



HAL
open science

Recherche d'indicateurs périphériques de l'acidose ruminale subaiguë chez la vache laitière

Clothilde Villot

► To cite this version:

Clothilde Villot. Recherche d'indicateurs périphériques de l'acidose ruminale subaiguë chez la vache laitière. Médecine vétérinaire et santé animale. Université Clermont Auvergne [2017-2020], 2017. Français. NNT: 2017CLFAC089 . tel-01916107

HAL Id: tel-01916107

<https://theses.hal.science/tel-01916107>

Submitted on 8 Nov 2018

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

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE
LA SANTE - AGRONOMIE - ENVIRONNEMENT

THESE

présentée pour obtenir le grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITE

Spécialité : Biologie Santé

Soutenue le **15 Décembre 2017**

Par **Clothilde VILLOT**

RECHERCHE D'INDICATEURS PÉRIPHÉRIQUES DE L'ACIDOSE RUMINALE SUBAIGUË CHEZ LA VACHE LAITIÈRE

Directeurs de thèse :

Dr Mathieu SILBERBERG (Ingénieur de recherche, INRA)

Dr Cécile MARTIN (Directeur de recherche, INRA)

Membres du jury :

Dr Veerle FIEVEZ (Professeur, Université de Ghent) : Rapporteur

Dr Corine BAYOURTHE (Professeur, ENSAT) : Rapporteur

Dr Nathalie BAREILLE (Professeur, ONIRIS) : Examineur

Dr Rafael MUÑOZ-TAMAYO (Chargé de recherche, INRA) : Examineur

Dr Guillaume CHESNEAU (Ingénieur R&D, Valorex) : Examineur

Dr Philippe MICHAUD (Professeur, UCA) : Examineur

Préparée dans l'Unité Mixte de Recherches sur les Herbivores
INRA Centre Auvergne Rhône-Alpes Theix

REMERCIEMENTS

Je remercie Mme Corine BAYOURTHE (Professeur, ENSA Toulouse) et Mme Veerle FIEVEZ (Professeur, Université de Ghent) d'avoir révisé ce travail, ainsi que Mme Nathalie BAREILLE (Professeur, ONIRIS Nantes), M. Rafael MUÑOZ-TAMAYO (Chargé de Recherche, INRA, AgroParis Tech), M. Guillaume CHESNEAU (Ingénieur R&D Valorex, Combourtille) et M. Philippe MICHAUD (Professeur, UCA Clermont Ferrand) pour leur fonction d'examineurs.

Je suis très reconnaissant envers l'INRA, et les entreprises Lallemand, Terrena et Valorex pour le financement du projet et l'accueil au sein de leur structure.

Je tiens également à remercier Mme Christelle PHILIPPEAU (Maitre de Conférence, AgroSup Dijon), Mme Frédérique CHAUCHEYRAS DURAND (Ingénieur R&D Lallemand, Theix), Mme Marie Madeleine MIALON (Ingénieur de Recherche, INRA Centre ARA Theix), Mme Cécile GUILLON (Ingénieur R&D Terrena, Ancenis), M. Guillaume CHESNEAU (Ingénieur R&D Valorex, Combourtille), M. Erminio TREVISI (Professeur, UNICATT, Piacenza), M. Cristiano CORTES (Ingénieur R&D Agrinova, Canada), M. Pierre NOZIERE (Directeur de Recherche, INRA Centre ARA Theix), qui se sont rendus disponibles lors de mes comités de thèse et qui ont fait grandir ce projet via leur implication et leur expertise.

Mais l'histoire que je vais vous raconter n'aurait jamais commencé sans les protagonistes principaux qui sont Cécile MARTIN et Mathieu SILBERBERG. Je tiens particulièrement à vous remercier et chaleureusement. Vous avez toujours été présents et avez eu un rôle encore plus grand que celui de diriger ma thèse durant 3 années.

Mat, félicitations pour ce crash test dans l'encadrement d'une thésarde, je pense qu'au vu de ce que je t'ai fait endurer, plus rien ne pourra te faire peur ! Un énorme merci pour ta disponibilité, pour avoir bien souvent fait de ce travail de thèse ta priorité, je te suis sincèrement reconnaissante pour tout. J'ai énormément appris à tes côtés d'un point de vue scientifique mais aussi humain. Mention spéciale pour m'avoir accompagnée sur tous les fronts ; collecte de pipi, tamisage de bouse, extraction des laits, balades dans les élevages du Grand Ouest..., mais aussi pour avoir supporté et enrichi mes passions (cheval et montagne) et enfin pour avoir ouvert les bières, et grillé les saucisses ! Bref, tu le sais bien, je ne vais pas résumer nos 3 ans de vie commune en quelques lignes, un énorme MERCI !

Cécile, toi aussi tu as dû développer quelques cheveux blancs avec nos ambitions quelques fois démesurées pour ce projet. La mistiquette te remercie très sincèrement pour ton soutien, tes précieux conseils et la transmission de tes connaissances. Je suis admirative de ta capacité à mener de front tous tes projets tout en restant accessible pour nous tous.

Je suis fière du trio que l'on a construit pour survivre : PeriRAPa ;)

Je remercie toutes les équipes de l'UMRH du centre de l'INRA de Theix. Mes expérimentations multidisciplinaires m'ont conduite à frapper régulièrement à la porte de chacun d'entre vous, et elle s'est toujours très gentiment ouverte. Merci à Donato et Fabienne pour les analyses infrarouges, à Anne et Emilie pour les acides gras de lait, à Marion, Anne Sophie, Agnès et Denys pour les analyses sanguines, à Benoît et Sophie pour les vitamines, à Marie Madeleine, Isabelle et Eric pour les analyses comportementales, à Lucas et Pierre pour la transmission de la base de données (et les 5 volumes de Sommet des dieux que je viens de terminer en imprimant ce manuscrit !), à Marine, Juliane, Lucette et Dominique pour les nombreux services rendus. Une mention très spéciale pour Clothilde et Guillaume, mes 2 premiers stagiaires qui ont su s'immerger dans ce projet de manière exemplaire. Encore merci à vous !

Enfin, même si physiquement moins présente, tu as toujours su m'épauler dans ce projet depuis ses balbutiements ; Christelle, je te suis très reconnaissante pour tout. Ne t'inquiètes pas, ton statut de Prof, tu ne vas pas le dégotter dans une pochette surprise mais bel et bien en épatant le jury avec tes qualités débordantes !

Je remercie spécialement Erminio et Annarita pour m'avoir accueillie à Piacenza et transmis une partie de leurs connaissances.

Enfin, rien n'aurait été possible sans le soutien de l'ensemble du personnel de la ferme expérimentale des Cèdres. J'ai vraiment pris plaisir à travailler à vos côtés, merci Sylvie, Julien, et Dominique.

Merci également à tous ceux qui ont pris le relais pour la mise en place de l'essai en fermes commerciales et notamment aux membres des équipes de Valorex, Lallemand et Terrena. Elodie, ton dynamisme et ta faculté à t'adapter à toutes situations m'ont bluffée ! Merci à Fréd, notre chef préleveur de l'INRA ! Je remercie Léa et Cécile pour leur implication et leur réactivité. Merci à Fréd et Aurélie pour leur aide précieuse et leur expertise dans le milieu des microbes. Enfin, j'exprime ma sincère reconnaissance envers tous les éleveurs qui ont accepté que l'on échantillonne « de partout » leurs animaux.

Mention spéciale pour Jonathan qui, à chaque fois que l'on se voyait, commençait systématiquement par détruire mes schémas expérimentaux. Finalement, il a toujours su trouver l'analyse statistique idéale à mettre en place pour valoriser au mieux les données. Merci d'avoir répondu à mes questions simplistes mais aussi de m'avoir permis de grandir dans ce domaine !

L'INRA :

En commençant par Marion ! Que de rebondissements en 3 ans que j'ai été très heureuse de partager avec toi. Merci pour tes précieux conseils du point de vue pro et perso. J'espère qu'on aura encore l'occasion de manger ensemble des tartes au citron !

Béné, et Marine, mes colocs de bureau en arrivant, et toujours là en partant ! Vous allez me manquer, merci pour votre présence. Morgane, ma jumelle de thèse, dans les mêmes galères aux mêmes moments, t'inquiète cette fois on va pouvoir savourer ensemble ! D'autres ont choisi de désertir avant moi, pour compléter le team de « bogoss nouveaux arrivants INRA » : merci à Antoine et Laura d'avoir contribué à ma bonne intégration en Auvergne !

A tous les sportifs du midi (Didier, Anne, Marielle, Agnès, Cécile, Charlotte...), merci pour tous ces kilomètres parcourus ensemble en espérant croiser un blaireau, en arpentant la côte de Beaune ou en tournant après l'arbre mort.

Enfin, merci à tous les habitants de passage, ou résidents des « fermentations » : Milka, Cristina (+½), Diego, Hamid, Mat, Dominique, Marine et Béné sans oublier les colonies illicites, l'accès y est limité, ce n'est pas pour rien !

L'Auvergne, on ne me l'avait pas vendue comme ça et pourtant... un bonheur cette région ! Merci à toute l'équipe du Haras de Prat, à JM, Juju et Alex pour m'avoir permis de continuer à respirer le poney pendant ces 3 ans et à Rialto pour m'avoir laissée monter sur son dos !

Notre team des Pandas à la montagne: Sim, Fanny, Viv, et Clém, on avait prévu d'écrire un livre mais je crois que les secrets resteront enfouis !

XTTR63... personne ne sait vraiment ce que ça veut dire mais en tout cas tout le monde prend du plaisir, merci à vous tous !

Merci à mon nomade volant pour me faire voyager tous les jours...

La famille :

Bon même si vous croyez encore que je passe mes journées derrière un banc d'école à réviser car je ne suis pas très communicative sur mon TRAVAIL, les fiches de résumé cachées dans ce manuscrit sont faites pour changer vos préjugés ;). Mention spéciale à Patou, Mumu, et Béa pour avoir œuvré dans le secret.

Merci à mes parents, mon frère, ma sœur et mes grands-parents, pour l'amour et l'éducation que vous me transmettez et pour votre éternel soutien. Vous êtes ma plus grande fierté et je suis ravie d'être tata² et bientôt tata³ !!!

Je vous aime de tout mon cœur.

RÉSUMÉ

Chez les ruminants, l'Acidose Ruminale SubAiguë (ARSA) est une maladie d'origine nutritionnelle qui fait suite à une perturbation des fermentations microbiennes et à une acidité anormale du compartiment ruminal. L'installation chronique de ce dysfonctionnement digestif peut avoir une incidence néfaste sur l'efficacité de production et la santé des animaux. À l'échelle de l'individu ou du troupeau, elle aura pour conséquences des retombées économiques négatives pour l'éleveur. Un des problèmes majeurs de cette maladie est qu'elle ne se manifeste pas par des signes cliniques spécifiques. A l'heure actuelle, seul le pH ruminal permet d'objectiver la maladie même si aucun indicateur de pH ne fait l'unanimité, notamment du fait des variabilités importantes liées à la technique de mesure du pH d'une part et à la susceptibilité des animaux d'autre part. Dans ce contexte, cette thèse a eu pour objectif d'améliorer le diagnostic individuel de l'ARSA chez la vache laitière en développant une approche multiparamétrique applicable sur le terrain.

Nous proposons de nouveaux indicateurs issus de cinétiques de pH mesuré de façon non-invasive avec des bolus intra-ruminaux. Ces nouveaux indicateurs relatifs, calculés quotidiennement sur les cinétiques normalisées sur 0 (NpH), sont le temps passé sous NpH $< -0,3$, l'écart type et l'amplitude. Ils permettent de pallier les fortes sources de variabilité et présentent l'intérêt d'être transposables entre études et sont plus précis pour caractériser l'ARSA. Parallèlement, nous avons développé des modèles multiparamétriques composés de plusieurs paramètres mesurés simultanément dans différents compartiments biologiques (lait, fèces, salive, sang, urine) ou sur l'animal (comportement). Leur capacité de prédiction de l'ARSA a ensuite été évaluée en élevage. Certains modèles incluant des paramètres périphériques au rumen et simples à mesurer sur le terrain présentent une bonne sensibilité (concentration en urée dans le lait, en bicarbonate dans le sang, pH salivaire), et d'autres ont une bonne spécificité (nombre de buvées de l'animal, pH fécal, concentration en urée dans le lait). Néanmoins, aucun modèle ne renferme un couple sensibilité et spécificité satisfaisant. A l'issue de ce travail nous proposons une stratégie diagnostique fondée sur 4 étapes : 1) l'analyse du contexte de diagnostic de l'ARSA, 2) l'évaluation des facteurs de risques, 3) l'évaluation des modèles multiparamétriques et 4) le calcul d'indicateurs NpH ruminiaux des individus à risque.

Mots clés : ARSA, pH ruminal relatif, modèle multiparamétrique, vache laitière

SUMMARY

In ruminants, Subacute Ruminant Acidosis (SARA) is a nutritional disease that induces an abnormal acidity of the rumen compartment as well as disturbance in microbial fermentation. When the disease becomes chronic, it can lead to negative effects on production efficiency and animal health at the individual or the herd scales, with negative economic consequences for the farmer. One of the major problems of SARA is that there are no obvious clinical signs. Presently, the only benchmark to define SARA is rumen pH. However, no pH indicator is unanimous due to the important variability related both to the measurement technique itself and to the animal susceptibility. In this context, this thesis aimed to improve the individual diagnosis of SARA in dairy cows by developing a multiparametric approach that could be used on field.

We propose new indicators of pH kinetics measured noninvasively with intra-ruminal boluses. These new relative indicators, calculated daily (kinetic normalised on 0, NpH), consist of the time spent under $NpH < - 0.3$, the NpH standard deviation and the NpH range. These indicators make it possible to overcome the strong sources of variability and have the advantage of being transposable while being more accurate to characterize SARA. At the same time, we have developed multiparametric models including a number of parameters measured simultaneously in various biological compartments (milk, faeces, saliva, blood, urine) or on animal behaviour. The models ability to predict SARA has been evaluated on field. Some models including rumen peripheral parameters (concentration of urea in milk, of bicarbonate in blood, salivary pH) have a proficient sensitivity while others have a proficient specificity (number of drinking acts, faecal pH, and urea concentration in milk). However, no model developed is both sensitive and specific enough. The diagnostic strategy we propose is based on 4 steps: 1) analysis of the SARA diagnostic context, 2) assessment of risk factors, 3) evaluation of multiparametric models and (4) determination of ruminal NpH indicators for individuals presenting a high risk of SARA.

Keywords: SARA, relative rumen pH, multiparametric model, dairy cow

LISTE DES TRAVAUX

Articles en préparation, publiés ou soumis dans des journaux à comité de lecture

- Villot C**, Meunier B, Martin C, Silberberg M, 2016. Determination of indicators of subacute ruminal acidosis based on ruminal pH kinetic in dairy cows, p. 305-308. *Rencontres autour des Recherches sur les Ruminants (23)*
- Villot C**, Martin C, Meunier B, Mialon MM, Silberberg M, 2017a. Relative rumen pH thresholds to predict subacute ruminal acidosis (SARA) in dairy cows, 8 p. *Proceeding of European Conference on Precision Livestock Farming (ECPLF) (8)*
- Villot C**, Meunier B, Bodin J, Martin C, Silberberg M, 2017b. Relative reticulo-rumen pH indicators for subacute ruminal acidosis detection in dairy cows. *Animal*, 1-10
- Villot C**, Martin C, Bodin J, Durand D, Graulet B, Ferlay A, Mialon MM, Trevisi E, Silberberg M, 2017c. Multi-parametric models of rumen peripheral parameters to diagnose subacute ruminal acidosis in dairy cows. *Journal of Dairy Science (Soumis en Octobre 2017)*
- Villot C**, Martin C, Bodin, J, Silberberg, M. Predictive capacities of multi-parametric models to diagnose subacute ruminal acidosis in dairy cows on farm. *(En préparation)*
- Villot C**, Silberberg M, Nozière P, De-Ofeu Aguiar-Prado L, Martin C, Philippeau C, Quantitative review of non-rumen parameters investigated during subacute ruminal acidosis. *(En preparation)*.

