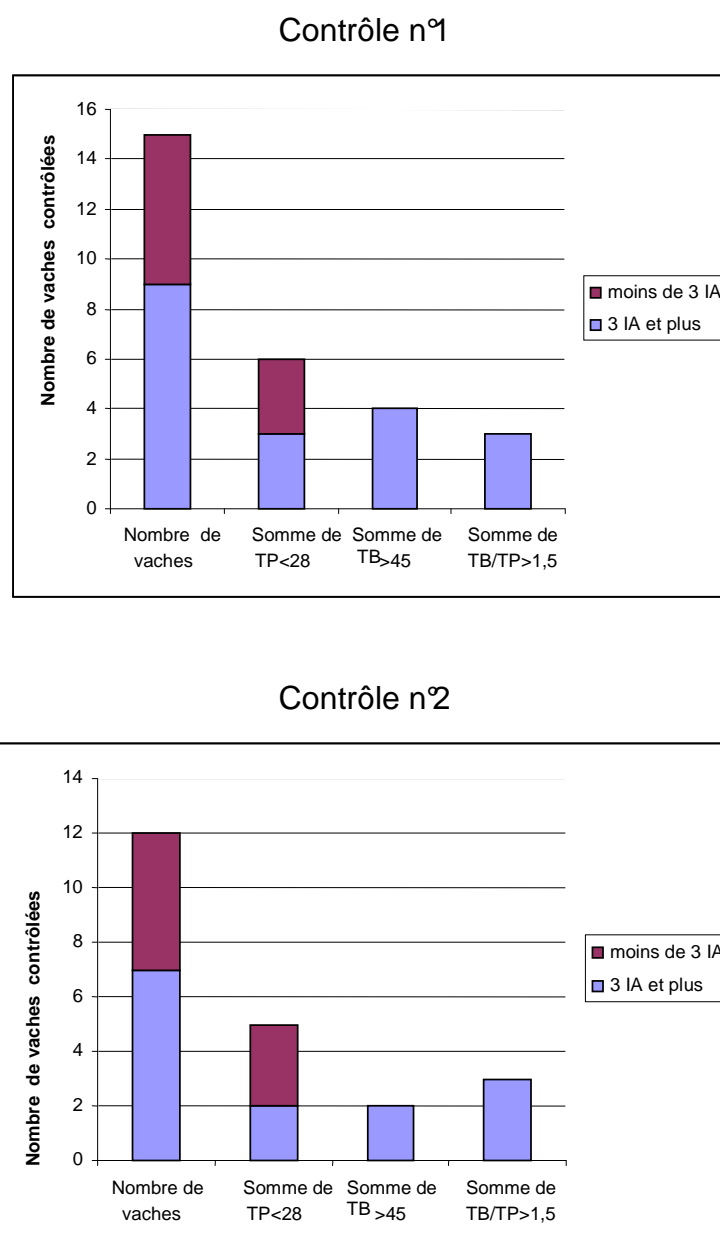
Les troubles sont attribués à un problème de reprise de l'activité ovarienne, et donc une apparition retardée des premières chaleurs et de la première insémination artificielle.

### III-4-3/ Reproduction et déficit énergétique

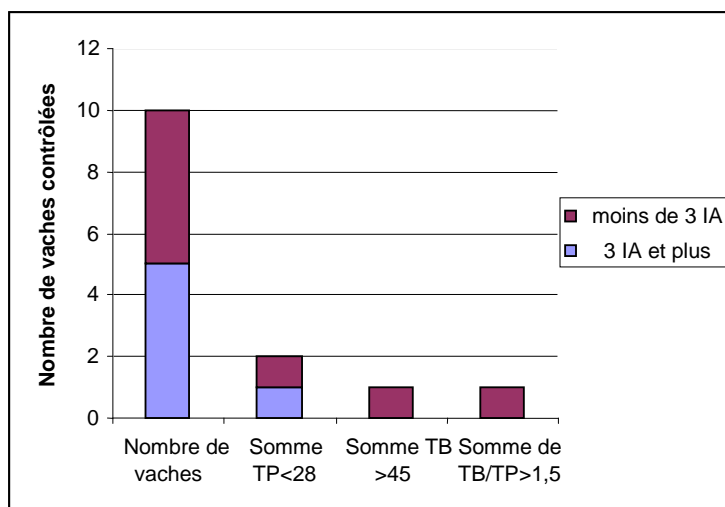
Parmi les vaches qui ont été examinées durant le mois de mai 2008 à l'occasion du contrôle laitier, plus de la moitié ont été inséminées trois fois ou plus. On retrouve les vaches inséminées trois fois ou plus dans le groupe pour lequel le déficit énergétique était le plus marqué (figure 25). Il est donc probable que les troubles de la reproduction qui ont été identifiés dans cet élevage soient d'origine métabolique et que des défauts du rationnement des vaches en fin de gestation soient la cause de ces phénomènes.

La solution doit être recherchée dans le rationnement de ce troupeau. ; une analyse exhaustive du rationnement et de la conduite pratique de l'alimentation des vaches laitières en lactation et pendant la période sèche doit être réalisée.

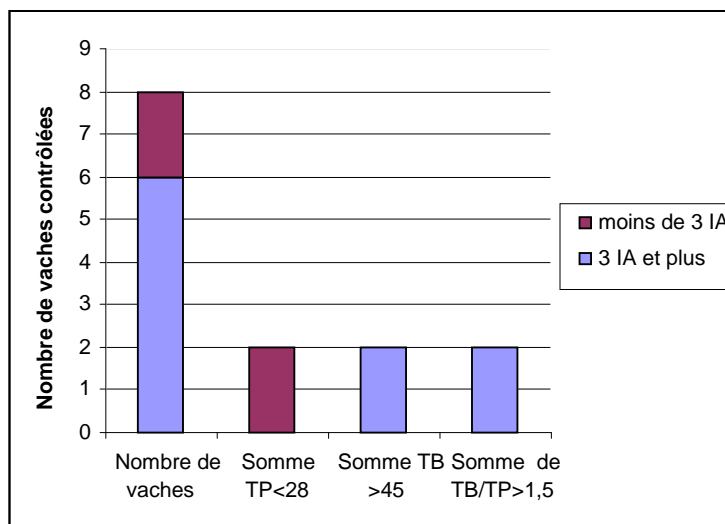
**Figure 25** : Evaluation du déficit énergétique, document du contrôle laitier de mai 2008



### Contrôle n°3



### Contrôle n°4



### **III-5/ Discussion**

#### **III-5-1/ Recrutement des cas**

Les échantillons, de lait ou de sérum, ont été prélevés chez des vaches qui possédaient un ou plusieurs facteurs de risque de la cétose, avec des rangs de parité assez variables, mais généralement supérieurs à 2. En outre, les bovins, essentiellement des vaches laitières, qui ont été prélevés à la Clinique bovine étaient de bons candidats à une cétose secondaire.

L'analyse de la prévalence totale sur les 89 échantillons de sérum montre une valeur de 34% (pour une valeur seuil fixée à 1,4 mmol/l). Elle est supérieure à la prévalence moyenne qui a été rapportée dans les élevages, et qui est généralement voisine de 15% [50]. Des études ont cependant décrit des situations dans des élevages laitiers où l'incidence cumulée des cas de cétose subclinique pouvait atteindre 34% [46]. Dans notre expérience, il s'agit d'une incidence globale, puisque les animaux ont été prélevés au même stade physiologique, mais à des dates assez différentes et pendant plusieurs mois.