Communications scientifiques lors de congrès internationaux

- Villot C**, Philippeau C, Silberberg S. (2016) How do we diagnose SARA on farms and experimentally? Is rumen pH relevant to diagnose SARA? *WorkShop Dairy Care*. April 2016, Glasgow (UK). *(Communication orale)*
- Villot C**, Meunier B, Bodin J, Martin C, Silberberg M. (2017) Relative reticulo-rumen pH indicators for subacute ruminal acidosis detection in dairy cows. *ADSA Annual Meeting*, 24-27 June 2017, Pittsburgh (USA). *(Poster)*
- Villot C**, Martin C, Meunier B, Mialon MM, Silberberg M. (2017) Relative rumen pH thresholds to predict subacute ruminal acidosis (SARA) in dairy cows. In *European Conference on Precision Livestock Farming (ECPLF)*, 12-14 September 2017, Nantes (France). *(Communication orale)*
- Villot C**, Silberberg S. (2017) Sub-Acute Ruminal Acidosis: how to detect and face it. Scientific updates? New approaches to detect Sub-Acute Ruminal Acidosis in dairy cows. *Solvay Symposium*, December 2017, Piacenza (Italy). *(Communication orale)*

Communications scientifiques nationales

- Villot C**, (2016) Indicateurs périphériques de l'acidose ruminale subaiguë chez la vache laitière, *Journées des Doctorants de l'INRA Centre Auvergne Rhône-Alpes*, Mars 2016, Theix. (Communication orale)
- Villot C**, Meunier B, Martin C, Silberberg M. (2016) Détermination de nouveaux indicateurs de l'acidose ruminale subaiguë basés sur la cinétique d'évolution du pH ruminal chez la vache laitière. *Rencontres autour des Recherche sur les Ruminants (23)*, Décembre 2016, Paris. (Communication orale)
- Villot C**. (2017) Détermination de nouveaux indicateurs de l'acidose ruminale subaiguë basés sur la cinétique d'évolution du pH ruminal chez la vache laitière. *Journées de l'Ecole Doctorale de l'Université Clermont Auvergne*, Mai 2017, Clermont Ferrand. (Communication orale)
- Villot C**, Martin C, Silberberg M. (2017) Un indicateur de l'acidose ruminale subaiguë fondé sur le pH ruminal. *La Semaine Vétérinaire*, n°1714 et 1715, 7-14 Avril 2017. (Article de vulgarisation)

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
ÉTAT DE L'ART	7
CHAPITRE I : L'ACIDOSE RUMINALE SUBAIGUË (ARSA) CHEZ LA VACHE LAITIÈRE	8
1. Définition de l'Acidose Ruminale SubAiguë (ARSA)	8
2. Conséquences et prévalence de l'ARSA	16
CHAPITRE II : DIAGNOSTIC ET INDICATEURS DE L'ARSA	23
1. Préambule au diagnostic	23
2. Limites du pH ruminal pour diagnostiquer l'ARSA	26
3. Analyse quantitative des paramètres non ruminiaux mesurés dans des situations d'ARSA induites	33
HYPOTHÈSES ET STRATÉGIE DE TRAVAIL	64
RÉSULTATS	68
CHAPITRE III : DÉVELOPPEMENT D'INDICATEURS RELATIFS DU PH (NpH) RUMINAL POUR LE DIAGNOSTIC DE L'ARSA	69
1. Calcul d'indicateurs relatifs du pH ruminal (NpH) pour la détection de l'ARSA chez la vache laitière	69
2. Détermination des seuils de risque des indicateurs ruminiaux (NpH) pour diagnostiquer l'ARSA chez la vache laitière	71
CHAPITRE IV : DÉVELOPPEMENT DE MODÈLES DE PRÉDICTION DE L'ARSA CHEZ LA VACHE LAITIÈRE À PARTIR DE COMBINAISONS DE PARAMÈTRES PÉRIPHÉRIQUES AU RUMEN	84
1. Détermination de modèles prédictifs de l'ARSA chez la vache laitière à partir de combinaisons de paramètres périphériques au rumen	84
2. Évaluation terrain des modèles multiparamétriques prédictifs de l'ARSA chez la vache laitière	119
DISCUSSION GÉNÉRALE	140
CHAPITRE V : EST-IL POSSIBLE DE DÉFINIR UN "GOLD STANDARD" BASÉ SUR LE PH RUMINAL POUR DIAGNOSTIQUER UN ANIMAL EN ARSA ?	141
1. Mesure non-invasive d'une cinétique de haute résolution du pH ruminal	142
2. Limites et perspectives d'utilisation des indicateurs relatifs du pH ruminal (NpH)	143
CHAPITRE VI: INTÉRÊTS DES MODÈLES MULTIPARAMÉTRIQUES DANS LE DIAGNOSTIC DE L'ARSA SUR LE TERRAIN	147
1. Construction de modèles de prédiction de l'ARSA	147
2. Limites et perspectives d'amélioration des modèles développés	148
CHAPITRE VII : STRATÉGIE POUR FIABILISER LE DIAGNOSTIC DE L'ARSA SUR LE TERRAIN	151
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	155
BIBLIOGRAPHIE	158

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Différents seuils de risque du pH ruminal utilisés dans la littérature pour caractériser l'ARSA chez les ruminants _____	4
Tableau 2 : Prévalence de l'ARSA chez la vache laitière recensée dans la littérature selon différents critères diagnostiques _____	22
Tableau 3 : Organisation de la structure des tables utilisées pour renseigner chaque expérimentation de la base de données IPASAR _____	37
Tableau 4 : Répartition des expérimentations (nExpe) de la BDD IPASAR en fonction des caractéristiques des animaux utilisés _____	41
Tableau 5 : Description des différents protocoles d'inductions de l'ARSA _____	41
Tableau 6 : Caractéristiques moyennes des rations utilisées dans les traitements contrôles et acidogènes _____	41
Tableau 7 : Répartition des méthodes de mesures du pH ruminal (nExpe=93) _____	43
Tableau 8 : Valeurs moyennes de chaque indicateur pH relevé dans les 93 expérimentations de la BDD IPASAR _____	43
Tableau 9: Analyse descriptive des indicateurs pH en fonction des traitements contrôles et acidogènes _____	46
Tableau 10 (Partie1/2) : Paramètres périphériques indiquant des variations significatives des pH ruminiaux moyens ou minimums chez les vaches laitières en lactation (début) _____	49
Tableau 11: 15/20 modèles de prédiction de l'ARSA calculés avec des coefficients normalisés _____	127
Tableau 12 : Critères de risques de l'ARSA évalués en amont de l'étude selon les caractéristiques des rations et des paramètres laitiers des 16 fermes étudiées et répartis en 2 groupes FERME+ et FERME- _____	128
Tableau 13 : Classements des animaux dans les groupes ARSA+ ou ARSA- en fonction du niveau de risque de leur ferme et de leurs indicateurs NpH journaliers individuels _____	130
Tableau 14: Critères des animaux en ARSA+ et ARSA- mesurés individuellement sur les 41 animaux utilisés pour tester les modèles multiparamétriques de prédiction de l'ARSA _____	132
Tableau 15 : Capacités prédictives des différents modèles estimés par leur probabilité à prédire l'ARSA sur le terrain _____	133

LIST OF TABLE

Table 1 : Ingredients and composition of experimental diets _____	74
Table 2 : Results of rumen NpH thresholds validation for SARA detection _____	80
Table 3 : Four steps in statistical analyses of data to elaborate models for SARA detection ____	93
Table 4 (part 1/2): Dairy cow parameters affected by experimental SARA challenge _____	99
Table 5 (part 1/2) : Generalization of multiple linear regression model of selected parameters and their ability to classify animals in control, SARA and recovery periods _____	101
Supplemental Table S 1 (part 1/7). Exhaustive list of parameters analyzed during SARA challenge_____	112

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Évolution du nombre de vaches laitières en France et leur rendement _____	2
Figure 2 : Mécanismes d'absorption des acides gras volatils (AGV) et en ions hydrogène (H ⁺) à travers l'épithélium ruminal _____	11
Figure 3 : Conséquences sur le pH ruminal et l'écosystème microbien de l'apport de glucides rapidement fermentescibles en excès dans la ration. _____	14
Figure 4: Relation intra-expériences entre le taux butyreux dans le lait et le pH moyen ruminal mesuré chez des vaches laitières lors d'un challenge acidogène _____	18
Figure 5: Bolus mesurant le pH et la température ruminal et système d'acquisition des données _____	24
Figure 6 : Cinétique journalière du pH ruminal chez la vache laitière alimentée avec différents régimes _____	29
Figure 7 : Diagramme de flux utilisé pour l'analyse des données <i>in silico</i> _____	36
Figure 8 : Evolution intra-expérience du pH moyen en fonction des traitements _____	45
Figure 9 : Evolution intra-expérience du pH minimum en fonction des traitements _____	45
Figure 10 : Répartition des expérimentations en fonction des compartiments étudiés et de leur analyse combinée _____	46
Figure 11 : Fréquence des principaux paramètres étudiés _____	48
Figure 12 : Comparison between (a) raw pH kinetics (Xt) with (b) filtered and normalized NpH kinetics after signal processing. _____	76
Figure 13 : Receiver-operator characteristics (ROC) curves of NpH range, NpH standard deviation, time NpH< -0.3 and time NpH< -0.5 indicators predicting SARA or non-SARA situation in experiment #1 (n=10) _____	80
Figure 14 : Principal component analysis (PCA) of selected rumen parameters discriminating cows with SARA from cows in the control period (P1) _____	97
Figure 15 : Seuils de risque des critères laitiers et alimentaires (Sauvant et Peyraud 2010) utilisés pour catégoriser les fermes à risque (FERME+) ou non d'ARSA (FERME-) _____	123
Figure 16 : Variabilités des cinétiques de NpH ruminal de 2 vaches laitières alimentées avec un régime non acidogène _____	145
Figure 17: Stratégie de diagnostic de l'ARSA développée pour le terrain _____	150

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADF : Acid Detergent Fiber
AG : Acide Gras
AGNE : Acide Gras Non Estérifié
AGV : Acides Gras Volatils
ARSA Acidose Ruminale SubAiguë
ASC : Aire Sous la Courbe
ATP : Adénosine TriPhosphate
ATP/ADP : Ratio Adénosine TriPhosphate / Adénosine DiPhosphate
BDD Base De Données
CO₂ : dioxyde de carbone
CS : Cellules Somatiques
EDTA : Acide Ethylène Diamine Tétracétique
F:C : ratio Fourrage sur Concentré
GLM : General Linear Model (Modèle Linéaire Généralisé)
GRF : Glucides Rapidement Fermentescibles
H⁺ : ion Hydrogène
H₂O : molécule d'eau
HCO₃⁻ : ion bicarbonate
Hp : Haptoglobine
HPO₄²⁻ : ion hydrogénéorthophosphate
IPASAR : Indicateurs Périphériques de l'Acidose SubAiguë chez les Ruminants
LBP : Lipopolysaccharides Binding Protein
LH : Lithium Héparine
LPS : LipoPolySaccharides
MAT : Matière Azotée Totale
MO : Matière Organique
MS : Matière Sèche
MSI : Matière Sèche Ingérée
NADH₂/NAD : ratio Nicotinamide Adénine Dinucléotide (réduit/oxydé)
NDF : Neutral Detergent Fiber
NpH : pH filtré et Normalisé sur 0
PeriRAPa : Peripheral's Rumen Acidosis Parameters
PL : Production Laitière
SAA : Serum Amyloid A
Se : Sensibilité
SEM : Somme des Ecart Moyens
SNG : Solides Non Gras
Sp : Spécificité
TB : Taux Butyreux du lait
TB/TP : ratio Taux Butyreux/Taux Protéique du lait
TL : Taux de Lactose dans le lait
β-OH : Béta-hydroxybutyrate

INTRODUCTION GÉNÉRALE

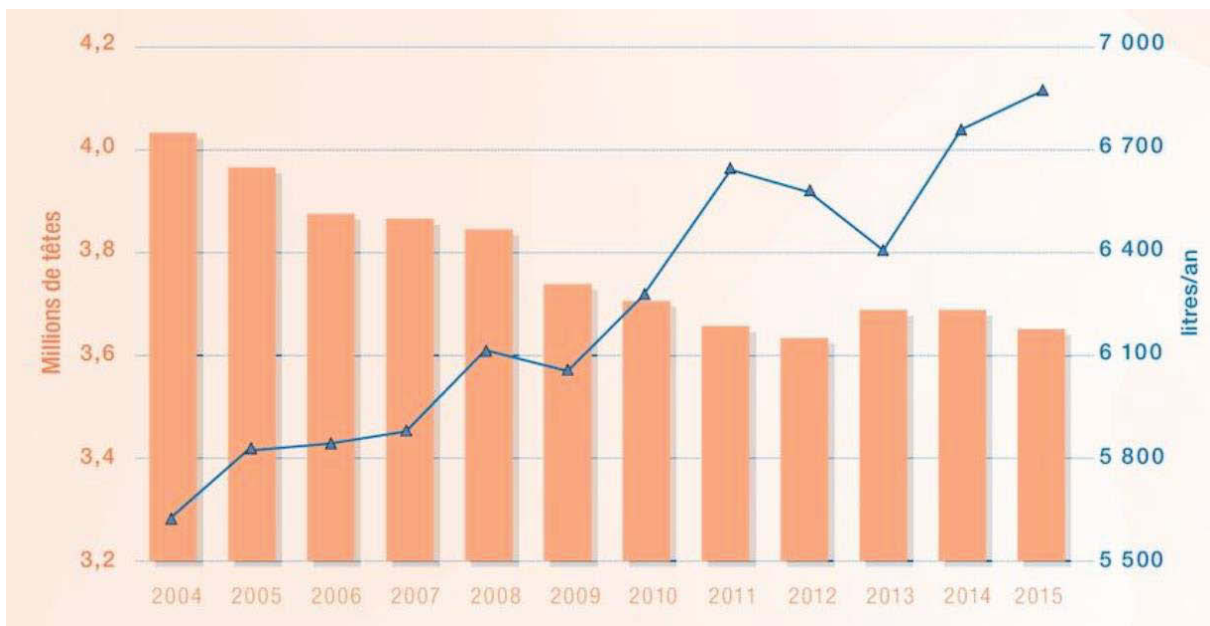


Figure 1 : Évolution du nombre de vaches laitières en France et leur rendement (CNIEL, 2017)

Introduction générale

Tout comme à l'échelle mondiale, la production laitière (**PL**) française n'a cessé d'augmenter depuis des années. Même si récemment le nombre de vaches a diminué sur le territoire Français (environ 4 millions de têtes en 2004 contre moins de 3,7 millions de têtes en 2015), les progrès en sélection génétique ont permis de compenser largement ce déficit et même d'accroître la PL individuelle des vaches (5 700 L/an en 2004 contre 6 900 L/an en 2015) (Figure 1) (CNIEL, 2017). Néanmoins leur capacité d'ingestion n'a, quant à elle, pas évolué dans la même mesure. Afin d'exploiter au maximum le potentiel génétique des vaches hautes productrices, les éleveurs utilisent l'alimentation avec des rations à haute densité énergétique. Ces régimes alimentaires sont volontairement appauvris en fibres au profit d'une forte proportion de glucides rapidement fermentescibles (**GRF**) que l'on retrouve notamment dans les céréales. Les GRF sont fermentés dans le rumen par des microorganismes produisant des acides gras volatils (**AGV**) en grande quantité (Bergman, 1990). Les limites d'absorption de ce substrat énergétique dans le rumen sont alors très vite atteintes et peuvent entraîner une chute du pH ruminal (Owens et al., 1998). Ce phénomène sera d'autant plus accentué par la faible part de fourrage grossier qui n'incite pas l'animal à mastiquer sa ration au cours de la journée et qui, par voie de conséquence, limite les apports dans le rumen de tampons d'origine salivaire. La distribution de fourrages rapidement fermentescibles peut également contribuer à la chute du pH ruminal. Cette accumulation d'acide entraîne alors des désordres digestifs (Allen, 1997) de plus ou moins grande importance en fonction de l'intensité de la chute du pH ruminal et de son instabilité journalière (Schwartzkopf-Genswein et al., 2003). La maladie nutritionnelle majeure induite par ces phénomènes, dans les élevages laitiers intensifs, est l'acidose ruminale subaiguë (**ARSA**) (Morgante et al., 2007). Sa présence est cependant souvent évoquée dans les élevages sans qu'un diagnostic précis n'ait été établi sur le terrain. Même si tous les scientifiques s'entendent sur l'apparition de valeurs anormales et répétées d'acidité au niveau du rumen pour définir l'ARSA, il est néanmoins difficile d'objectiver ce phénomène de façon non invasive dans les élevages. Le pH fluctuant de manière physiologique au cours de la journée (Keunen et al., 2002, Duffield et al., 2004), la mesure ponctuelle de ce paramètre ne permet alors pas d'obtenir une valeur représentative de ces variations. En revanche, l'étude cinétique précise du pH ruminal permet le calcul d'indicateurs journaliers révélant une image plus représentative de l'évolution de l'acidité au sein du rumen. Pour autant, aucun seuil de risque unanime pour ces indicateurs n'a encore été établi à travers les nombreuses études de l'ARSA entreprises.

Tableau 1: Différents seuils de risque du pH ruminal utilisés dans la littérature pour caractériser l'ARSA chez les ruminants

Valeur seuil pH	pH moyen	Temps passé sous pH seuil, min/j	Aire sous la courbe sous pH seuil, min/j	Etude	Espèce	Technique de mesure du pH	Type de mesure	Référence
5 - 6,8				Expérimentale	Vaches laitières	Sonde intra-ruminale	Continu	(Rustomo et al., 2006)
5,5		720		Expérimentale	Bovins allaitants	Sonde intra-ruminale	Continu	(Beauchemin et al., 2003a)
5,5	5,5			Expérimentale	Vaches laitières	Ruminocentèse	Ponctuel	(Garrett et al., 1999)
5,6		180		Synthèse bibliographique	Multi-espèces	NR	Continu	(Sauvant et al., 1999)
5,6	6,24	174	49	Expérimentale	Bovins allaitants	Sonde intra-ruminale	Continu	(Gozho et al., 2005)
5,6		495	215	Expérimentale	Bovins allaitants	Sonde intra-ruminale	Continu	(Cooper et al., 1999)
5,6	5,85	180	190	Expérimentale	Vaches laitières	Sonde intra-ruminale	Continu	(Krause and Oetzel, 2005)
5,6		283		Méta analyse	Vaches laitières	NR	Continu	(Rustomo et al., 2006)
5,5 - 5,8	5,5 - 5,8			Expérimentale	Vaches laitières	Ruminocentèse	Ponctuel	(AlZahal et al., 2007)
5,8	5,8			Expérimentale	Vaches laitières	Sonde intra-ruminale	Continu	(Nordlund and Garrett, 1994)
5,8		780	222	Expérimentale	Vaches laitières	Sonde intra-ruminale	Continu	(Duffield et al., 2004)
5,8		720		Expérimentale	Bovins allaitants	Sonde intra-ruminale	Continu	(Beauchemin et al., 2003a)
5,8		475		Méta analyse	Vaches laitières	NR	Continu	(Schwartzkopf-Genswein et al., 2003)
5,8		314,4		Méta analyse	Bovins	NR	NR	(AlZahal et al., 2007)
5,8 - 6,1	5,8 - 6,1			Expérimentale	Vaches laitières	Canule	Ponctuel	(Zebeli et al., 2008)
5,9 - 6,2	5,9 - 6,2			Expérimentale	Vaches laitières	Sonde œsophagienne	Ponctuel	(Duffield et al., 2004)
6		240		Synthèse bibliographique	Multi-espèces	NR	Continu	(Sauvant et al., 1999)
6		640	157	Terrain	Vaches laitières	Sonde intra-ruminale	Continu	(Keunen et al., 2002)
6,01		720		Méta analyse	Vaches laitières	NR	Continu	(AlZahal et al., 2007)
6,16	6,16			Méta analyse	Bovins	NR	NR	(Zebeli et al., 2008)
6,25	6,25			Synthèse bibliographique	Multi-espèces	NR	Continu	(Sauvant et al., 1999)

NR : non renseigné

Introduction générale

Les auteurs décrivent des seuils compris entre 5,5 et 6,2 pour identifier des animaux en ARSA (Tableau 1). Néanmoins les différentes fréquences, techniques de mesures et calculs utilisés pour évaluer ces indicateurs pH engendrent de fortes variabilités entre animaux, entre fermes ou entre expérimentations. Par ailleurs, l'évaluation du pH ruminal sur le terrain comporte des limites que ce soit en termes de praticité ou de rentabilité financière à l'échelle de l'exploitation. Le diagnostic de la maladie semble donc devoir être supporté par des paramètres autres que le pH ruminal mais l'absence de signes cliniques spécifiques ne facilite pas non plus la détection de l'ARSA. Même si de nombreux paramètres modifiés sont recherchés, aucun n'est suffisamment fiable et significatif pour avertir l'éleveur d'ARSA développée par ses animaux. De plus, l'apparition bien souvent tardive de signes traduisant des maladies subséquentes à l'ARSA ne permet pas d'établir un diagnostic précoce. En outre, la variabilité de réponse des animaux face à un même régime ayant initialement pour but d'induire expérimentalement l'ARSA confirme la difficulté de sa détection à l'échelle du troupeau (Schwartzkopf-Genswein et al., 2003, Gao, 2016). En effet, pour une même ration acidogène, certains animaux présenteront tous les symptômes de l'ARSA (irrégularités de l'ingestion et/ou refus alimentaires anormalement élevés, fermentations ruminales modifiées, diminution des performances de production...) associés à un pH ruminal plus acide, alors que d'autres, moins sensibles, pourront présenter un pH ruminal plus acide sans pour autant laisser apparaître d'autres symptômes de cette maladie. Enfin, les plus résistants ne seront même pas affectés par cette ration. Une évaluation de l'ARSA à l'échelle individuelle semble donc être inévitable pour objectiver précisément l'état des animaux.

Ainsi, l'objectif de cette thèse était double :

- 1) **développer des indicateurs relatifs de pH ruminal** pour caractériser l'ARSA en s'appuyant sur la technologie de capteurs ruminiaux sans fil mesurant le pH (bolus),
- 2) **développer des combinaisons de paramètres périphériques au rumen** qui soient facilement mesurables et qui aient de bonnes capacités prédictives de l'ARSA à l'échelle de l'individu sur le terrain.

Une première étape de ce travail a donc consisté à la réalisation **d'une synthèse bibliographique quantitative** des paramètres périphériques au rumen, susceptibles d'être modifiés lors d'épisodes d'ARSA. Cette revue (*Chapitre II.3*) s'est appuyée sur une base de données (**BDD**) nommée Indicateurs Périphériques de l'Acidose SubAiguë chez les Ruminants (**IPASAR**) initiée au sein de l'équipe DINAMIC de l'Unité Mixte de Recherche sur les Herbivore de l'INRA de Theix.

Puis, lors de deux expérimentations où l'acidose était induite chez des vaches en lactation équipées de bolus ruminiaux, nous avons :

- 1) déterminé de **nouveaux indicateurs relatifs du pH ruminal (NpH)**
- 2) déterminé les **seuils de risque NpH spécifiques de l'ARSA** pour chaque indicateur relatif nous permettant de **caractériser plus précisément** la maladie (*Chapitre III.1 et 2, études 1 et 2*).

Parallèlement, des paramètres périphériques au rumen sélectionnés lors de l'étude *in silico*, ont été mesurés de façon synchronisée chez 11 animaux en situation d'ARSA induite expérimentalement.

- 1) Des modèles de 2 ou 3 **paramètres périphériques au rumen** ont alors été développés pour **améliorer le diagnostic de l'ARSA** sur le terrain (*Chapitre IV.1-étude 1*).
- 2) Les **capacités prédictives** des modèles établis ont été évaluées en fermes commerciales afin de déterminer leur **sensibilité** et leur **spécificité** dans le diagnostic de l'ARSA dans les élevages laitiers (*Chapitre IV – étude 3*).

ÉTAT DE L'ART

CHAPITRE I : L'ACIDOSE RUMINALE SUBAIGUË (ARSA) CHEZ LA VACHE LAITIÈRE

1. Définition de l'Acidose Ruminale SubAiguë (ARSA)

La première formulation de l'ARSA a été présentée par Dirksen (1965) qui l'a décrite comme une acidose chronique et latente, pauvre en signe clinique spécifique et plus répandue que l'acidose lactique aiguë. Ces 2 formes d'acidose entraînent des conséquences cliniques très divergentes mais ont une origine commune qui réside dans une chute du pH ruminal chez l'animal. L'acidose aiguë apparaît généralement à la suite d'ingestion accidentellement accrue de concentrés. Des symptômes évidents permettent son diagnostic précis. Le pH ruminal chute en dessous de 5,5 (Owens et al., 1998) et entraîne une acidose métabolique faisant basculer le pH sanguin de façon irréversible pour l'animal. Cette première partie de manuscrit a pour objectif de décrire exclusivement les signes et les caractéristiques de l'ARSA qui sont quant à eux beaucoup plus subtils.

1.1. L'ARSA : une origine nutritionnelle

Des conduites alimentaires non adaptées aux besoins des vaches laitières sont la cause principale de l'ARSA. Elles concernent généralement les vaches primipares, hautes productrices avec un risque plus élevé à l'acidose en début de lactation. Il s'agit d'une phase où les vaches ont une capacité d'ingestion limitée par la taille de leur rumen alors que leur besoin énergétique ne cesse d'augmenter pour produire du lait (Stone, 2004). Les fourrages étant volumineux mais pas suffisamment énergétiques pour assurer des productions journalières supérieures à 25 L/j, les éleveurs en substituent une partie par des composés plus denses et riches en énergie tels que les céréales ou des fourrages fins rapidement fermentescibles (ensilage de maïs ou luzerne) (Plaizier et al., 2008). Des apports excessifs en substrats énergétiques et/ou de trop faibles quantités de fibres dans la ration sont des éléments favorisant la production laitière mais pouvant entraîner des problèmes de santé conséquents. Que les animaux soient conduits en bâtiment ou en système fourrager (O'Grady et al., 2008), les symptômes de l'ARSA sont bien souvent observés lorsque des erreurs de rationnement ou des transitions alimentaires brutales sont conduites (Kleen et al., 2003).

Lors de la mise à l'herbe par exemple, les animaux peuvent ingérer de l'herbe jeune peu fibreuse mais néanmoins très riche en GRF tels que les pectines. Les GRF contenant les sucres, l'amidon, les acides organiques et les pectines seront alors apportés en excès dans le rumen et ne pourront pas être correctement assimilés par les animaux qui n'auront pas eu le temps de s'adapter à ce nouveau régime (Krause and Oetzel, 2006). La nature et la somme de glucides consommés par l'animal sont les éléments déterminant la quantité d'AGV produite dans le rumen. Lorsque cette quantité excède les capacités de l'animal à absorber et à compenser l'acidité de ces molécules, le pH du rumen tend à chuter. Des rations incitant les animaux à trier leurs aliments en délaissant les fibres longues au profit des particules plus fines dès le début de leur alimentation seront moins efficaces pour compenser la production d'AGV accrue car moins de substances tampons seront produites via la salivation (Oetzel, 2007).

D'une façon générale, l'acidose ruminale peut être induite par un manque de fibres grossières et/ou un apport excessif de GRF, des phénomènes de tri des aliments, des erreurs de formulations de ration ou encore des transitions alimentaires trop brutales.

1.2. Des troubles digestifs au niveau du rumen induisant l'ARSA

1.2.1. Initiés par un déséquilibre acido-basique

Dans des conditions d'équilibre alimentaire, le pH ruminal présente une cinétique oscillant autour de valeurs physiologiques comprises entre 5,8 et 7, ce qui permet le bon fonctionnement de ce compartiment digestif (Xu and Ding, 2011). Le pH journalier physiologique moyen a quant à lui été initialement reporté entre 6,4 et 6,8 pour des vaches laitières disposant d'une alimentation riche en fourrages (Alonso, 1979). Après hydrolyse des polymères alimentaires de glucides, les monomères sont fermentés en AGV et pyruvate via la glycolyse. Les AGV sont des acides à chaînes courtes carbonés qui oscillent entre deux états en fonction du pH du milieu : l'un représente des AGV non dissociés (AGV) et l'autre représente des AGV ionisés (AGV⁻) dans le rumen. Le pH ruminal suit la loi de Henderson-Hasselbalch : $pH = pK_A + \log\left[\frac{[AGV^-]}{[AGV]}\right]$ où le pKa est la constante de dissociation des acides. Ainsi, l'équilibre entre la production des AGV, leur forme et leur disparition dans le rumen conditionne le pH de ce compartiment.

Trois voies principales sont à l'origine de la disparition des AGV dans le rumen : l'absorption des molécules à travers l'épithélium ruminal, la neutralisation par le biais de tampons et enfin le transit des AGV jusqu'aux intestins (Allen, 1997). Lorsque l'ensemble de ces 3 fonctions ne parvient pas à équilibrer l'excès de production d'AG, l'ARSA peut apparaître.

Par le biais de la fermentation microbienne de la matière organique (**MO**) dans le rumen, les AGV représentent plus de 50% de la quantité totale d'énergie digérée par les ruminants (Dijkstra et al., 1993). Les principaux AGV produits sont l'acétate (45-70% des AGV totaux), le propionate, (15-40% des AGV totaux) ainsi que le butyrate (5-20% des AGV totaux) (Bergman, 1990, Dijkstra et al., 1993) et, dans de plus faibles proportions le valérate, caproate, iso-butyrate et iso-valérate. La fermentation microbienne de ces molécules implique le transfert de molécules d'hydrogènes et génère de l'énergie métabolique sous forme d'adénosine triphosphate (ATP) qui sera par la suite utilisée pour l'entretien et la croissance microbienne. La répartition parmi les voies fermentaires est guidée par les lois thermodynamiques des ratios de cofacteurs ATP/ADP et NADH_2/NAD qui traduisent l'état énergétique et le potentiel redox du milieu (Nozière et al., 2010). Il est probable que lorsque des rations excédentaires en glucides sont distribuées, les voies de fermentations fournissant le moins d'ATP soient favorisées. Même si chaque AGV individuel peut libérer 1 H^+ , la quantité d' H^+ produite ne suit pas une fonction linéaire pendant la fermentation de différents types de glucides (Penner et al., 2011). Par exemple, 1 mole de glucose pourra produire 2 moles d'acétate, 2 moles de propionate ou seulement 1 mole de butyrate car ce dernier possède une chaîne carbonée plus longue (Bannink et al., 2006). Leur pKa étant néanmoins similaire, la production d'acide sera alors moins importante si les orientations fermentaires se dirigent vers la synthèse de butyrate en comparaison à celle de l'acétate. La proportion molaire d'AGV dépend initialement de la composition de la ration, et du niveau d'ingestion des animaux. Les différents types de glucides, les proportions en fibres et les interactions avec l'ensemble des éléments composants la ration vont impacter à la fois la production et l'activité microbienne du rumen ainsi que le taux de rétention du digesta dans le rumen. L'augmentation de la production d'acides et leur accumulation dans le rumen est le principal facteur contribuant à l'ARSA.