Par ailleurs, les élevages étudiés se sont révélés être des élevages dans lesquels l'incidence de la cétose subclinique est élevée à très élevée comme l'a montré notre étude.

#### **III-5-2/ Utilisation de l'appareil Optium Xceed® pour le diagnostic de la cétose**

##### **III-5-2-1/ Gamme des valeurs données par l'appareil**

Les différents tests d'exactitude, que ce soit à partir de la préparation d'échantillons de lait de titre connu à l'aide d'une source commerciale de BHB, ou la dilution d'échantillons de lait de titres élevés montrent que l'appareil portable Optium Xceed® est capable de donner une valeur proche de la valeur vraie de la concentration en BHB dans le lait total. Ainsi, pour un échantillon de lait donné, l'appareil est capable de déterminer la concentration réelle en BHB. Notons cependant que pour des valeurs élevées en BHB dans le lait (supérieures à 2 mmol/l), l'appareil semble sous-estimer légèrement la valeur de la concentration ; la valeur affichée correspondant à 80% environ de la valeur théorique.



### **III-5-2-2/ Performances du test en fonction du seuil retenu**

Le diagnostic de laboratoire consistant à mesurer la concentration de BHB dans le lait réalisé avec l'appareil portable Optium Xceed® montre une sensibilité faible, et une spécificité relativement élevée.

La meilleure sensibilité observée est de 43% (avec 1,4 mmol/l dans le sérum et un seuil de positivité fixé à 0,1 mmol/l dans le lait). La spécificité est alors de 90%. Or, on recherche la meilleure sensibilité possible dans le cas de la cétose.

La meilleure sensibilité avec le test Ketolac®BHB, avait été obtenue par Enjalbert et son équipe [79] : une sensibilité de 96% et une spécificité de 63%, pour un seuil de BHB dans le sérum fixé à 1,2 mmol/l et une limite de positivité du test fixée à 100 µmol/l.

Les sensibilités et spécificités décrites par d'autres auteurs pour le test Ketolac®BHB restent meilleures que les performances du test avec le lecteur Optium Xceed®.

De même, par comparaison avec Ketolac®BHB, ce test a des valeurs de VPP et VPN plus faibles, sachant cependant que les prévalences estimées sont assez variables entre les différentes études.

Ainsi, la sensibilité de la mesure avec le lecteur n'est pas très élevée. Elle est comparable à celle des tests au nitroprussiate de sodium disponibles sur le lait. Cependant, ce test permet de donner une mesure quantitative de la concentration. En outre, le test Ketolac®BHB et ses analogues ne sont pas disponibles sur le marché français.

### **III-5-2-3/ Origine de la faible sensibilité du test**

D'après l'étude réalisée à partir des dilutions, l'appareil Optium Xceed® semble donner une valeur proche de la valeur vraie de la concentration en BHB dans le lait. La valeur limite de la concentration en BHB dans le lait est de 0,07 mmol/l. Au dessus de ce seuil, la vache est en cétose subclinique voire clinique.

L'absence de détection de BHB dans le lait des vaches atteintes d'une affection prédisposant au développement d'une cétose, peut être due à une concentration de BHB dans le lait inférieure au seuil de détection de l'appareil, c'est à dire 50 µmol/l (seuil de détection de l'appareil Optium Xceed®). La mesure de l'exactitude confirme une détection d'une valeur de 62,5 µmol/l de BHB dans le lait.

Ainsi, si pour certaines vaches, l'exportation et l'utilisation du BHB du sang vers le lait est forte, pour d'autres, cette exportation est beaucoup plus faible et non détectable. En effet, le coefficient de corrélation entre la concentration en BHB dans le lait et celle dans le sang est de 0,74, ce qui est légèrement supérieur à la corrélation calculée par Enjalbert *et al* [79] qui était de 0,66. Ceci montre bien que la concentration en BHB dans le lait n'est pas fortement corrélée avec la concentration en BHB dans le sang.

Cependant, d'autres études avaient mesuré une corrélation dont la valeur pouvait atteindre 0,87 (cf. supra).

Concernant la relation entre les deux concentrations, elle semble être linéaire (pente de 0,14, ordonnée à l'origine de -0,12). Ainsi, le rapport BHB dans le lait par rapport à la concentration du BHB dans le sang serait ici de 0,14 (Andersson *et al.* rapportaient 0,13 en 1984 [73], et Enjalbert *et al.* 0,12 en 2001 [79]).

De plus, si l'on modélise la concentration en BHB dans le lait à partir de la concentration dans le sang, on obtient :

$$[\text{BHB lait}] = 0,14 \times [\text{BHB sang}] - 0,12$$

Pour une concentration en BHB dans le sang de 1,2 mmol/l, on obtiendrait ainsi une valeur de 0,048 mmol/l dans le lait, valeur qui n'est pas détectable avec le lecteur Optium Xceed®.

Pour une concentration de 1,4 mmol/l dans le sang, on obtient alors 0,076 mmol/l, valeur normalement détectable par Optium Xceed® qui afficherait alors une valeur de 0,1 mmol/l.

Cependant, ces valeurs théoriques ne sont pas toujours vérifiées (cf. coefficient de corrélation de 0,74), d'où une sensibilité basse.

Une étude réalisée en 1971 par Schwalm *et al.* [97] a mis en évidence quelques éléments du métabolisme de la mamelle chez des vaches en cétose subclinique. Il trouve un coefficient de corrélation de seulement 0,29 entre la concentration en BHB dans le sang périphérique et celle dans le sang artério-veineux de la mamelle. Différentes hypothèses expliqueraient cette faible corrélation. Les triglycérides n'arrivant plus à la mamelle à cause d'un défaut de transport, le BHB est utilisé en plus grande proportion par les cellules

épithéliales de la glande mammaire pour la synthèse de la matière grasse du lait. Inversement, les AGNE servant de précurseurs de la matière grasse lors de cétose, à la place des triglycérides, le BHB est alors plutôt converti en accéto-acétate dans la mamelle. Toutes ces utilisations possibles du BHB peuvent expliquer l'absence de corrélation entre le BHB dans le lait et le BHB sanguin. D'autres études à cette époque montrent même que chez certaines vaches hypercétonémiques, la cétogenèse dans la mamelle diminue quand la concentration totale en corps cétoniques dans le sang atteint des concentrations élevées [97].

#### **III-5-2-4/ Perspective d'un suivi individuel automatisé de la concentration en BHB dans le lait**

Il existe donc d'autres facteurs de détermination de la concentration en BHB dans le lait chez une vache saine ou une vache en cétose. La concentration en BHB dans le lait est, selon Nielsen [52], un indicateur de risque essentiel de cétose, malgré la faible sensibilité de sa mesure. Cette mesure ne peut être considérée comme un facteur de risque car elle est corrélée à celle dans le sang ( $r^2=0,74$ ). Sa faible sensibilité fait d'elle un moins bon indicateur de risque que la concentration en BHB dans le sang. Les variations diurnes de la concentration en BHB dans le sang sont un inconvénient majeur. Cet inconvénient est bien moindre pour la concentration en BHB dans le lait.

Aujourd'hui, le suivi automatique de certains paramètres du lait est de plus en plus fréquent chez les vaches laitières en relation avec le développement du robot de traite. Dans ce cas précis, un suivi individuel de la concentration en BHB dans le lait serait intéressant afin de détecter précocement la cétose et les pertes économiques qui s'en suivent.

Nielsen [52] développe un modèle biologique d'identification du risque de cétose, afin de pouvoir calculer le risque individuel grâce à des mesures automatisées et à certaines données enregistrées. La base de ce modèle est la mesure de la concentration en BHB dans le lait. Or, comme nous l'avons vu précédemment, cette concentration est très variable d'un individu à l'autre. C'est pourquoi, il faudra considérer le risque dû à une variation de la concentration de BHB dans le lait chez une même vache, et non pas la concentration instantanée.