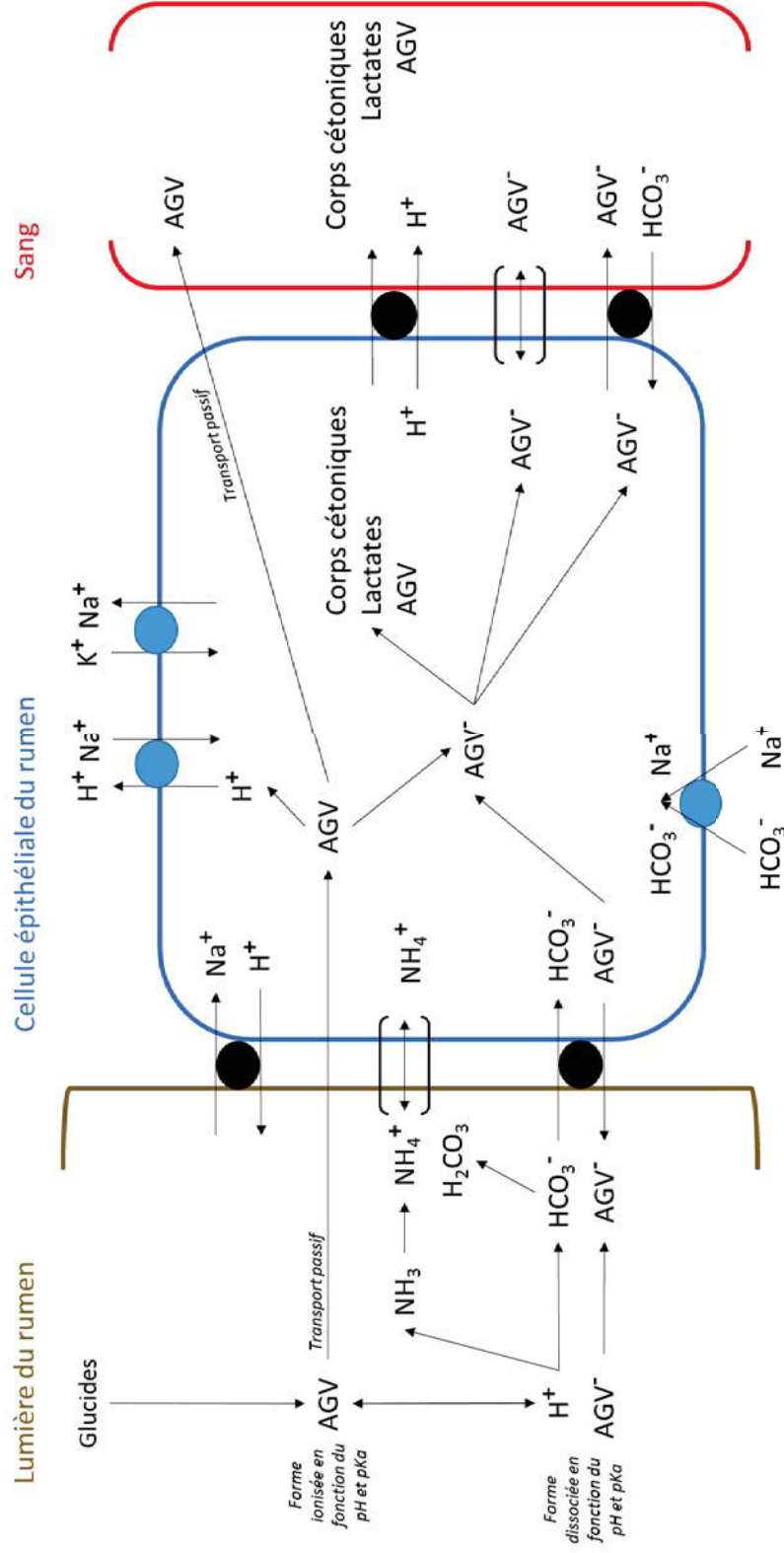


Figure 2 : Mécanismes d'absorption des acides gras volatils (AGV) et en ions hydrogène (H⁺) à travers l'épithélium ruminal D'après (Aschenbach et al., 2011).

La capacité d'absorption des AGV par le rumen joue néanmoins un rôle prédominant dans la stabilité du pH ruminal. Même si ces derniers peuvent passer directement à travers la partie distale du système digestif, entre 70 et 90% sont directement évacués vers le compartiment intracellulaire (Jarrige et al., 1995). Ces valeurs sont proportionnelles au nombre et à la longueur des papilles digestives (Stone, 2004). Ainsi la mise en place d'une transition alimentaire suffisamment longue (2 à 3 semaines), pour se diriger vers un régime énergétique après une phase de tarissement, prend toute son importance (Liebich et al., 1987). Les papilles bien souvent atrophiées par des régimes riches en fourrages, doivent retrouver leurs pleines capacités et leur surface maximale afin de pouvoir assurer l'absorption des fortes quantités d'AGV. C'est pendant ces phénomènes d'absorption (Figure 2) qu'Allen (1997) a estimé que 53% des ions hydrogènes totaux du rumen seraient éliminés selon différents mécanismes qui mettraient en jeu le transport des AGV au travers de la paroi du rumen. Deux voies principales sont utilisées pour évacuer les AGV : 1) la diffusion passive exclusivement empruntée par les AGV non dissociés, 2) un transport actif nécessitant une protéine médiatrice est quant à elle la voie privilégiée par les AGV dissociés (Aschenbach et al., 2011). Selon Penner (2009), plus de 50% des AGV sont absorbés lors du transport actif qui nécessite un échange d'ions bicarbonate (HCO_3^-) du système sanguin vers le rumen (Penner et al., 2009b). Une fois dans la lumière du rumen, les ions HCO_3^- issus de ce transfert vont former des H_2CO_3 en se liant avec les ions H^+ disponibles. Ces acides carboniques seront alors dégradés dans le rumen en eau (H_2O) et en dioxyde de carbone (CO_2). C'est donc cette accumulation de HCO_3^- provenant du sang et transférés dans le rumen qui participe à la neutralisation des ions H^+ pour limiter la chute du pH ruminal.

Les mécanismes d'absorption utilisés sont différents selon les AGV considérés et le pH du milieu conditionnant la proportion ionisée/non ionisée des molécules (Nozière et al., 2010). Le butyrate privilégie un transport passif alors que l'acétate et le propionate utilisent préférentiellement un transport actif dépendant du HCO_3^- (Gäbel et al., 1991). Lorsque les AGV sont absorbés sous forme non ionisée, ils sont dissociés dans le cytosol des cellules épithéliales du rumen en AGV et proton. Les AGV sont alors métabolisés en corps cétoniques (Rémond et al., 1995) ou en cholestérol (Steele et al., 2011). Une partie des H^+ peut également être neutralisée par des ions HCO_3^- intracellulaire, mais lorsque leur concentration déstabilise l'homéostasie de la cellule, un retour des protons vers la lumière ruminale est observé. Ce transport passif ne rend alors pas efficace le phénomène de compensation de la chute du pH ruminal.

La neutralisation de l'acidité du rumen est partiellement réalisée par la salive (37% de l'élimination de H^+ totaux selon Allen (1997)) qui contient des substances tampons telles que le HCO_3^- , phosphate, sodium et potassium (Krause and Oetzel, 2006). HCO_3^- et l'ion hydrogénoorthophosphate (HPO_4^{2-}) sont les bases les plus représentées dans la salive. Les HCO_3^- ont néanmoins la plus grande capacité tampon chez la vache (Bailey and Balch, 1961) et plus de la moitié utilisée pour neutraliser le pH du rumen est produite dans la salive par stimulation lors des phénomènes de mastication et de rumination. La quantité de salive pouvant atteindre le rumen dépend alors des activités de la vache au cours de la journée. Une sécrétion importante est observée pendant la rumination et la mastication alors qu'elle est plus faible pendant les temps de repos (Cassida and Stokes, 1986, Sauvant and Peyraud, 2010). Même si la composition chimique du fourrage ne semble pas impacter le taux de sécrétion de la salive, il semblerait que les proportions du temps passé aux activités de rumination et de mastication soient quant à elles modifiées, notamment en fonction de la taille des particules (Beauchemin et al., 2008). De nombreuses études ont ainsi démontré l'impact de la taille des particules, du ratio fourrage sur concentré ainsi que de la proportion de neutral detergent fiber (**NDF**) dans les fourrages (Bailey and Balch, 1961, Beauchemin et al., 2008) sur la sécrétion des tampons salivaires dû à un changement de comportement alimentaire. L'autre moitié des HCO_3^- ruminiaux proviendrait alors des échanges avec le sang se produisant lors de l'absorption des AGV à travers la paroi ruminale (Owens et al., 1998). Une mobilisation importante des HCO_3^- sanguins peut alors apparaître et potentiellement déstabiliser l'homéostasie du pH sanguin. Une acidose métabolique peut alors se mettre en place.

1.2.2. Observés par un dysmicrobisme ruminal

L'ARSA n'est pas seulement dépendante d'un déséquilibre du pH ruminal, elle est également le résultat de changements observés dans le rumen. Celui-ci est peuplé d'un grand nombre de populations microbiennes variées, réparties principalement en 3 catégories : les procaryotes (bactéries), les eucaryotes (protozoaires et champignons) ainsi que les archées. La chute du pH ruminal perturbe la structure de cet écosystème microbien (Figure 3). De façon générale, lors d'épisodes d'acidose ruminale, les populations gram-positives prolifèrent au détriment des bactéries gram-négatives (Nagaraja and Titgemeyer, 2007). De nombreuses études *in vivo* ont confirmé que des pH faibles inhibaient l'activité cellulolytique bactérienne (Martin et al., 2002). Ainsi la digestibilité des fibres est réduite par les faibles croissances et activités des bactéries cellulolytiques sous pH 6 (Mouriño et al., 2001).

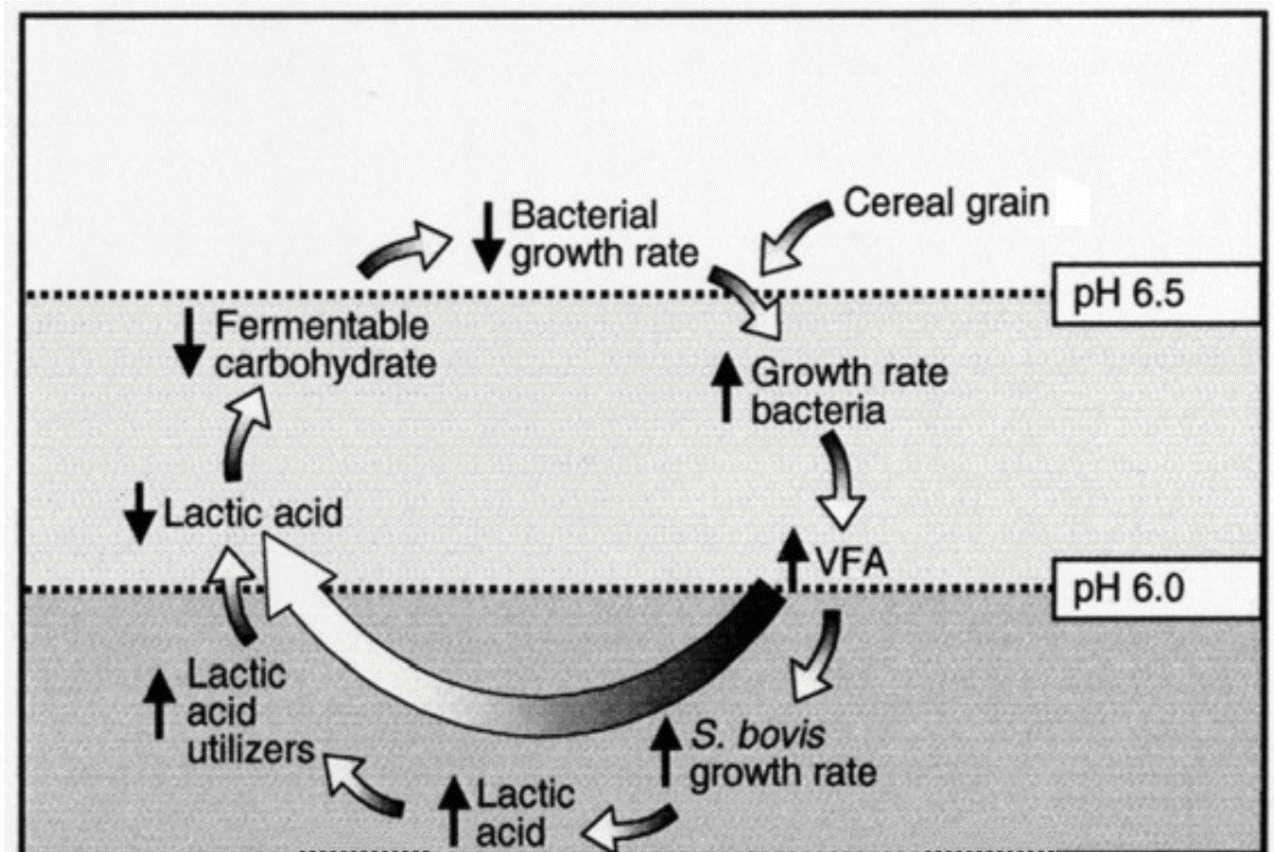


Figure 3 : Conséquences sur le pH ruminal et l'écosystème microbien de l'apport de glucides rapidement fermentescibles en excès dans la ration.

(Schwartzkopf-Genswein et al., 2003)

La mauvaise valorisation des fibres de la ration induit alors une chute de production de l'acide acétique. A contrario, il est classiquement observé une prolifération des populations amylolytiques dégradant l'amidon, et des bactéries utilisatrices de lactate telle que *Streptococcus bovis* (Lean et al., 2007). *Megasphaera elsdenii* ou *Selenomonas ruminantium* sont, elles aussi, stimulées et parviennent à métaboliser les quantités excédentaires de lactate (Stone, 2004). Mao et al. (2013) rapporte une concentration plus élevée en *Firmicutes* à l'échelle du phylum chez les vaches ayant subi un épisode d'ARSA en comparaison avec des conditions contrôles. Ainsi, l'ARSA n'est généralement pas caractérisée par une acidité issue de l'accumulation de lactate au sein du rumen (signant plutôt les cas d'acidoses aiguës) mais plutôt par une accumulation chronique des AGV (Goad et al., 1998, Martin et al., 2006). Une réorientation des fermentations en faveur du propionate (Bevans et al., 2005, Gozho et al., 2007) ou du butyrate (Brossard et al., 2004) est alors observée au détriment de la production d'acétate. Les protozoaires participent à la régulation du pH ruminal par le biais de différents mécanismes (Nagaraja and Titgemeyer, 2007). Ils sont notamment capables de modérer la digestion de l'amidon par des phénomènes de séquestration de bactéries, d'une partie de l'amidon et des sucres, ce qui contribue alors fortement à la diminution du taux de fermentation dans le rumen (Brossard et al., 2004). Malgré tout, lorsque le pH du rumen chute ($\text{pH} < 6$), leur activité et leur nombre le sont également et deviennent limités (Goad et al., 1998).

Dans ce cas, la digestion de l'amidon et la production de propionate s'accroissent (Plaizier et al., 2008). Concernant les archées et les champignons, peu d'études ont démontré leur rôle dans le phénomène d'acidose, même si certains auteurs ont observé que les champignons étaient sensibles à des chutes de pH ruminal et que leur concentration serait alors diminuée dans des conditions d'ARSA (Orpin and Joblin, 1997).

L'acidose se définit donc originellement dans le compartiment ruminal où un désordre digestif est observé sur des paramètres physiques et biologiques. Néanmoins, lorsque l'acidose est chronique (ARSA), des conséquences secondaires de cette maladie peuvent être détectées de façon clinique dans les élevages.

2. Conséquences et prévalence de l'ARSA

L'ARSA est une maladie nutritionnelle impactant fortement la santé des animaux ainsi que leur niveau de production, ce qui peut engendrer des préjudices considérables à l'échelle d'une exploitation.

2.1. Conséquences

2.1.1. Irrégularité d'ingestion et réduction de la production laitière

La matière sèche ingérée (**MSI**) étant positivement corrélée à la production laitière journalière, sa réduction a un impact délétère très rapide sur le niveau de production de l'exploitation (Dado and Allen, 1993). Dans la majorité des études où l'ARSA a été expérimentalement induite par des rations complètes, riches en GRF, une chute du niveau d'ingestion a été observée (Allen and Grant, 2000, Plaizier et al., 2008, Giger-Reverdin et al., 2014). Les caractéristiques acidogènes de la ration semblent donc jouer un rôle important dans la l'ingestion des animaux. Néanmoins les sources d'explications restent difficiles à établir. La 1^{ère} hypothèse avancée est que les rations riches en GRF, fournissent des quantités importantes de propionate qui sont métabolisées en glucose dans le foie pour combler les besoins énergétiques de l'animal. Les concentrations élevées en glucose et propionates indiqueraient alors à l'animal de réduire son ingestion en induisant une sensation de satiété (Oba and Allen, 2003). Le propionate semble alors avoir un rôle hypophagique chez les ruminants. L'augmentation de l'osmolarité serait une autre cause potentielle de la réduction de l'ingestion des animaux lors d'ARSA (Allen, 2000). L'absorption accrue des AGV produits en grandes quantités stimulerait des récepteurs sur l'épithélium ruminal, envoyant des signaux pour réduire la consommation de l'animal. Même si la cause évidente n'a pas encore été établie, il apparaît clairement que des épisodes d'ARSA ont un impact sur le niveau de production des vaches laitières, dû globalement à un inconfort digestif installé et une diminution des quantités ingérées.

2.1.2. Impact sur la qualité et la composition du lait

En France, le lait est payé au producteur en fonction de la qualité sanitaire (taux de cellules) et de sa composition en macronutriments (matières grasse et protéique) produits. Des vaches atteintes d'ARSA produiraient des laits de moins bonnes composition et qualité. De ce fait, la rentabilité économique des élevages laitiers atteints d'ARSA tendrait à diminuer. D'un point de vue de la composition, même si certains auteurs nuancent ces observations (Tajik and Nazifi, 2011), de nombreuses études ont mentionné une concentration en matière grasse diminuée dans le lait lors de l'induction de l'ARSA chez les animaux (Khafipour et al., 2009b, Guo et al., 2013). Khafipour et al. (2009b) indiquent une réduction de 0,37 % du taux de matière grasse sécrétée dans le lait des vaches où l'ARSA a été induite par un régime contenant 60% de concentrés et 33,4% d'amidon comparativement à un régime contrôle à 50% de concentrés et 26,1% d'amidon. Certains auteurs ont également trouvé des corrélations entre le pH ruminal et le taux butyreux du lait (**TB**), leurs R^2 s'échelonnant entre 0,31 et 0,86 (Allen, 1997, Krause et al., 2002b, Beauchemin et al., 2003a, Enemark et al., 2004, Enjalbert et al., 2008). En recensant 67 expérimentations évaluant le pH moyen et le TB de vaches laitières lors d'un challenge acidogène, un R^2 de 0,80 a été trouvé (Figure 4) (résultats issus de la BDD IPASAR interne à l'équipe DINAMIC). L'augmentation de l'insulinémie induite par la forte concentration en propionate dans le rumen est un élément quelque fois évoqué pour expliquer la chute du TB lorsque des régimes riches en GRF sont distribués. La forte concentration plasmatique en insuline (qui a une action lipogénique) favoriserait le stockage des acides gras (**AG**) à longue chaîne dans le tissu adipeux qui seraient alors moins disponibles pour la sécrétion des matières grasses dans le lait (Bauman and Griinari, 2003). Cependant, l'hypothèse qui prévaut à l'heure actuelle a pour point de départ une modification des biohydrogénations ruminales des AG polyinsaturés de la ration, les plus abondants dans la ration des ruminants étant les *cis*-9 18:1, 18:2 n-6 et 18:3 n-3 (Bauman and Griinari, 2003). En effet, les rations riches en amidon entraînent un abaissement du pH ruminal et les biohydrogénations de ces AG de la ration conduisent à une forte production d'isomères *trans*-10 (car la voie des *trans*-10 est en partie réalisée par une ou plusieurs bactéries amylolytiques). Ces intermédiaires *trans*-10 ont un effet (*trans*-10, *cis*-12 C18 :2 et *trans*-9, *cis*-11 C18 :2), ou sont associés à (*trans*-10 C18 :1) un effet antilipogénique dans la glande mammaire (Piperova et al., 2000, Perfield et al., 2007, Shingfield et al., 2010). Même si l'étiologie de la chute du TB semble s'expliquer, des recherches restent encore nécessaires pour valider les hypothèses proposées (Zebeli and Ametaj, 2009).

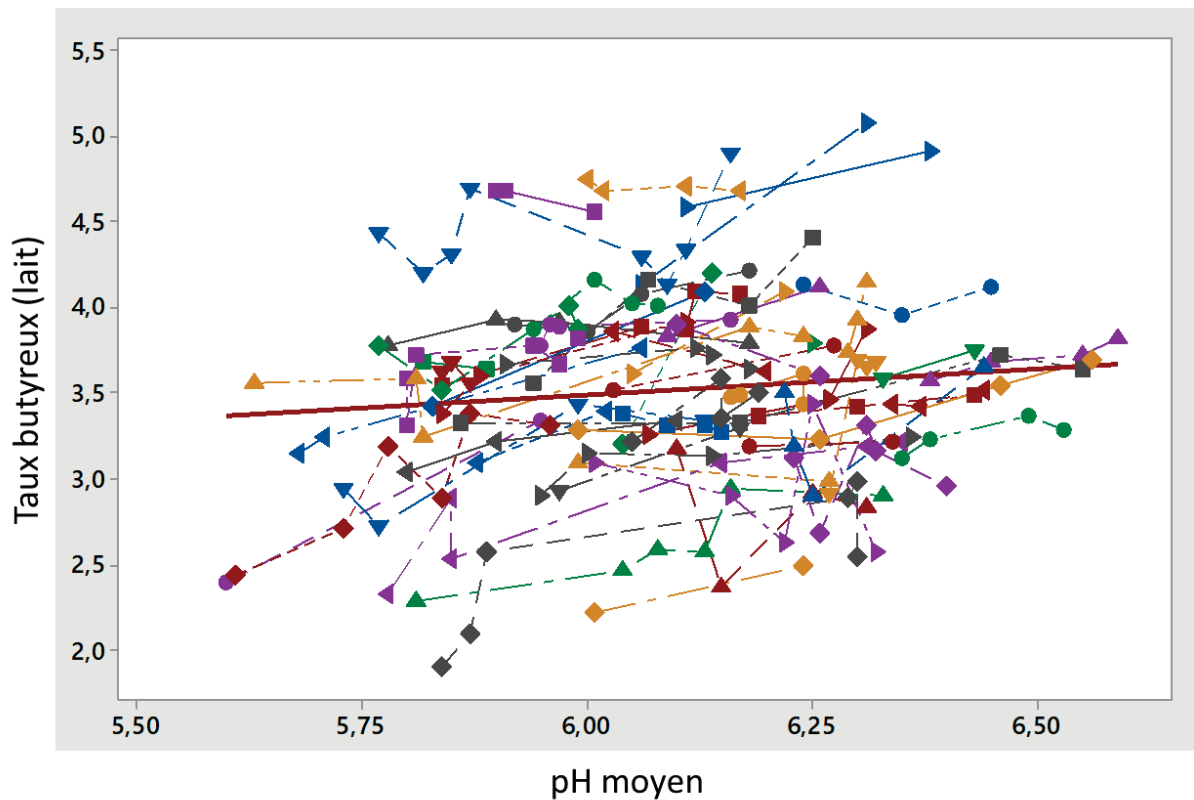


Figure 4: Relation intra-expériences entre le taux butyreux dans le lait et le pH moyen ruminal mesuré chez des vaches laitières lors d'un challenge acidogène

Chaque symbole représente la valeur moyenne des animaux dans un traitement. Les traitements conduits dans la même expérimentation sur les mêmes animaux sont reliés entre eux par des lignes. La ligne rouge représente l'ajustement linéaire de la réponse moyenne en intra-expériences $TB = 1,677 + 0,3023 \times \text{pH moyen}$, $n\text{Trt} = 204$, $n\text{Expe} = 57$).

D'après BDD IPASAR ($n\text{Expe} = 67$)

Enfin, dans le travail de thèse de Colman (2012), de nombreuses données ont été compilées afin de mettre en évidence des marqueurs de l'ARSA issus des AG du lait chez la vache laitière. Des modèles linéaires comportant les AG ramifiés pairs et les intermédiaires en C18 de la biohydrogénation ruminale seraient les marqueurs les plus prometteurs pour prédire correctement l'ARSA (Colman et al., 2015). Ainsi, le lait apparaît comme un échantillon pouvant potentiellement renfermer de nombreux indicateurs de l'ARSA chez la vache laitière.

2.1.3. Une santé animale altérée

De façon plus globale, des désordres digestifs tels que l'ARSA vont avoir un impact néfaste sur la santé des animaux et par conséquent sur la gestion et la pérennité économique des élevages. De nombreuses synthèses sur la maladie ont recensé l'ensemble des troubles secondaires dans lesquels une chute du pH ruminal était impliquée (Martin et al., 2006). Des diarrhées récurrentes entretenues par des régimes riches en amidon ont très souvent été mentionnées dans les études conduites sur l'ARSA (Dirksen, 1965, Nordlund et al., 1995, Oetzel, 2000). La forte osmolarité (Garry, 2002) au sein du rumen et les fermentations post ruminales de l'amidon non digéré (Oetzel, 2000) sont les principales explications d'excrétions de bouses liquides et bulleuses. L'activité accrue de la flore amylolytique au détriment de la cellulolytique a pour conséquence un appel d'eau qui contribue à déstructurer la paroi du rumen et à diminuer la viscosité de son contenu. Les bouses liquides, luisantes et jaunâtres, voire mousseuses, souvent observées en cas d'ARSA sont liées à cet appel d'eau mais aussi à la fermentation des fibres non digérées dans le rumen au niveau du gros intestin (Enjalbert, 2006). Des boiteries récurrentes ont également régulièrement été observées dans des troupeaux atteints d'ARSA réduisant leurs déplacements (Nocek, 1997). En effet, un lien entre la prévalence des boiteries et la quantité d'amidon dans les rations distribuées aux animaux a été démontré (Oetzel, 2000). Elles peuvent alors impacter négativement le déplacement des animaux qui réduiront leurs visites à l'auge entraînant une chute de la MSI et consécutivement une chute de la production laitière des animaux. La fertilité sera elle aussi diminuée pour les mêmes raisons alors que le nombre de réformes sera augmenté (Nordlund et al., 2004).

Enfin un animal présentant des inflammations au niveau des membres est beaucoup plus propice au développement de maladies opportunistes (Nelson and Cattell, 2001). L'origine de ces boiteries est encore incertaine mais il est supposé que des endotoxines ruminales produites lors de la lyse des bactéries gram-négatives dans le rumen (bactéries cellulolytiques) se retrouvant dans le sang soient la cause de l'inflammation du derme podal (Nocek, 1997, Gozho et al., 2007, Enemark, 2008). En effet, la perméabilité à travers la paroi ruminale semblerait être augmentée dans des situations d'acidose. Les cellules épithéliales constituant les papilles de la paroi ruminale ont été observées comme très sensibles aux variations de pH (Krause and Oetzel, 2006). D'ailleurs, une récente étude *in-vitro* a mis en évidence que les jonctions serrées intercellulaires de la paroi ruminale étaient endommagées lorsque l'ARSA a été induite par la combinaison d'un pH faible et d'une forte concentration en AGV à chaîne courte (Meissner et al., 2017). La perméabilité de la paroi ruminale est alors altérée et des molécules pro-inflammatoires telles que les endotoxines produites dans le rumen peuvent favoriser le développement de ruménite et éventuellement l'érosion et l'ulcération de la paroi du rumen. Finalement, le passage dans la circulation générale de bactéries, profitant de l'altération de la paroi du rumen, telles que *Fusobacterium necrophorum* et *Trueperella pyogenes* pourraient être responsable de la formation d'abcès au niveau hépatique (Nocek, 1997, Plaizier et al., 2008). Ces atteintes sanitaires vont potentiellement être responsables d'une réduction de l'ingestion, d'une perte de poids et d'une mauvaise efficacité alimentaire chez les animaux conduisant à de faibles performances zootechniques (Nagaraja and Chengappa, 1998).

L'ensemble de ces conséquences physiopathologiques renferment de nombreux signes cliniques identifiables sur le terrain. Cependant l'absence de spécificité de ces paramètres ainsi que leur apparition très souvent retardée par rapport à l'initiation de la maladie, ne leur génèrent pas de bonnes qualités d'indicateurs pour le diagnostic de l'ARSA.

2.2. Prévalence

La prévalence d'une maladie est une mesure de l'état de santé d'une population qui dénombre les cas de malades sur une population déterminée à un instant donné. Une synthèse des résultats d'études épidémiologiques, conduites dans le monde depuis 2002 sur la prévalence de l'ARSA ainsi que ses facteurs de variation, est présentée dans le Tableau 2. Elle a été initiée à partir des résultats présentés pendant la thèse de Marguet (2015) portant sur l'épidémiologie de l'ARSA. Entre 11 et 42% des fermes seraient touchées par l'ARSA à l'échelle mondiale alors qu'au sein d'un seul troupeau moyen, la prévalence individuelle pour la maladie oscillerait entre 7,60 et 29,3%. Il est néanmoins assez délicat de statuer clairement sur une valeur de prévalence moyenne de cette maladie au vu de ces résultats. Effectivement, de grandes sources de variation ne nous permettent pas d'obtenir des valeurs comparables entre elles. Les populations enquêtées possèdent des caractéristiques très différentes, ce qui rend délicat l'interprétation des résultats. La taille des troupeaux, le type de ration utilisée, le stade de lactation et le niveau de production des animaux, ainsi que le nombre d'animaux étudiés par ferme sont autant d'éléments connus pour potentiellement impacter la prévalence de l'ARSA. L'autre élément important de variation dans la détermination de l'ARSA réside dans les critères utilisés pour diagnostiquer la maladie. En effet, 7 études ont utilisé la mesure du pH ruminal à un instant donné pour obtenir des indicateurs de l'ARSA basés sur des seuils de risque alors que 4 autres études se sont basées sur la composition du lait et notamment le ratio taux butyreux/taux protéique (**TB/TP**), la valeur TB-TP ou encore des indicateurs non validés tel que le ratio des AG du lait pairs/AG du lait impairs ($p/i = (C4:0 + C6:0 + C8:0 + C10:0 + C12:0) / (C5:0 + C7:0 + C9:0 + C13:0)$).

L'absence de consensus pour le diagnostic de l'ARSA rend délicat la compilation des études épidémiologiques menées jusqu'à présent. Il est alors difficile de statuer quant à la prévalence de la maladie chez la vache laitière de façon générale.