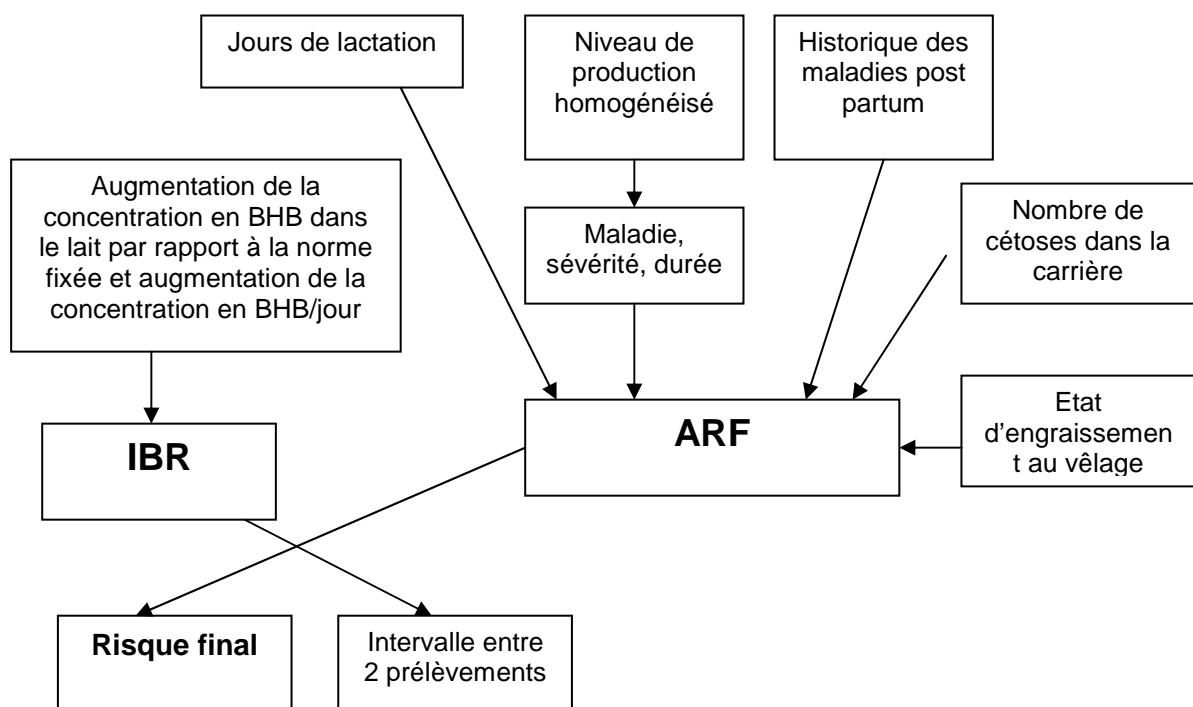
Nielsen considère une concentration limite par défaut de 0,15 mmol/l. Ceci correspond, avec l'appareil Optium Xceed® à un seuil de positivité de 0,2 mmol/l, seuil établi précédemment dans le cadre du suivi d'élevage que nous avons réalisé (cf. supra). La limite de la concentration de base peut être revue à la baisse si elle est inférieure à 0,15 mmol/L.

A cela s'ajoute le risque causé par la variation de la concentration de BHB dans le lait, en considérant la pente de cette variation et l'augmentation journalière de la concentration.

A côté de ces indicateurs de risque de base (IBR), Nielsen décrit les facteurs de risque additionnels (ARF), dont l'influence sur le risque est moins importante, et qui ne sont pas des facteurs provoquant la variation de la concentration en BHB dans le lait. Ce sont la production de lait, les maladies du début de la lactation, le nombre de cétose durant la carrière de la vache et l'état d'engraissement à la mise bas.

ARF et IBR sont des risques et sont compris entre 0 et 1.

Selon ces risques, l'intervalle des mesures de BHB dans le lait sur une même vache ne sera pas le même. Plus le risque est grand, plus l'intervalle de temps entre les mesures est faible, avec un intervalle de temps maximum de 4 jours, lorsque le risque est faible [52]. Les vaches sur lesquelles sont effectuées les mesures se trouvent entre 0 et 50 jours de lactation.



**Figure 26 : Structure du modèle [52]**

Le développement des automates de traite permettrait le suivi individuel des vaches et la détermination du risque de cétose.

Si les automates permettent un gain de temps de travail pour les éleveurs, ces derniers ne disposent plus du moment de la traite, deux fois par jour, pour observer leurs vaches et détecter des symptômes tels que l'anorexie, la boiterie, la perte d'état. Même si rien ne remplace l'observation d'un troupeau, la mesure automatisée de certains paramètres dans le lait tels que le BHB pourrait permettre de surveiller la santé de chaque vache et du troupeau.

### **III-5-2-5/ Application au cas particulier de l'élevage 2**

Des troubles de la reproduction ont été observés dans l'élevage 2. Le lien entre la cétose et les troubles de la reproduction qui ont motivé la mise en place d'un suivi de la reproduction dans ces élevages, est très probable.

Dans l'élevage n°2, 13 vaches au même stade physiologique ont été prélevées, ce qui est normalement un échantillon insuffisant pour le diagnostic de cétose subclinique. La prévalence apparente était de 30,8%, ce qui par le calcul (avec le modèle 4 expliqué ci-dessus) correspond à une prévalence vraie de 50,1%. La prévalence vraie de la cétose dans cet élevage est en réalité de 92,31 %.

Ici le test aurait permis de détecter la cétose subclinique dans cet élevage, en raison d'une prévalence élevée.

## CONCLUSION :

L'appareil Optium Xceed®, utilisé sur la matrice « lait », permet la détection d'une valeur proche de la vraie valeur de la concentration en BHB dans le lait, lorsque cette concentration est supérieure à une valeur seuil de 0,0625 mmol/l. Cependant, par rapport à la mesure sur le sang, ce test présente une faible sensibilité car les valeurs de la concentration de BHB dans le lait sont souvent faibles, faiblement corrélées avec la valeur sanguine. En outre cette corrélation est d'autant plus faible que la concentration en BHB dans le sang est élevée.

Elle ne serait pas due à une absence de détection (excepté peut être pour des valeurs limites de BHB dans le sang, c'est-à-dire inférieures à 1,4 mmol/l), mais simplement à une faible concentration en BHB dans le lait malgré un état hypercétonémique pour certaines vaches.

Les valeurs des prévalences vraie et apparente que nous avons pu établir dans cette étude ont permis d'amorcer une modélisation d'un suivi d'élevage de la cétose à partir d'échantillons de lait. Néanmoins, les incidences cumulées ont été transformées en prévalences pour cette étude, comme si chaque élevage avait été prélevé une seule fois. Cela est souvent la seule procédure applicable dans les élevages français en raison de leur relative petite taille. Les prévalences estimées sont plutôt élevées et peu représentatives de la situation réelle.

Le test Ketolac® ou les tests génériques ont des valeurs de sensibilités et de spécificités meilleures que le test réalisé avec l'appareil Optium Xceed®. Néanmoins, le test Ketolac® n'est pas disponible en France, et dans plusieurs autres pays. Ainsi le test Optium Xceed® pourrait être une bonne alternative, le dosage de BHB dans le sang étant cependant plus fidèle que le dosage dans le lait.