Tableau 2 : Prévalence de l'ARSA chez la vache laitière recensée dans la littérature selon différents critères diagnostiques

Etude	Période d'étude	Localisation	Nb de troupeaux	Nb de VL moyen, /troupeau	Nb de VL prélevés, /troupeau	PL moyenne, kg (305j)	Type de ration	Nb de VL prélevés au total	Stade de lactation, jours	Mesure du pH ruminal	Nb d'heures après le repas	Indicateur individuel	Indicateur troupeau	Prévalence* individuelle, %	Prévalence* troupeau, %
(Morgante et al., 2007)	2007	Italie	10	525	12	10000	C	67	5-30	R	4-8	pH < 5,5	> 33%	NR	30
(Bramley et al., 2008)	2008	Australie	100	NR	8	NR	C ou SC	683	0-100	R	4-6 ou 2-4	pH ≤ 5,5	NR	7,60	NR
(O'Grady et al., 2008)	2008	Irlande	12	95	12	8 114	Pâturage	144	80-150	R	6	pH < 5,5	≥ 25%	11	25
(Kleen, 2004)	2002-2003	Pays Bas	18	87	5-19	8600	SC	117	0-25	R	3	pH ≤ 5,5	≥ 33%	11,1	11
(Tajik et al., 2008)	2009	Iran	6	969	0-12	NR	C	75	3-20	R	4-6	pH ≤ 5,5	≥ 25%	29,3	NR
(Kitkas et al., 2013)	2012	Grèce	12	280	12-15	NR	C	153	10-90	R	5-8	pH ≤ 5,5	≥ 25%	15,7	33
(Kleen et al., 2013)	2013	Allemagne	26	73	11-14	8 600	SC	315	1-136	R	3-5	pH ≤ 5,5	≥ 25%	20	42
(Herman, 2012)	2013	France	60 600	40	Toutes	5 300	Aléatoire	4,29 M	60 600	NA	NA	TB-TP ≤ 3	NR	NR	18,7
(Gantner et al., 2016)	2001-2013	Croatie	9201	NR	NR	NR	NR	130104	10 150	NA	NA	TB/TP ≤ 1 et 20 < PL < 43 kg/j	NR	19-20,5 19-22,5	NR
(Marguet, 2015)	2014	France	242	61	Toutes	NR	Aléatoire	14 789	197	NA	NA	TB/TP < 1,05	≥ 20%	9,9	11,1
(Vlcek et al., 2016)	2013-2016	Slovaquie	4	NR	NR	2380 (68 jours)	NR	188	0-30 30-60 60-90 90-130 130-160	NA	NA	p/i < 40	> 5%	10,1	41,2

p/i = ratio des acides gras du lait pairs/impairs = (C4:0 + C6:0 + C8:0 + C10:0 + C12:0 / C5:0 + C7:0 + C9:0 + C13:0)

VL = Vaches Laitières, Nb = Nombre, R= Ruminocentèse, SGO = Sondage Gastro-Œsophagien, NR = Non Renseigné, C = Complète, SC= Semi-Complète, PL = Production Laitière, prévalence = nombre de positifs (en fonction de l'indicateur) / nombre prélevés, %

CHAPITRE II : DIAGNOSTIC ET INDICATEURS DE L'ARSA

1. Préambule au diagnostic

Bien que l'ARSA ait été décrite depuis de nombreuses années dans la littérature, son diagnostic reste délicat et controversé. Etymologiquement le terme diagnostic se réfère à *gnosis* (connaissance, discernement) et *dia* (à travers), ce qui signifie la connaissance à travers des signes. Selon Sournia (1995), il s'agit plus précisément de l'identification de la nature et de la cause de l'affection par l'interprétation de signes plus ou moins extérieurs. Le diagnostic est donc à la fois un travail de réflexion et de collecte de données. Son résultat sera par ailleurs accompagné d'une justification de la démarche médicale conduisant à la proposition d'un traitement. Plusieurs étapes peuvent composer le diagnostic : reconnaître l'état de la maladie et le nommer, déterminer comment elle est survenue et expliquer pourquoi elle s'impose à l'individu.

Trois étapes principales composent ce processus dans les élevages laitiers :

- 1) L'éleveur repère des souffrances ou des troubles chez l'animal : il s'agit de l'observation de symptômes qui sont donc subjectifs et spécifiques ou non d'une maladie.
- 2) L'éleveur fait appel à un vétérinaire qui va récolter l'anamnèse du sujet malade, l'examiner et qui recherche des signes objectifs de maladies quantitatifs ou qualitatifs.
- 3) La combinaison de ces données, les unes liées à la complexité de l'individu lui-même, les autres dues aux connaissances techniques et intellectuelles du vétérinaire, vont aboutir à l'élaboration du diagnostic.

Dans cette thèse, des données exhaustives pouvant contribuer au diagnostic de l'ARSA ont été recherchées. Nous avons donc choisi d'employer les termes sémantiques transversaux suivants :

Le mot **paramètre** désigne une variable prise en compte pour une mesure, un dosage ou un calcul permettant de caractériser un état (Larousse, 2015). Combiné au mot **périphérique**, les paramètres sont alors restreints à des variables qualifiables, estimables ou quantifiables de façon non-invasive permettant de caractériser un état mais qui ne sont pas forcément spécifiques de ce dernier. Dans ce manuscrit, les **paramètres périphériques** représentent de façon simple et abrégée des variables **non ruminales**, suspectées d'être impactées en cas d'ARSA. Elles doivent être mesurées de façon non-invasive chez l'animal mais ne sont pas obligatoirement spécifiques à l'ARSA.

Le terme périphérique englobe alors des variables pouvant être analysées dans différents **compartiments** : le sang, l'urine, les fèces, la salive et le lait. Par souci de clarté, les données recueillies sur le comportement général et alimentaire de l'animal sont regroupées dans la catégorie comportement et ce dernier est également assimilé à un compartiment à part entière.

Le mot **variable** désigne quant à lui un élément qui peut prendre des valeurs différentes chez l'individu. Il est utilisé dans ce manuscrit lorsqu'un traitement mathématique est appliqué aux paramètres ou aux indicateurs de l'ARSA.

Le mot **indicateur** sert à désigner ou révéler un phénomène de façon précise. En épidémiologie, il s'agit d'ensemble de données quantitatives et qualitatives obtenues par des enquêtes visant à établir l'état de santé moyenne d'une population. A l'échelle de l'individu, nous avons fait le choix de réserver ce terme pour des paramètres combinés ou non qui caractérisent de façon précise l'ARSA. Les principaux indicateurs étudiés dans cette thèse sont des **indicateurs du pH ruminal** ainsi que des **paramètres périphériques au rumen** permettant un diagnostic précis de l'ARSA.

Le mot **bolus** (Figure 5) caractérise un dispositif télémétrique sans fil dégluti par la vache qui fournit des mesures continues et précises du pH, et de la température à l'intérieur du réticulum. Il enregistre des données à intervalles d'une minute et calcule des moyennes toutes les 15 minutes pour fournir 96 lectures par jour. Ces données sont stockées sur le bolus et peuvent ensuite être récupérées à distance via un mobile positionné à 30 cm du réticulum.

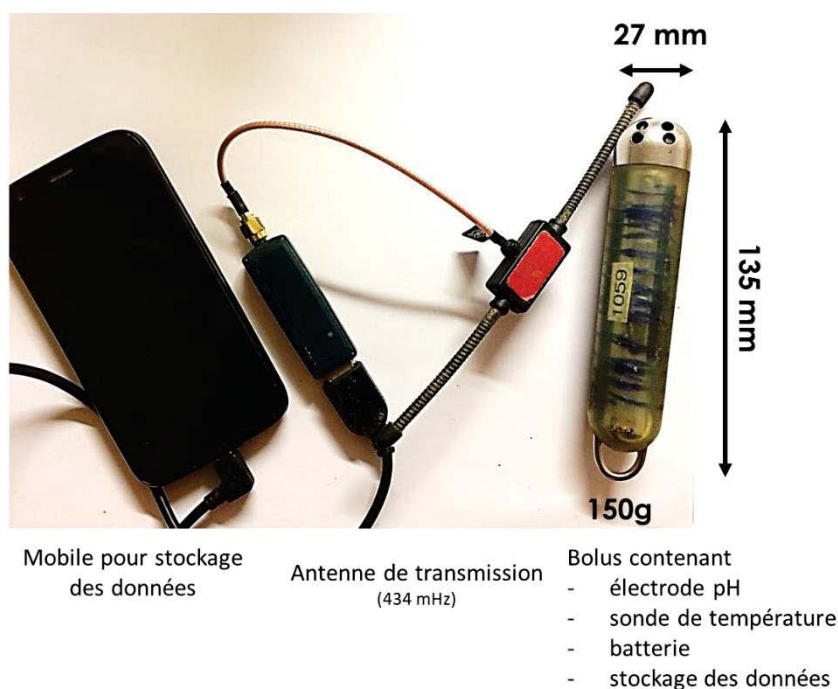


Figure 5: Bolus mesurant le pH et la température ruminal et système d'acquisition des données

Un diagnostic précis d'une maladie se caractérise par des sensibilités et des spécificités élevées. Ces 2 éléments sont évalués lors d'un test diagnostique ce qui permet de confirmer ou d'infirmier la maladie.

La **sensibilité (Se)** des indicateurs se réfère à leur capacité à bien identifier les animaux en ARSA lorsque la maladie est induite. Une forte sensibilité est très importante quand les indicateurs sont utilisés pour détecter une maladie grave mais facilement traitable.

La **spécificité (Sp)** des indicateurs se réfère à leur capacité à bien identifier les animaux non atteints d'ARSA lorsqu'ils sont effectivement sains. Une forte spécificité sera recherchée lorsque la maladie à diagnostiquer est moins grave mais que le traitement est lourd à mettre en place. A titre d'exemple, un diagnostic de l'ARSA avec une grande Se et une faible Sp va détecter la majorité des animaux malades lorsqu'ils sont en ARSA mais il va aussi détecter des animaux malades alors qu'ils ne sont pas en ARSA (faux positifs). Dans ce cas, le diagnostic permet de détecter de façon très exhaustive tous les malades mais d'autres éléments devront être apportés pour confirmer la maladie chez les vrais positifs et l'invalider chez les faux positifs.

2. Limites du pH ruminal pour diagnostiquer l'ARSA

2.1. Variation des indicateurs pH en fonction de la localisation des mesures

Une des premières sources de variabilité de ces indicateurs réside dans le choix de la méthodologie d'évaluation du pH ruminal qui peut affecter à la fois la localisation de la mesure au sein du rumen ainsi que la fréquence de mesure. La mesure du pH peut être réalisée selon des techniques *ex-vivo* ou *in-vivo*.

Ex-vivo

Un expérimentateur peut prélever du contenu au sein du rumen de l'animal pour mesurer le pH immédiatement avec un pH-mètre sur un échantillon collecté. Les prélèvements peuvent alors être effectués par sondage gastro-œsophagien, ruminocentèse, ou via des animaux canulés au niveau du rumen. Ces techniques ont respectivement un caractère invasif croissant. Le sondage gastro-œsophagien prélève du jus ruminal directement dans le rumen grâce à un tube en passant par l'oropharynx. La localisation du prélèvement de jus ruminiaux est alors dépendante de l'angle et de la longueur de la sonde insérée dans l'animal. La technique de ruminocentèse décrite par Nordlund and Garrett (1994) consiste quant à elle à aspirer avec un trocart au niveau du sac ventral, du jus de rumen de l'animal. Enfin les prélèvements par la canule ruminale sont majoritairement réalisés via l'échantillonnage en 4 points au sein du rumen : cranio-ventral, caudo-ventral, centre, cranio-dorsal (Garrett et al., 1995). Le contenu est alors filtré immédiatement pour mesurer le pH sur le jus ruminal. A l'heure actuelle, cette dernière méthode, en plus d'être la plus invasive, est massivement décriée par la société et ne peut en aucune manière être systématisée en élevages laitiers.

In vivo

Les outils *in-vivo*, que ce soient les sondes intra-ruminales (seuls les animaux canulés du rumen peuvent en être équipés) ou les bolus (capteurs ruminiaux sans fil), sont placés au sein du rumen et peuvent alors être tributaires de la motricité du rumen. Différents types de bolus ont été développés et certains ont la capacité de flotter au sein du rumen via des ailettes semi-rigides (bolus Kahne, NZ) alors que d'autres sont lestés et iront théoriquement se placer précisément au niveau du réticulum chez l'animal (bolus eCow, UK). De façon générale, les prélèvements *in-vivo* semblent indiquer des valeurs de pH plus élevées que les mesures effectuées *ex-vivo*. Au sein des techniques *in-vivo*, (Falk et al., 2016) ont trouvé un pH plus élevé de + 0,24 unité pH pour des bolus positionnés au niveau du réticulum en comparaison à des sondes filaires lestées et placées dans le sac ventral du rumen de vache canulées.

Néanmoins, ces bolus semblent renseigner des valeurs très bien corrélées aux mesures effectuées par prélèvement au niveau de canules ruminales ($r=0,986$) (Sato et al., 2012). *Ex-vivo*, les prélèvements par canule ruminale auraient des valeurs de pH plus élevées que celles obtenues par des sondes pH immergées ou ruminocentèse dans le sac ventral. Ainsi, Smith (1941), Dado and Allen (1993) ont reporté un pH plus élevé respectivement de + 0,28 et + 0,11 unités pH dans les échantillons prélevés par canule comparé au pH mesuré par les sondes immergées et de + 0,28 (Garrett et al., 1995) et + 0,33 unités pH (Duffield et al., 2004) comparés à des échantillons provenant de ruminocentèse. Les mécanismes expliquant les valeurs plus élevées du pH mesuré sur des échantillons prélevés à la canule ne sont pas complètement compris. Certains auteurs suggèrent que de potentielles dépressions dans la seringue pendant la ruminocentèse seraient la cause d'une augmentation artificielle du pH sur l'échantillon par l'aspiration de CO₂ (Smith, 1941). Les mesures de pH par sondage gastro-œsophagien tendent à montrer que le jus ruminal aurait quant à lui des valeurs plus élevées que celles mesurées par ruminocentèse ($\text{pH}_{\text{ruminocentèse}} = -0,6116 + 1,03 \cdot \text{pH}_{\text{sonde}}$, $r = 0,58$, $n = 5$ vaches, et 20 prélèvements) (Keefe and Ogilvie, 1997). Néanmoins, dans de nombreuses études, la mesure du pH ruminal par sondage gastro-œsophagien semble être moins répétable (Duffield et al., 2004, Guatteo, 2004). Une variabilité du pH allant de 0,6 à 1,7 unité pH a été mise en évidence sur 5 vaches prélevées par sondage et par ruminocentèse (Guatteo, 2004). La contamination par la salive contenant des substances tampons lors du sondage pourrait être une source d'explication de ce pH plus variable et plus élevé. Bien que certaines sondes soient fabriquées de façon à ne s'ouvrir que dans le rumen, Dirksen and Smith (1987) estiment à 10% (en volume) la contamination salivaire des prélèvements réalisés avec ce type de sonde. Enfin le positionnement hasardeux de la sonde dans le sac ventral du rumen (70% des cas sur 5 vaches et 75 prélèvements) pourrait renforcer la variabilité de la mesure (Steiner et al., 2015). De nombreuses études ont également reporté la présence d'un gradient de pH au sein du rumen pouvant impacter la valeur de ce paramètre en fonction de l'emplacement des mesures. Lane et al. (1968) a été le premier à révéler des pH plus faibles au niveau du centre et de la surface du rumen (respectivement 6,20 et 6,04 unité pH), alors que des pH élevés ont été mesurés sur des échantillons prélevés à la canule au niveau du réticulum, et du sac ventral du rumen (respectivement 6,45 et 6,36 unité pH). Plus récemment, Kimura et al. (2012) a confirmé ces observations avec des mesures réalisées en continu à l'aide de sondes pH au niveau du réticulum, du centre et du sac ventral du rumen (respectivement 6,8, 6,5, 6 unités pH chez des vaches alimentées par des fourrages et 6,6 ; 5,8 et 5,9 pour des vaches en ARSA).