Suite au développement des automates de traite, qui permettent le suivi individuel automatique et journalier de différents paramètres du lait, il semblerait possible à moyen terme d'y ajouter le dosage automatique du BHB dans le lait afin de déterminer le risque de cétose pour la vache, mais aussi pour le troupeau.



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Mulligan F.J., Doherty M.L.,  
*Production diseases of the transition cow.*  
The veterinary Journal, 2008, **176** : 3-9
2. Goff J.P.,  
*Major advances in our understanding of nutritional influences in bovine health.*  
Journal of Dairy Science, 2006, **89** : 1292-1301
3. Larsen T., Moller G., Bellio R.,  
*Evaluation of clinical and clinical chemical parameters in periparturient cows.*  
Journal of Dairy Science, 2001, **94** : 1749-1758
4. Imbeault D. et Noël M.,  
*L'invasion du calcium.*  
Expo-Journal, rapport interne, programme des Sciences de la nature, Cégep de Saint-Félicien,  
Saint-Félicien, 2004, 6 pages, disponible en ligne :  
<http://www.cstfelicien.qc.ca/scinat/cyberexpojournal2004/w04c02.pdf>
5. Bowen R.,  
*Endocrine Control of Calcium and Phosphate Homeostasis.*  
2003, disponible en ligne :  
<http://www.vivo.colostate.edu/hbooks/pathphys/endocrine/thyroid/calcium.html>
6. Gröhn Y.T., Erb H.N.,  
*Epidemiology of metabolic disorders in dairy cattle : associaton among host characteristics, disease, and production.*  
Journal of Dairy Science, 1989, **72** : 1876-1885
7. Schelcher F.,  
Cours de troisième année du deuxième cycle, 2006-2007
8. Block. E.,  
*Manipulating dietary anions and cations for prepartum dairy cows to reduce incidence of milk fever.*  
Journal of Dairy Science, 1984, **67** : 2939-2948
9. Fleischer P., Metzner M., Beyerbach M., *et al.*,  
*The relationship between milk yiel and the incidence of some diseases in dairy cows.*  
Journal Dairy Science, 2001, **84** : 2025-2035
10. Erb H.N.,  
*Interrelationships among production and clinical diseasen dairy cattle: a review.*  
Can Vet J, Juin 1987, **28, 6** : 326-329



11. Hardeng F., Edget V.L.,  
*Mastitis, ketosis and milk fever in 31 organic and 93 conventional norwegian dairy herds.*  
Journal of Dairy Science, 2001, **84** : 2673-2679
  
12. Lean I.J., DeGaris P.J., McNell D.M., Block E.,  
*Hypocalcemia in dairy cows: meta analysis and dietary cation anion difference theory revisited.*  
Journal of Dairy Science, 2006, **89** : 669-684
  
13. Tucker W.B., Hogue J.F., Adams G.D., *et al.*,  
*Influence of dietary cation-anion balance during the dry period on the occurrence of parturient paresis in cows fed excess calcium.*  
Journal of animal science, 1992, **70** : 1238-1250
  
14. Oetzel G.R., Fettman M.J., Hamar D.W., Olson J.D.,  
*Screening of anionic salts for palatability, effects of acid-base status, and urinary calcium excretion in dairy cows.*  
Journal of Dairy Science, 1991, **74** : 965-971
  
15. Thilsing-Hansen T., Jorgensen R.J., Ostergaard S.,  
*Milk fever control principles: a review.*  
Acta Vet. Scand., 2002, **43** : 1-19
  
16. Littledike E.T., Horst R.L.,  
*Vitamin D3 toxicity in dairy cows.*  
Journal of Dairy Science, 1982, **65** : 749-759
  
17. Vagnon D.B., Oetzel G.R.,  
*Effects of dietary cation-anion difference on the acid-base status of dry cows.*  
Journal of Dairy Science, 1998, **81** : 1643-1652
  
18. Aubadie-Ladrix,  
*Pratique de la biochimie sanguine chez la vache laitière au sein du cabinet vétérinaire.*  
In : Institut national de la recherche agronomique. Journée nationale GTV, Nantes, Paris, France, 2003, 59-67
  
19. Nordlund K.V., Garrett E.F.,  
*Rumenocentesis : a technique for collecting rumen fluid for the diagnosis of subacuterumen acidosis in dairy herds.*  
The bovine practitioner, 1994, **28** : 109-112
  
20. Plaizier J.C., Krause D.O., Gozho G.N., McBride B.W.,  
*Subacute ruminal acidosis in dairy cows: the physiological causes, incidence and consequences.*  
The veterinary Journal, 2008, **176** : 21-31
  
21. Enemark J.M.D.,  
*The monitoring, prevention and treatment of subacute ruminal acidosis (SARA) : a review.*  
The veterinary Journal, 2008, **176** : 32-43

22. Oetzel G.R., Krause K.M.,  
*Inducing subacute ruminal acidosis in lactating dairy cows.*  
Journal of Dairy Science, 2005, **88** : 3633-3639
23. Vagneur M.,  
*Acidose ruminale subaiguë : facteurs de risque zootechniques et moyens de prévention.*  
Bulletin des GTV, 2007, **41** : 35-40
24. Nordlund K.V, Garrett R.O.,  
*Herd-based rumenocentesis: a clinical approach to the diagnosis of subacute rumen acidosis.*  
Compendium Contin Educ Pract Vet., 1995, **17**, **8** : S48-56.
25. Enemark J.M.D., Jorgensen R.J., Kristensen N.B.,  
*An evaluation of parameters for the detection of subclinical rumen acidosis in dairy herds.*  
Veterinary research communications, 2004, **28** : 687-709
26. Martin C., Commun L.,  
*Mécanismes physico-chimiques de l'acidose ruminale latente et conséquences physiopathologiques.*  
Bulletin des GTV, 2007, **41** : 25-30
27. Yang W.Z., Beauchemin K.A.,  
*Altering physically effective fiber intake through forage proportion and particle length: chewing and ruminal pH.*  
Journal of Dairy Science, 2007, **90** : 2826-2838
28. Yang W.Z., Beauchemin K.A.,  
*Increasing the physically effective fiber content of dairy cow diets may lower efficiency of feed use.*  
Journal of Dairy Science, 2006, **89** : 2694-2704
29. Bramley E., Lean I.J., Fulkerson W.J., *et al.*,  
*The definition of acidosis in dairy herds predominantly fed on pasture and concentrates.*  
Journal of Dairy Science, 2008, **91** : 308-321
30. Yang W.Z., Beauchemin K.A.,  
*Physically effective fiber: method of determination and effects on chewing, ruminal acidosis, and digestion by dairy cows.*  
Journal of Dairy Science, 2006, **89** : 2618-2633
31. Bonnefoy J.M.,  
*Fourbure de la vache laitière : l'acidose est-elle la seule responsable ?*  
Bulletin des GTV, 2007, **41** : 41-48
32. Donovan G.A., Risco C.A., DeChant Temple G.M., *et al.*,  
*Influence of transition diets on occurrence of subclinical laminitis in holstein dairy cows.*  
Journal of Dairy Science, 2004, **87** : 73-84

33. Gozho G.N., Krause D.O., Plaizier J.C.,  
*Ruminal lipopolysaccharide concentration and inflammatory response during grain-induced subacute ruminal acidosis in dairy cows.*  
Journal of Dairy Science, 2007, **90** : 856-866
  
34. Oetzel G.R.,  
*Monitoring and testing dairy herds for metabolic disease.*  
Vet Clin Food Anim, 2004, **20** : 651-674
  
35. Nocek J.E., Kautzt W.P.,  
*Direct-fed microbial supplementation on ruminal digestion, health, and performance of Pre- et Postpartum dairy cattle.*  
Journal of Dairy Science, 2006, **89** : 260-266
  
36. Dann H.M., Litherland N.B., Underwood J.P., *et al.*,  
*Diets during far-off and close-up dry periods affect periparturient metabolism and lactation in multiparous cows.*  
Journal of Dairy Science, 2006, **89** : 3563-3577
  
37. Douglas G.N., Overton T.R., Bateman H.G., *et al.*,  
*Prepartal plane of nutrition, regardless of dietary energy source, affects periparturient metabolism and dry matter intake in Holstein cows.*  
Journal of Dairy Science, 2006, **89** : 2141-2157
  
38. Oetzel G.R.,  
*Herd level ketosis-diagnosis and risk factors.*  
Preconference seminar 7C : Dairy Herd Problem Investigation Strategies: Transition Cow Troubleshooting, 40<sup>th</sup> Annual conference, september 19<sup>th</sup> 2007, Vancouver, BC, Canada
  
39. Ministère de l'agriculture de l'Alimentation et des Affaires rurales de l'Ontario,  
*Fiche technique : Utilisation de la note d'état corporel dans la conduite du troupeau laitier.*  
1996
  
40. Drackley J.K.,  
*Physiological adaptations in transition dairy cows.*  
JK Drackley - Urbana - cvm.umn.edu, p. 74-87
  
41. Koundakjian P.P., Snoswell A.M.,  
*Ketone body and fatty acid metabolism in sheep tissues.*  
Biochemical Journal, 1970, **119** : 49-57
  
42. Nogalski Z., Gorak E.,  
*Relationships between the levels of blood indices in the perinatal period and the body condition and performance traits of cows.*  
Polish journal of Natural Sciences, 2007, **22**, **2** : 228-238
  
43. Emery R.S., Liesman J.S., Herdt T.H.,  
*Metabolism of long chain fatty acids by ruminant liver.*  
Journal of Nutrition, 1992, **122**, **3** : 832-837

44. Murondoti A., Jorritsma R., Beynen A.C., *et al.*,  
*Unrestricted feed intake during the dry period impairs the postpartum oxidation and synthesis of fatty acids in the liver of dairy cows.*  
Journal of Dairy Science, 2003, **87** : 672-679
  
45. Sakha M., Ameri M., Rohbakhsh A.,  
*Changes in blood  $\beta$ -hydroxybutyrate and glucose concentrations during dry and lactation periods in Iranian Holstein cows.*  
Comp Clin Pathol, 2006, **15** : 221-226
  
46. Duffield T.,  
*Subclinical ketosis in lactating dairy cattle.*  
Veterinary clinics of north america: Food animal practice, 2000, **16** : 231-253
  
47. Baird G.D.,  
*Primary ketosis in the high-producing dairy cow: clinical and subclinical disorders, treatment, prevention and outlook.*  
Journal of Dairy Science, 1982, **65** : 1-10
  
48. Andersson L.,  
*Subclinical ketosis in dairy cows,*  
Veterinary clinics of north america: Food animal practice, 1988, **4, 2** : 233-251
  
49. Sakha M., Ameri M., Sharifi H., Taheri I.,  
*Bovine Subclinical Ketosis in dairy Herds in Iran.*  
Veterinary Research Communications, 2007, **31** : 673-679
  
50. Achard T.,  
*Exploration des affections hépatiques chez la vache laitière-Apport des examens complémentaires, détermination des valeurs usuelles sanguines en ASAT, GDH,  $\gamma$ GT et bilirubine totale, application au diagnostic de l'Erlichiose bovine.*  
Thèse ENVN 2005, 105 pages
  
51. Mandevu P., Ballard C.S., Sniffen C.J. *et al.*,  
*Effect of feeding an energy supplement prepartum and postpartum on milk yield and composition, and incidence of ketosis in dairy cows.*  
Animal feed science and technology, 2000, **105** : 81-93
  
52. Nielsen N.I., Friggens N.C., Chagunda M.G.G., Ingvarsen K.L.,  
*Predicting risk of ketosis in Dairy cows using in-line measurements of  $\beta$ -hydroxybutyrate: a biological model.*  
Journal Dairy Science, 2005, **88** : 2441-2453
  
53. Moallem U., Bruckental I., Skhlan D.,  
*Effect of feeding pregnant and non lactating dairy cows a supplement containing a high proportion of non-structural carbohydrates on post partum production and peipartum blood metabolism.*  
Animal feed science and technology, 2004, **116** : 185-195

54. Duffield T.,  
*Minimizing subclinical metabolic diseases in dairy cows.*  
WCDS Advances in dairy Technology, 2006, **18** : 43-55
55. Rukkwamsuk T., Wensing T., Geelen M.J.H.,  
*Effect of fatty liver on hepatic neoglucogenesis in periparturient dairy cows.*  
Journal of Dairy Science, 1999, **82** : 500-505
56. Wright T.,  
*Déjouer la stéatose hépatique de la vache.*  
Ministère de l'agriculture de l'Alimentation et des Affaires rurales de l'Ontario, 2006
57. Rollin F.,  
*Fields tests to detect dairy cow subclinical diseases: clinical examination and pathology.*  
Congresso de ciências veterinárias (Proceedings of the Veterinary Sciences Congress) SPCV', Oeiras, 2002, 63-78
58. Smith T.R., Hippen A.R., Beitz D.C., Young J.W.,  
*Metabolic characteristics of induced ketosis in normal and obese dairy cows.*  
Journal of Dairy Science, 1997, **80** : 1569-1581
59. Douglas G.N., Overton T.R., Bateman II H.G., Drackley J.K.,  
*Peripartal metabolism and production of holstein cows fed diets supplemented with fat during the dry period.*  
Journal of Dairy Science, 2004, **87** : 4210-4220
60. Dann H.M., Morin D.E., Bollero G.A. *et al.*,  
*Prepartum intake, postpartum induction of ketosis, and periparturient disorders affect the metabolic status of dairy cows.*  
Journal of Dairy Science, 2005, **88** : 3249-3264
61. Rukkwamsuk T., Wensing T., Geelen M.J.H.,  
*Effect of overfeeding during the dry period of regulation of adipose tissue metabolism in dairy cows during the periparturient period.*  
Journal of Dairy Science, 1998, **81** : 2904-2911
62. Wright T.,  
*Le rôle des minéraux et des vitamines dans l'alimentation des vaches tarées et en période de transition.*  
Ministère de l'agriculture de l'Alimentation et des Affaires rurales de l'Ontario, 2003
63. Walsh R.B., Walton J.S., Kelton D.F. *et al.*,  
*The effect of subclinical ketosis in early lactation on reproductive performance of postpartum dairy cows.*  
Journal of Dairy Science, 2007, **90** : 2788-2796

64. Dohoo I.R., Martin S.W.,  
*Disease, production, and culling in Holstein-Friesian cows, III. Disease and production as determinants of disease.*  
Preventive Veterinary Medicine, 1984, **2** : 671-690
  
65. Rajala-Schultz P.J., Gröhn Y.T., Mc Culloch C.E.,  
*Effects of milk fever, ketosis, and lameness on milk yield in dairy cow.*  
Journal Dairy Science, 1999, **82** : 288-294
  
66. McLaren C.J., Lissemore K.D., Duffield T.D. *et al.*,  
*The relationship between herd level disease incidence and a return over feed index in Ontario dairy herd.*  
Can Vet J, 2006, **47** : 767-773
  
67. Leroux G., Guetta F., Tual-Vaurs C.,  
*Guide des analyses vétérinaires.*  
Edition Vet France, mars 2005
  
68. Xia C., Wang Z., Li Y. *et al.*,  
*Effect of hypoglycemia on performances, metabolites, and hormones in periparturient dairy cows.*  
Agricultural Sciences in China, 2007, **6, 4** : 505-512
  
69. Reist M., Erdin D., Von Euw D., Tschvemperfin K., *et al.*  
*Estimation of energy balance at the individual and herd level using blood and milk traits in high yielding dairy cows.*  
Journal Dairy Science, 2002, **85** : 3314-3327
  
70. Guatteo R.,  
*Prélèvements chez les bovins, guide illustré des procédures et gestes techniques en pratique courante. Première édition.*  
Les éditions du point vétérinaire, novembre 2007, 143 p.
  