2.2. Variation des indicateurs pH en fonction de la fréquence de mesure

La fiabilité des données recueillies sur le pH ruminal dépend à la fois de la localisation de la mesure du paramètre mais également de l'heure et la fréquence où les mesures sont réalisées au cours de la journée (Dijkstra et al., 1993, Krause and Oetzel, 2006, Dragomir et al., 2008).

Le sondage gastroœsophagien, la ruminocentèse ou les prélèvements par canule ruminale sont des techniques qui comportent un caractère invasif pour les animaux chez qui l'on souhaite mesurer le pH ruminal. Par conséquent le nombre de mesures journalières est souvent restreint et la dynamique du pH dans ce compartiment n'est que partiellement reflétée. Or, il a été démontré que l'évolution du pH ruminal au cours de la journée serait une des clefs pour apprécier l'état d'ARSA chez les animaux (Plaizier et al., 1999). Des cinétiques journalières précises de pH ruminal permettent en effet de calculer des indicateurs renfermant des informations plus fiables sur ce paramètre. Ainsi, le pH minimum, le temps passé ou l'aire sous la courbe (**ASC**) sous un pH seuil sont des indicateurs de plus en plus décrits dans la littérature pour caractériser l'ARSA (Nocek et al., 2000, Krause et al., 2002a, Beauchemin et al., 2003a, Gozho et al., 2005). Woodford and Murphy (1988) ont révélé que des régimes différents n'ont pas impacté le pH moyen journalier alors que les ASC sous certains pH seuils ont été modifiés. Dans la même idée, Krause and Combs (2003) ont démontré plus précisément que le type de fourrage affectait certains indicateurs pH sans que le pH moyen journalier n'ait été modifié (Figure 6). Ainsi, l'étude sur 16 vaches laitières a permis de calculer des indicateurs pH lorsque des rations à base de mélange d'ensilages de maïs et luzerne ou à base d'ensilage de maïs étaient distribuées. Il a été reporté que le pH moyen ne variait pas significativement (5,9 vs 5,8 respectivement) entre ces 2 régimes alors que le temps passé sous pH 5,8 (8,9 vs 11,5 h/jour respectivement), l'ASC sous pH 5,8 (2,6 vs 4,4 respectivement) étaient, quant à eux, significativement plus important lorsque la ration à base d'ensilage de maïs et de luzerne était distribuée aux animaux. Le pH minimum (5,5 vs 5,3 respectivement) était quant à lui significativement plus faible avec la ration à base de mélange d'ensilages de maïs et luzerne. Par conséquent, l'étude dynamique du pH ruminal semble être la méthode la plus appropriée pour apprécier précisément le pH des animaux et ainsi obtenir des indicateurs robustes pour caractériser l'ARSA (Penner et al., 2007). Les premiers essais de mesure du pH en continu ont vu le jour dans les années 50 au départ chez des bovins (Lampila, 1955) puis chez les moutons (Matscher et al., 1957). Des électrodes de verre immergées et filaires permettaient de réceptionner les données à l'extérieur d'animaux canulés. Initialement, de courtes périodes de suivi du pH étaient possibles à cause principalement du milieu hostile qu'est le rumen pour ce genre d'appareillage.

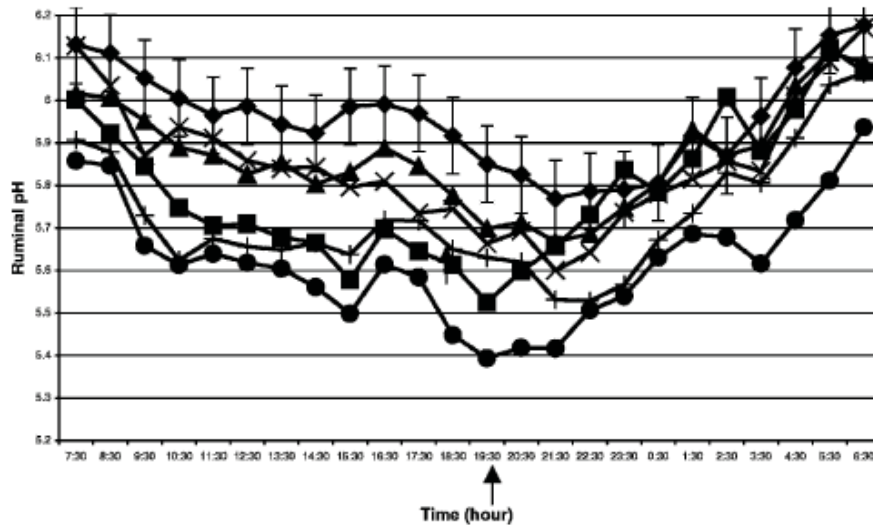


Figure 2. Diurnal fluctuations in ruminal pH for diets differing in forage particle size, level of ruminally fermentable carbohydrate and forage source. Arrows indicate time of feeding. DCCA: +; DCCAC: ■; DCFA: ▲; DCFAC: ×; HMCAC: ○; HMCFAC: ●. DCCA = dry cracked shelled corn and coarse alfalfa silage, DCCAC = dry cracked shelled corn and coarse alfalfa/corn silage, DCFA = dry cracked shelled corn and fine alfalfa silage, DCFAC = dry cracked shelled corn and fine alfalfa/corn silage, HMCCAC = ground high-moisture shelled corn and coarse alfalfa/corn silage, HMCFAC = ground high-moisture shelled corn and fine alfalfa/corn silage.

Figure 6 : Cinétique journalière du pH ruminal chez la vache laitière alimentée avec différents régimes

(Krause and Combs, 2003)

Des contaminations ou un colmatage avec des protéines ou des graisses au niveau des électrodes ont souvent été observés (Galster, 1991). Des nettoyages et des calibrations régulières des électrodes étaient donc inévitables au risque d'observer une dérive majeure des mesures, rendant cette technique complexe à mettre en œuvre. De plus, les sondes immergées nécessitent des animaux appareillés de canules ruminales, ce qui sous-entend que ce type de mesure ne peut être réalisé sur des animaux d'élevage. Chez les petits ruminants, Penner et al. (2009a) ont été, à notre connaissance, les premiers à décrire un capteur ruminal pouvant mesurer en cinétique et transmettre les données collectées à distance sans avoir recours à des animaux canulés. Depuis, de nombreux bolus sont apparus sur le marché présentant des caractéristiques plus ou moins différentes en termes de mesure, de facilité d'utilisation, de robustesse et de durée de vie. A l'heure actuelle, quelques compagnies semblent saisir le marché avec des produits proposant les mêmes services avec cependant des particularités. Les bolus provenant de l'entreprise Dascor™ (Dascor, Escondido, CA) ont certainement été les premiers à être évalués par des scientifiques (Penner et al., 2006) mais ils restent prioritairement utilisés à des fins de recherches. Leur limitation résidait dans une absence de collectes de données automatisées. En parallèle, d'autres compagnies ont su produire des bolus en plus grandes séries et fournir des systèmes efficaces de télémétrie (SmaXtec animal care GmbH, Graz, Austria - Kahne Limited, New Zealand - eCow Ltd., Exeter, Devon, UK - Well Cow_{LM}, Roslin, UK - Moow, Hungary). Une autre limite de ces outils réside dans leur durée de vie souvent bien trop courte. Les industriels garantissent une fiabilité des mesures entre 60 à 90 jours en fonction des produits. Même si certains prétendent une durée de 3 ans (Moow), leur évaluation scientifique n'a encore jamais été exposée. Combiné au coût relativement élevé de ces bolus, (prix moyen public : 400€ TTC) il semble que ces outils ne soient pas encore complètement adaptés à une utilisation en routine sur le terrain.

Ces nouveaux outils tendent à se démocratiser et permettent l'utilisation de données issues de cinétiques précises du pH ruminal des animaux, ce qui serait un grand bénéfice pour renforcer la fiabilité des indicateurs pH utilisés à l'heure actuelle pour caractériser l'ARSA.

2.3. Variabilité de réponse des animaux face à des challenges acidogènes induits

La variabilité de réponse des animaux face à un déséquilibre du pH ruminal est probablement un autre challenge de taille à appréhender pour renforcer la fiabilité des indicateurs pH calculés. En effet, quelques études ont déjà observé que, soumis à un même régime alimentaire, les animaux peuvent néanmoins avoir des réponses différentes en terme d'impact sur leur pH ruminal et sur leur niveau de production et leur santé.

La race des animaux ainsi que leur stade physiologique sont des critères souvent mentionnés comme ayant un impact sur leur susceptibilité à l'ARSA (Penner et al., 2007). Ainsi selon l'étude *in silico* menée en amont de cette thèse, le pH ruminal moyen mesuré lors de différents challenges d'ARSA, chez des bovins à l'engraissement (nombre d'expérimentations = 3, nombre d'animaux = 12) était de 5,8 avec une amplitude journalière allant de 4,9 à 7,0 unité pH. Quant à celui mesuré dans chez les vaches laitières en lactation, il était de 6,1 avec une amplitude allant de 5,4 à 6,7 unité pH (nombre d'expérimentations = 67 et nombre d'animaux = 237). Les vaches en transition subissent des changements métaboliques et hormonaux drastiques en réponse à la forte demande énergétique qu'induisent le développement du fœtus, la mise bas, puis la lactation (Drackley, 1999). Ces changements augmentent le risque d'exposition des animaux à des maladies métaboliques telles que l'ARSA juste avant et après le vêlage. Ce phénomène sera davantage accentué chez les vaches primipares qui sont fortement sollicitées d'un point de vue énergétique alors que leur capacité d'ingestion est limitée autour du vêlage. Les animaux sont alors alimentés avec des rations riches en GRF mais la capacité d'absorption des AGV au sein du rumen est potentiellement très vite limitée chez les primipares comparée à celle des multipares. Krause and Oetzel (2006) ont d'ailleurs démontré que les vaches primipares avaient de plus forts risques d'ARSA comparé aux multipares.

L'historique de chaque individu peut également avoir un impact sur la dynamique de leur pH ruminal. Par exemple, Monteils et al. (2012) ont démontré que, chez la vache laitière, des challenges acidogènes répétés impactaient plus fortement les modifications de l'écosystème ainsi que les fermentations et activités enzymatiques au sein du rumen. Dohme et al. (2008) ont trouvé des résultats similaires et ont observé des pH ruminiaux plus bas après les 2^{èmes} et 3^{èmes} périodes acidogènes aussi bien pour des vaches à forts qu'à faibles risques d'ARSA.

Le comportement général et alimentaire des animaux a également été souvent observé comme un facteur impactant les réponses et les susceptibilités des animaux à des inconforts digestifs induits. Leurs facultés plus ou moins développées à balancer une acidité dans le rumen par un régime riche en GRF pourrait résider dans leur capacité à modifier leur ingéré en réduisant leur quantité ingérée ou en réduisant la taille de leurs repas pour mieux répartir l'ingestion sur la journée (Schwartzkopf-Genswein et al., 2003). Dans une autre étude, cette différence de susceptibilité à l'ARSA a aussi été reportée malgré le fait qu'elle n'apparaisse pas dépendante de la composition bactérienne du rumen (Mohammed et al., 2012), ce qui diffère des résultats obtenus par Weimer et al. (1999). Un comportement alimentaire sélectif a aussi été observé dans une étude conduite sur 24 vaches laitières par Leonardi and Armentano (2003). Les taux de sécrétion salivaire (Bailey and Balch, 1961), les capacités d'absorption d'AGV à travers l'épithélium ruminal (Gäbel et al., 1991) ainsi que les cinétiques de digestion ou les taux de passage des aliments dans le rumen sont autant de critères pouvant faire varier la susceptibilité des animaux face à l'ARSA.

L'aspect génétique pourrait expliquer cette capacité à résister à des pH ruminiaux faibles. Chen and Oba (2012) ont évalué sur 17 bovins allaitants que l'expression de certains gènes capables de reconnaître des coproduits bactériens, serait plus manifeste chez des animaux présentant des pH ruminiaux moins diminués (pH = 5,89, 6h après le repas) que d'autres animaux (pH= 4,93, 6h après le repas) soumis au même régime acidogène.

Au vu de ces données, il apparait alors évident que le diagnostic de l'ARSA ne peut pas uniquement reposer sur l'évaluation du pH ruminal de l'animal. Les changements chroniques, induits à l'échelle du rumen vont dans la majorité des cas, engendrer des conséquences secondaires qu'il est possible d'appréhender dans des compartiments périphériques au rumen. De plus cette maladie ayant une origine nutritionnelle, l'étude de la composition des régimes distribués aux animaux s'avère un élément d'investigation primordial pour diagnostiquer la maladie (Calsamiglia et al., 2012).

3. Analyse quantitative des paramètres non ruminiaux mesurés dans des situations d'ARSA induites

QUANTITATIVE REVIEW OF NON RUMEN PARAMETERS INVESTIGATED DURING SUBACUTE RUMINAL ACIDOSIS

C. Villot^{1,2,3,4}, M. Silberberg¹, P. Nozière¹, L. De-Ofeu Aguiar-Prado¹, C. Martin¹, C. Philippeau^{1,5}

¹UMR1213 Herbivores, INRA, VetAgro Sup, Clermont Université, Université de Lyon, F-63122 Saint-Genès-Champanelle, France

²Lallemand Animal Nutrition, F-31702 Blagnac, France

³Valorex, La Messayais, F-35210 Combourillé, France

⁴Terrena, La Noëlle, F-44150 Ancenis, France

⁵AgroSup Dijon, F-21079 Dijon Cedex, France

Corresponding author: mathieu.silberberg@inra.fr

Current address: INRA, UMR1213 Herbivores, F-63122 Saint-Genès-Champanelle, France

En préparation pour Animal

La seconde partie bibliographique exposée ci-après a été initiée par Lucas De Ofeu Aguiar Prado avec la création d'une base de données (**BDD**) nommée indicateurs périphériques de l'acidose subaiguë chez les ruminants (**IPASAR**) pendant un stage de Master 2 au sein de l'équipe DINAMIC, UMR Herbivores, INRA Theix. Lors de ma première année de thèse, cette BDD a été enrichie et un article a été rédigé sous forme de synthèse bibliographique quantitative en co-écriture avec Christelle Philippeau. Le but a été de recenser de façon la plus exhaustive possible tous les paramètres affectés par l'ARSA qu'ils soient spécifiques ou non mais qu'il serait nécessaire d'étudier pour éventuellement les faire passer au stade d'indicateurs en les associant entre eux.

Cet article servira de base pour la rédaction d'une publication dans un journal anglophone à comité de lecture sous le format d'une synthèse bibliographique quantitative.

INTRODUCTION

L'ARSA est une maladie nutritionnelle fréquente chez les ruminants à haut potentiel de production recevant des rations à forte densité énergétique (Kleen et Cannizzo, 2012). Par les baisses de performances laitières (Allen, 1997, Enemark *et al.*, 2004, Sauvante et Peyraud, 2010), de performances de reproduction (Martin *et al.*, 2006) et les complications infectieuses et inflammatoires (Plaizier *et al.*, 2012, Zebeli et Metzler-Zebeli, 2012) pouvant accompagner cet état, l'ARSA engendre des frais vétérinaires élevés ainsi que des réformes précoces des animaux entraînant alors des pertes économiques importantes dans les élevages (Stone, 1999).