71. Seifi H.A., Mohri M., Zadeh J.K.,  
*Use of pre-partum urine pH to predict the risk of milk fever in dairy cows.*  
The veterinary journal, 2004, **167, 3** : 281-285
  
72. Kauppinen K.,  
*Prevalence of bovine ketosis in relation to number and stage of lactation.*  
Acta vet .scand, 1983, **24** : 340-361
  
73. Andersson L., Lundström K.,  
*Milk and blood ketone bodies, blood isopropanol and plasma glucose in dairy cows; methodological studies and diurnal variations.*  
Zbl.Vet. Med. A, 1984, **31** : 340-349
  
74. Noordhuizen J.,  
*Le diagnostic de l'acidose ruminale subaiguë dans un troupeau laitier.*  
Bulletin des GTV, 2007, **41** : 31-33

75. Kleen J.L., Hooijer G.A., Rehage J., Noordhuizen J.P.,  
*Rumenocentesis (rumen puncture): a viable instrument in herd health diagnosis.*  
Dtsch Tierarztl Wochenschr, 2004, **111**, **12** : 458-462
76. Strabel D., Ewy A., Kaufmann T. *et al.*,  
*Rumenocentesis: a suitable technique for analysis of rumen juice pH in cattle ?*  
Schweiz Arch Tierheilkd, 2007, **149**, **7** : 301-306
77. Garrett E.F., Pereira M.N., Nordlund K.V. *et al.*,  
*Diagnostic methods for detection of subacute ruminal acidosis in dairy cows.*  
Journal of Dairy Science, 1999, **82** : 1170-1178
78. Duffield T., Plaizier J.C., Fairfield A. *et al.*,  
*Comparison of techniques for measurement of rumen pH in lactating dairy cows.*  
Journal of Dairy Science, 2004, **87** : 56-66
79. Enjalbert F., Nicot M.C., Bayourthe C., Moncoulon R.,  
*Ketone bodies in milk and blood of dairy cows: relationship between concentration and utilization for detection of subclinical ketosis.*  
Journal Dairy Science, 2001 **84** : 583-589
80. Nielen M., Aarts M.G.A., Jonkers Ad G.M. *et al.*,  
*Evaluation of two cowside tests for the detection of subclinical ketosis in dairy cow.*  
Can Vet J, 1994, **35** : 229-232
81. Larsen T., Nielsen N.I.,  
*Fluorometric determinaton of B-hydroxybutyrate in milk and blood plasma.*  
Journal of Dairy Science, 2005, **88** : 2004-2009
82. Siegel L., Robin N.I., McDonald L.J.,  
*New pproach to determination of total ketone bodies in serum.*  
Clinical chemistry, 1977, **23**, **1** : 46-49
83. Hansen J.L., Freier E.F.,  
*Direct assays of lactate, pyruvate, beta-hydroxybutyrate, and acetoacetate with a centrifugal analyser.*  
Clinical chemistry, 1978, **24**, **3** : 475-479
84. Nuwayhid N.F., Johnson G.F., Feld R.D.,  
*Kinetic measurement of the combined concentrations of aceto-acetate and beta-hydroxybutyrate.* Clinical Chemistry, 1988, **34**, **9** : 1790-1793
85. Nuwayhid N.F., Johnson G.F., Feld R.D.,  
*Multipoint kinetic method for simultaneously measuring the combined concentrations of aceto-acetate-beta-hydroxybutyrate and lactate-pyruvate.*  
Clinical Chemistry, 1989, **35**, **7** : 1526-1531

86. Harrisson J., Hodson A.W., Skillen A.W., Stappenbeck R.,  
*Blood glucose, lactate, pyruvate, glycerol, 3-hydroxybutyrate and acetoacetate measurements in man using a centrifugal analyser with a fluorometric attachment.*  
Journal of clinical chemistry and clinical biochemistry, 1988, **26** : 141-146
87. Maughan R.J.,  
*A simple rapid method for the determination of glucose, lactate, pyruvate, alanine, 3-hydroxybutyrate and acetoacetate on a single 20 $\mu$ L blood sample.*  
Clinica chimica acta, 1982, **122** : 231-240
88. Harano Y., Kosugi K., Hyosu T., *et al.*,  
*Sensitive and simplified method for the differential determination of serum levels of ketone bodies.*  
Clinica chimica acta, 1983, **134** : 327-336
89. Abbott diabetes care Inc.,  
*Clinical evaluation of a faster, smaller sample volume blood  $\beta$ -Ketone Test Strip.*  
Abbott diabetes care Inc., 2006, ART10927 6/06
90. Carrier J., Stewart S., Godden S. *et al.*,  
*Evaluation and use of 3 cow-side tests for detection of subclinical ketosis in early postpartum cows.*  
Journal Dairy Science, 2004, **87** : 3725-3735
91. Geishauser T., Leslie K., Tenhag J., Bashiri A.,  
*Evaluation of eight cow-side ketone tests in milk for detection of subclinical ketosis in dairy cows.*  
Journal Dairy Science, 2000, **83** : 296-299
92. Geishauser T., Leslie K., Kelton D., Duffield T.,  
*Evaluation of five cow-side tests for use with milk to detect subclinical ketosis in dairy cows.*  
Journal of Dairy Science, 1998, **81** : 438-443
93. Reist M., Erdin D.K., Von Euw D., *et al.*,  
*Use of threshold serum and milk ketone concentrations to identify risk for ketosis and endometritis in high-yielding dairy cows.*  
Am J Vet Res, 2003, **64** : 188-194
94. Melendez P., Goff J.P., Risco C.A. *et al.*,  
*Incidence of subclinical ketosis in cows supplemented with a monensin controlled release capsule in Holstein cattle, Florida, USA.*  
Preventive Veterinary Medicine, 2006, **73** : 33-42
95. Kauppinen K.,  
*Correlation of whole blood concentration of acetoacetate,  $\beta$ -hydroxybutyrate, glucose and milk yield in dairy cows as studied under field conditions.*  
Acta vet. Scand., 1983, **24** : 337-348



96. AlZahal O., Kebreab E., France J. *et al.*,  
*Ruminal temperature may aid in the detection of subacute ruminal acidosis.*  
Journal of Dairy Science, 2008, **91** : 202-207
97. Schwalm J.W., Waterman R., Shook G.E., Shultz L.H.,  
*Blood metabolite interrelationships and changes in mammary gland metabolism during subclinical ketosis.*  
Journal of Dairy Science, 1971, **55** : 58-63

## ANNEXE 1

Exemple d'un élevage laitier avec des concentrations élevés de BHB (valeur de référence : 14,4 mg/dL soit 1400 $\mu$ mol/l) : cas d'une stéatose, Données venant d'investigations faites à l'université de Wisconsin-Madison, 2004 [38]

Vache	Jours de lactation	BHBA en mg/dl
1902	5	<b>14,5</b>
2910	5	<b>25,6</b>
4176	8	<b>43,3</b>
3503	9	6,9
5293	9	<b>17,8</b>
6576	10	<b>19,9</b>
6624	11	11,3
3548	13	11
3553	13	7
4019	13	4,1
1709	14	<b>26 ,1</b>
4081	14	6,7
6662	14	<b>16,3</b>
6476	19	13,5
6681	23	<b>18,7</b>
4040	26	<b>18 ,7</b>
3579	31	8,2
4109	32	6,8

## ANNEXE 2

Exemple d'un élevage laitier avec des concentrations élevées de BHB (valeur de référence : 14,4 mg/dL soit 140 µmol/l) : cas d'une cétose de type I, Données venant d'investigations faites à l'université de Wisconsin-Madison, 2004 [38]

Vache	Jours de lactation	BHBA en mg/dl
Sheila	5	7,6
Susan	5	9
Lynn	6	4,6
Sparkle	6	7,9
Swish	7	9,8
Dimples	8	5,5
Gracie	10	4
Marcy	10	12,3
Diane	11	8,4
Tootsie	11	8,6
Sasha	15	10
Olive	19	<b>23,3</b>
Merry	20	<b>17,6</b>
Kristin	24	<b>15,7</b>
Morgan	25	<b>30,6</b>
April	31	<b>22,9</b>
Twinkle	35	4,6
Sarah	38	<b>23</b>

### ANNEXE 3

Exemple de réactifs et d'emplacement dans l'analyseur dans la méthode de Hansen *et al.*:

Molécule	Numéro d'échantillon et analyse	Disque B	Disque C
<i>BHB</i>	1. témoin négatif	Eau	Eau
	2. standard BHB 2 mmol/l	20 µl de solution de NAD 20 µl de BHB déshydrogénase	50 µl standard 500 µl tampon pH 9,5
	3. sang testé	20 µl de solution de NAD 20 µl de BHB déshydrogénase	50 l échantillon 500 µl tampon pH 9,5
<i>Acéto-acétate</i>	1. témoin négatif	Dichromate	Dichromate
	2. standard acétoacétate 0,1 mmol/l	50 µl de solution de NADH 10 µl de BHB déshydrogénase	500 µl standard 100 µl tampon pH 6,98
	3. sang testé	50 µl de solution de NADH 10 µl de BHB déshydrogénase	500 µl échantillon testé 100 µl tampon pH 6,98

### ANNEXE 4

4 substances testées : concentrations et pH des solutions

Substances	Concentration limite thérapeutique ou endogène	pH de la solution à concentration limite	Concentration testée	pH de la solution à concentration testée
Acide acétylsalicylique	2170 µmol/l	2,98	4340 µmol/l	2,78
<b>Acide lactique</b>	<b>2,2 mmol/l</b>	<b>4,86</b>	<b>11,1 mmol/l</b>	<b>2,93</b>
Acide pyruvique	103 µmol/l	3,7	228 µmol/l	3,7
Acide urique	0,41 mmol/l	4,6	1,42 mmol/l	4,33

### ANNEXE 5 : Description des prélèvements :

n° de la vache	Facteurs de risque de cétose subclinique/clinique	Date de vêlage	Date du prélèvements	MB-PS	Lactation	Origine
AUDACE		06/09/2007	22/10/2007	46	9	élevage 1
LANDES		07/09/2007	22/10/2007	45	1	élevage 1
RATINE		06/09/2007	22/10/2007	46	5	élevage 1
REGINE		04/10/2007	22/10/2007	19	5	élevage 1
RIVELAINE	Stéatose 28/09/07	29/09/2007	22/10/2007	25	4	élevage 1
ROCHE		17/09/2007	22/10/2007	10	5	élevage 1
SALIVE		10/09/2007	22/10/2008	42	4	élevage 2
SHEILA		07/10/2007	22/10/2007	15	4	élevage 1
TARZANE		12/10/2007	22/10/2007	10	4	élevage 1
TIFFANY		10/09/2007	22/10/2007	42	4	élevage 1
TOULOUSE		17/09/2007	22/10/2007	35	5	élevage 1
TRACY		29/09/2007	22/10/2007	23	3	élevage 1
UNIQUE		18/09/2007	22/10/2007	34	2	élevage 1
UNITA		13/09/2007	22/10/2007	39	2	élevage 1
URDINA		08/10/2007	22/10/2007	14	2	élevage 1
UXIE		02/09/2007	22/10/2007	50	2	élevage 1
VALLE		22/09/2007	22/10/2007	30	2	élevage 1
VANILLE		29/09/2007	22/10/2007	23	2	élevage 1
VILNUIS		25/09/2007	22/10/2007	27	1	élevage 1
VIVE		27/09/2007	22/10/2007	25	2	élevage 1
VARIETE		22/10/2007	19/11/2007	28	1	élevage 1
ANGLAISE		23/10/2008	19/11/2008	27	1	élevage 1
UGENIE		23/10/2007	19/11/2007	27	3	élevage 1
UKITA		23/10/2007	19/11/2007	27	3	élevage 1
TEMPETE		26/10/2007	19/11/2007	24	4	élevage 1
UTILE		27/10/2007	19/11/2007	23	3	élevage 1
VERNI		29/10/2007	19/11/2007	21	1	élevage 1
VADE		31/10/2007	19/11/2007	19	2	élevage 1

VANIA 5065		02/11/2007	19/11/2007	17	1	élevage 1
VAGUE		21/10/2007	19/11/2007	29	2	élevage 1
UDIE		03/11/2007	19/11/2007	16	3	élevage 1
UTELLE		05/11/2007	19/11/2007	14	3	élevage 1
UTANA		17/11/2007	17/12/2007	30	2	élevage 1
URSULA		18/11/2007	17/12/2007	29	2	élevage 1
ULYSSE	Perte de plus de 0,5 points 2 semaines après MB	20/11/2007	17/12/2007	27	2	élevage 1
ULA	Non délivrance, perte de plus 0,5 points 2 semaines après MB	20/11/2007	17/12/2007	27	2	élevage 1
VAILLANTE		26/11/2007	17/12/2007	21	1	élevage 1
VERONICA	Perte de plus 0,5 points 2 semaines après MB	02/12/2007	17/12/2007	15	2	élevage 1
VENDEE		05/12/2007	17/12/2007	12	2	élevage 1
RECONNUE	Jumeaux, perte de plus 0,5 points 2 semaines après MB	05/12/2007	17/12/2007	12	5	élevage 1
UREINE	Plus de 3 à la MB	14/12/2007	14/01/2008	31	3	élevage 1
TRACTION		15/12/2007	14/01/2008	30	4	élevage 1
SUCRETTE		20/12/2007	14/01/2008	25	4	élevage 1
ARAIGNEE		22/12/2007	14/01/2008	23	1	élevage 1
VORACE		25/12/2007	14/01/2008	20	2	élevage 1
ALYZEE	3 à la MB	27/12/2007	14/01/2008	18	1	élevage 1
ACTION		30/12/2007	14/01/2008	15	1	élevage 1
SIMONIE		31/12/2007	14/01/2008	14	4	élevage 1
VALISE		22/01/2008	11/02/2008	20	2	élevage 1
AUORE		02/02/2008	11/02/2008	9	1	élevage 1
ALYSSON		02/02/2008	11/02/2008	9	1	élevage 1
USEE	Plus de 3 à la MB	04/02/2008	11/02/2008	7	3	élevage 1
5614		28/09/2007	05/11/2007	38	1	élevage 2
1083	Mérite 2ème degré après rétention placentaire	18/10/2007	05/11/2007	18	4	élevage 2
5625		18/10/2007	05/11/2007	18	1	élevage 2
3540		26/10/2007	05/11/2007	10	2	élevage 2
4680		28/10/2007	05/11/2007	8	2	élevage 2
unique 3548		05/11/2007	03/12/2007	28	2	élevage 2
adeline 5623		06/11/2007	03/12/2007	27	1	élevage 2
vanille 4669		13/11/2007	03/12/2007	20	2	élevage 2
tournay 2603		17/11/2007	03/12/2007	16	3	élevage 2
tourteau 2607	Délivree manuellement	19/11/2007	03/12/2007	14	3	élevage 2

abricot 6191		28/12/2007	28/01/2008	31	1	élevage 2
visa 4665		17/01/2008	28/01/2008	11	2	élevage 2
albanie 5633		17/01/2008	28/01/2008	11	1	élevage 2
07 11 49	Fixation caillette le 16/10	14/09/2007	18/10/2007	34	3	ENVT
07 11 61	DCD	19/09/2007	19/10/2007	30	2	ENVT
07 11 72	DCG, césarienne	01/10/2007	23/10/2007	22	4	ENVT
07 12 66	Augmentation de production de 2,5-3kg/jour, suspicion caillette	11/11/2007	14/11/2007	3	8	ENVT
07 12 60	Vache presque sèche, DCD le 13/11	03/11/2007	15/11/2007	12	5	ENVT
07 13 00	DCG le 19/11	30/10/2007	19/11/2007	20	3	ENVT
07 12 19	DC ?	02/11/2007	22/11/2007	20	7	ENVT
07 13 72	DC ?	03/11/2007	03/12/2007	30	3	ENVT
07 13 73	EC >3 à MB, mammite, métrite	26/11/2007	03/12/2007	7	9	ENVT
07 13 77	DCD torsion	04/11/2007	04/12/2007	30	2	ENVT
07 11 86	Caillette baladeuse, perte de 0,5 points 2 semaines après MB	13/10/2007	29/10/2007	16	7	ENVT
07 14 05	Vêlage difficile	29/11/2007	13/12/2007	14	2	ENVT
07 13 73 bis	EC >3 à MB, mammite, métrite	26/11/2007	13/12/2007	17	9	ENVT
08 98	Augmentation de production de 2,5-3kg/jour	24/12/2007	21/01/2008	28	5	ENVT
08 78	DCG	/	22/01/2007		3	ENVT
08-208	DCG le 04/02	10/01/2008	05/02/2008	26	7	ENVT
08-237	DCG le 09/02 et métrite	23/01/2008	08/02/2008	16	4	ENVT
08-258	Métrite, vêlage difficile, péritonite, EC > 3 à MB	15/01/2008	11/02/2008	27	7	ENVT
08-284	DCG le 15/02/08	15/01/2008	15/02/2008	31	4	ENVT
08-291	DCG le 15/02/08	24/01/2008	15/02/2008	22	7	ENVT
08-292	Mammite 3 quartiers, EC =3	10/02/2008	19/02/2008	9	8	ENVT
08-362		/	21/05/2008		?	ENVT
PH 1	DCG	04/03/2008	17/02/2008	16	?	Clientèle
PH 2	Mammite, fièvre de lait et traitement cétose	28/03/2008	10/03/2008	18	?	Clientèle
<b>89 échantillons, 88 vaches.</b>						

ANNEXE 6 : résultats des concentrations en BHB pour tous les échantillons :

Vache	BHB sang	BHB lait	Origine
AUDACE	1,6	0	élevage 1
LANDES	1,4	0	élevage 1
RATINE	1,3	0	élevage 1
REGINE	1,3	0	élevage 1
ROCHE	0,8	0	élevage 1
SALIVE	1,3	0	élevage 1
SHEILA	1,2	0	élevage 1
TARZANE	1,4	0	élevage 1
TIFFANY	1	0	élevage 1
TOULOUSE	1,2	0	élevage 1
UNIQUE	1,4	0	élevage 1
UNITA	1	0	élevage 1
URDINA	1,1	0	élevage 1
UXIE	0,8	0	élevage 1
VALLE	1,4	0	élevage 1
VANILLE	0,9	0	élevage 1
VILNUIS	1,2	0	élevage 1
VIVE	1,2	0	élevage 1
VARIETE	1	0,1	élevage 1
UGENIE	0,9	0,1	élevage 1
UKITA	1,4	0	élevage 1
TEMPETE	0,7	0	élevage 1
VERNI	1,4	0	élevage 1
VADE	0,7	0,1	élevage 1
VANIA 5065	1,2	0	élevage 1
UDIE	0,9	0	élevage 1
UTELLE	0,2	0	élevage 1
UTANA	0,3	0	élevage 1
URSULA	0,5	0	élevage 1
VAILLANTE	0,5	0	élevage 1
VENDEE	1	0	élevage 1
TRACTION	1,1	0	élevage 1
SUCRETTE	0,8	0	élevage 1
ARAIGNEE	0,9	0	élevage 1
VORACE	1,1	0	élevage 1
ACTION	0,6	0	élevage 1
SIMONIE	1,8	0	élevage 1
VALISE	0,6	0	élevage 1
AURORE	0,6	0	élevage 1
ALYSSON	0,6	0	élevage 1
RIVELAINE	0,8	0	élevage 1
RECONNUE	0,7	0	élevage 1
UREINE	0,9	0	élevage 1
ULA	1,1	0	élevage 1
VERONICA	0,7	0	élevage 1
USEE	0,8	0	élevage 1
ULYSSE	0,3	0	élevage 1



ALYSEE	1,1	0	élevage 1
VAGUE	1,6	0	élevage 1
UTILE	1,1	0	élevage 1
ANGLAISE	0,5	/	élevage 1
TRACY	1,4	/	élevage 1
5614	3,5	0,9	élevage 2
5625	2,3	0	élevage 2
3540	2	0	élevage 2
4680	1,7	0	élevage 2
UNIQUE	3,2	0,4	élevage 2
ADELINE	1,6	0	élevage 2
VANILLE	1,2	0	élevage 2
TOURNAY	1,7	0,1	élevage 2
ABRICOT	1,6	0	élevage 2
VISA	3	0	élevage 2
ALBANIE	4,8	1,4	élevage 2
2607	0,8	0	élevage 2
1083	4,4	0,6	élevage 2
07 11 49	1,2	0	ENVT
07 12 19	0,7	0,1	ENVT
07 13 72	0,4	0	ENVT
07 14 05	0,5	0	ENVT
0 82 08	1,1	0	ENVT
07 11 61	1,2	0	ENVT
07 13 00	2,2	0,2	ENVT
0 8 78	0,7	0	ENVT
0 82 37	0,6	0	ENVT
07 11 72	2	0,1	ENVT
0 82 84	1,8	0,1	ENVT
0 82 91	2,8	0	ENVT
0 7 13 73 bis	3,1	0,2	ENVT
0 7 11 86	1,1	0	ENVT
0 82 92	0,2	0	ENVT
0 7 13 77	0,4	0	ENVT
0 8 98	0,6	0	ENVT
07 13 73	3,4	0,4	ENVT
07 12 66	1,9	0,1	ENVT
0 82 58	1,1	0,6	ENVT
0 8 3 62	0,2	0,1	ENVT
07-260	1,1	/	ENVT
PH1	7,7	0,8	CLIENTELE
PH2	0,5	0	CLIENTELE