A partir de certaines caractéristiques alimentaires, il est possible de prévoir le risque acidogène moyen d'un lot d'animaux (Sauvante et Peyraud, 2010, González *et al.*, 2012). Néanmoins, pour une même conduite alimentaire, de fortes variations individuelles de sensibilité à l'état d'ARSA dont l'origine n'est pas définie précisément ont été mises en évidence (Leonardi et Armentano, 2003, Gao et Oba, 2014, Wiese, 2017). La détection des cas d'ARSA en élevage reste alors difficile. Elle est définie classiquement par des chutes du pH ruminal provenant d'une quantité importante d'acides produite par des fermentations microbiennes stimulées dans le rumen. Cette acidité devient alors de plus en plus difficile à tamponner et un déséquilibre acido-basique s'établit (Dijkstra *et al.*, 1993). Néanmoins, les choix d'indicateurs du pH et de leur valeur seuil permettant de poser un diagnostic de l'ARSA ne font pas consensus (Tableau 1, p.4).

Aussi, même si on assiste au développement de capteurs permettant de mesurer le pH ruminal de façon plus précise par des techniques non invasives (Reis *et al.*, 2014), l'utilisation en routine de ces outils nécessite encore des validations (Lohölter *et al.*, 2013, Gasteiner *et al.*, 2015, Neubauer *et al.*, 2017) et n'est économiquement pas viable, à l'heure actuelle, pour les exploitations commerciales du fait du coût prohibitif des bolus intra-ruminaux. Bien que l'ARSA ne présente pas de signes spécifiques, des symptômes traduits par la modification de certains paramètres accompagnant cet état pourraient servir d'indicateurs afin de préciser le diagnostic de la maladie (Li *et al.*, 2012). Nous faisons donc l'hypothèse que l'observation simultanée d'un faisceau de paramètres non spécifiques permettrait de renforcer la spécificité et la sensibilité du diagnostic individuel de l'ARSA. Ainsi, en vue d'identifier les paramètres pouvant servir d'indicateurs périphériques de l'ARSA, l'objectif de cette étude est, d'une part, de recenser dans la bibliographie l'ensemble des paramètres mesurés de façon non invasive dans les expérimentations ayant utilisé des régimes acidogènes et, d'autre part, de préciser ceux étant indicateurs de variations de pH ruminal, seul indicateur de référence.

MATERIEL ET METHODES

Pour recenser les publications d'intérêt, la BDD IPASAR interne à l'équipe a été prioritairement utilisée et le processus de sélection est synthétisé sur la Figure 7. Cette BDD fut créée en interrogeant les BDD bibliographiques de plateformes éditoriales (Science Direct et PubMed) à partir des mots clés suivants : « SARA » or « acidosis » or « high concentrate » or « high starch » or « high fermentable carbohydrate » (dans le résumé, le titre ou les mots clefs) ET « rum*pH » (dans tous les champs). Les publications entre 1996 et 2013 étaient déjà renseignées dans IPASAR et nous l'avons alors enrichie selon la même méthode avec les publications publiées entre 2013 et 2016. Nous avons alors sélectionné les publications à partir d'IPASAR qui rapportaient sur les mêmes groupes d'animaux, les critères suivants :

- une détermination du pH ruminal moyen à partir d'une mesure en cinétique comprenant au moins 4 points par jour,
- une variation significative de pH ruminal moyen entre au moins deux traitements au sein d'une même expérimentation,
- la mesure d'au moins un paramètre périphérique. Ce dernier a été défini de la façon suivante : déterminé de façon non invasive directement en élevage (poids, données comportementales...), ou mesuré ou analysé à partir d'échantillons pouvant être collectés facilement en élevage dans différents compartiments (ration, sang, salive, lait, fèces, ou urines).

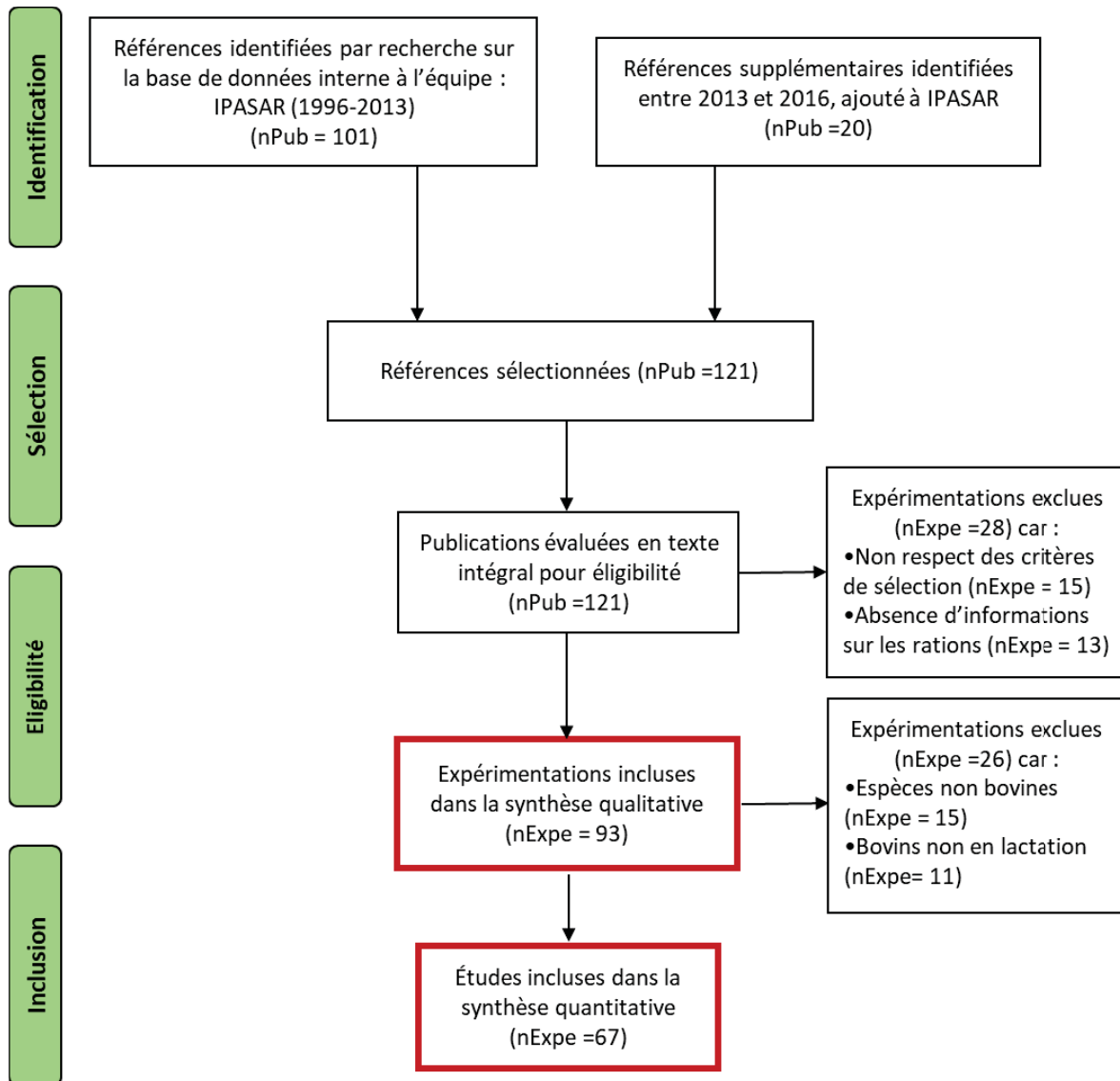


Figure 7 : Diagramme de flux utilisé pour l'analyse des données *in silico*

nExpe : nombre d'expérimentations, nPUB : nombre de publications, IPASAR : Indicateurs Périphériques de l'Acidose Ruminale Subaiguë
 D'après Moher et al. (2009).

Tableau 3 : Organisation de la structure des tables utilisées pour renseigner chaque expérimentation de la base de données IPASAR

1) TABLE PUBLICATION	5) TABLE COMPOSITION CHIMIQUE RATION
Code « Expe » Auteurs Titre Source Article associé Commentaires	Code « Expe » N°Trt Expe Critère Mesuré Unité Valeur Obtention Commentaires
2) TABLE EXPE	6) TABLE pH
Code « Expe » Plan Expe Type de Protocole	Code « Expe » N°Trt Expe pH pH méthode pH fréquence Heures/repas pH site de mesure
3) TABLE TRAITEMENTS	7) TABLE RESULTATS
Code « Expe » N°Trt Expe Nom Trt Régime %Concentrés Rythme des repas Régime <i>ad lib</i> ? Fourrage dominant Concentré dominant Additif	Code « Expe » N°Trt Expe Critère Site de mesure Unité Valeur Valeur de dispersion Type de dispersion Obtention Commentaires
4) TABLE ANIMAUX	
Code « Expe » N°Trt Expe Espèce Nombre Animaux Sexe Stade Physiologique Poids	

Le code « Expe » est l'identifiant commun à chaque table.

Expe : Expérimentations, Trt : Traitement, IPASAR : Indicateurs Périphériques de l'Acidose Ruminale Subaiguë

N.B. Les expérimentations testant un additif avec des propriétés potentiellement tampons n'ont pas été retenues.

Des données qualitatives sur chaque lot d'animaux ont été enregistrées telles que l'espèce (ovin, bovin et caprin), le sexe et le stade physiologique. Afin de recenser de façon exhaustive les publications d'intérêt, la recherche bibliographique a été réalisée sur tout type de ruminants et tout type de production. Chaque traitement a été caractérisé à la fois par une description détaillée de la ration et par le schéma expérimental employé. Des données quantitatives (pourcentage de concentré ; nombre de repas), qualitatives (matières premières dominantes et mode de distribution) et la composition chimique précise de chaque ration a été rapportée à partir des données disponibles. Concernant le pH, il a été précisé la méthode de mesure, la durée d'étude journalière ainsi que le nombre de points de mesures par jour. Pour chaque paramètre périphérique, la valeur moyenne par traitement et la valeur de dispersion ont été enregistrées. Les conditions de mesure de ces paramètres n'ont pas été prises en compte dans cette analyse.

Méthodologie de l'extraction des données /Codage des expérimentations

Toutes les citations des publications ont été importées via le logiciel End Note® (Thomson Reuters, New York, USA). Le logiciel Microsoft Excel® (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) a été utilisé pour classer et organiser les données de chaque publication en accord avec Sauvart et al. (2008). Un codage systématique et unique de chaque expérimentation « Expe » a été utilisé et était composé des 3 premières lettres du nom du 1^{er} auteur de la publication en majuscule, suivies des 2 derniers chiffres de l'année de publication. Si plusieurs expérimentations étaient décrites au sein d'une même publication, une lettre minuscule était ajoutée juste à la suite du code «Expe ». Pour différencier les différents traitements au sein d'une expérimentation, un code supplémentaire « Trt » a été attribué en le déclinant numériquement (1, 2, 3...). Pour chaque expérimentation, un classeur Excel nommé par le codage unique a été créé pour renseigner les informations collectées dans la publication scientifique. Cette étape a permis de conserver chaque information initiale de façon pérenne. Afin d'homogénéiser la saisie des données, une liste déroulante répertoriant les différents paramètres collectés à travers l'ensemble des expérimentations a été créée. Si nécessaire, des unités ont été convertis afin de standardiser les résultats pour l'ensemble des expérimentations. Pendant cette saisie, les fichiers ont été enregistrés selon 7 tables identiques à chaque classeur (Tableau 3). Dans le cas de données manquantes de composition chimique de la ration, les valeurs ont été complétées par celles des matières premières correspondantes dans les tables INRA (INRA, 2010).

Les éventuelles erreurs de saisies, les problèmes d'unité et la mise en évidence de certaines valeurs manquantes ont pu être détectés par la création d'un tableau croisé dynamique initié à partir de l'ensemble des données de chaque expérimentation.

Analyse statistique

Des analyses descriptives globales et par traitement (contrôle et acidogène) des différents indicateurs journaliers du pH ruminal (pH moyen, pH min, pH max...) recensés dans les traitements de la BDD ont été conduites avec le logiciel MiniTab (Minitab Inc., USA, version 17). Les moyennes, écart types et valeurs extrêmes (minimum et maximum) ont été calculées. Un test de normalité de Kolmogorov-Smirnov a été réalisé sur chaque variable pH identifiée afin de conserver uniquement celles qui suivaient une loi normale.

Une exploration des paramètres périphériques recensés a été effectuée au sein de chaque compartiment. Puis ces paramètres ont été confrontés aux indicateurs pH retenus afin de mettre en évidence d'éventuelles relations intra-expériences. Les paramètres périphériques étudiés au minimum dans 5 expérimentations et évalués dans 15 traitements ont été utilisés pour conduire une analyse de variance-covariance par un modèle linéaire généralisé (**GLM**) en utilisant le logiciel Minitab (version 17). Les relations avec les covariables pH et leurs variations intra-expérience en fonction de l'identifiant « Expe » établi lors du codage seront alors mis en évidence. L'effet « Expe » a été considéré comme fixe. Les corrélations intra-expérience ont été étudiées selon le modèle suivant : $Y_i = \alpha + \alpha_i + (\beta + \beta_i) X_i + e_i$ où Y_i est la valeur du paramètre étudié, α_i correspond à l'effet fixe de l'expérimentation i sur l'intersection générale α , β la pente générale, β_i est l'effet fixe de l'expérimentation i sur la pente générale β et e_i est l'erreur résiduelle aléatoire.

RESULTATS

Analyse descriptive de la base de données

Processus de sélection

A partir des 121 publications et expérimentations identifiées grâce à la BDD IPASAR, 93 expérimentations issues de 93 publications ont été finalement retenues à l'issue du processus de sélection. Vingt-huit expérimentations ont été éliminées, 15 expérimentations ne répondaient alors pas aux critères d'inclusion fixés et 13 autres ne rapportaient pas d'informations suffisantes sur la composition chimique des rations utilisées.

L'absence d'une cinétique minimale de 4 points pour la mesure du pH ruminal a été le critère le plus sélectif durant ce processus (nExpe = 9). Le manque de données sur des paramètres périphériques mesurées (nExpe = 2) ainsi que l'absence de variation significative du pH entre les traitements (nExpe = 4) ont été ensuite les éléments d'élimination.

Description des animaux et des traitements

La BDD était composée de 3 principales espèces de ruminants (Tableau 4); les bovins représentaient plus des trois quarts (nExpe = 78) des expérimentations intégrées dans la BDD, tandis que les petits ruminants étaient en minorité (nExpe = 15). Au sein des bovins, la catégorie d'animaux la plus étudiée à l'issue de cette synthèse bibliographique était les vaches laitières en lactation (nExpe = 67 et 237 individus étudiés). Au total, 345 traitements répartis dans 93 expérimentations correspondant à en moyenne 3,5 traitements testés (traitements contrôles inclus) par expérimentation ont été recensés dans cette synthèse.

Pour induire l'ARSA, différents protocoles ont été suivis, majoritairement, des carrés latins (nExpe = 63) puis des blocs aléatoires (nExpe = 21), et, de façon minoritaire, des études longitudinales (nExpe = 9) (Tableau 5). La variation entre les 2 types de traitements (contrôles et acidogènes) était basée uniquement sur des modifications des régimes alimentaires distribués aux animaux. Ainsi, le ratio fourrage sur concentré (**F:C**) a été majoritairement diminué dans les rations distribuées aux animaux pour induire une chute de pH ruminal (nExpe = 57) (Tableau 5). Le type de concentré utilisé (nExpe = 19) ainsi que la taille des particules (nExpe = 10), représentaient les 2 autres principaux facteurs d'induction de l'ARSA. En moyenne, les caractéristiques principales des rations des traitements contrôles et acidogènes ont été décrites dans le Tableau 6. Les pourcentages d'amidon et de concentrés étaient logiquement inférieurs dans les traitements contrôles comparés aux traitements acidogènes (respectivement 19,7 et 38,9% vs 30,4 et 59,6%) et ceux de NDF et NDF fourrages étaient supérieurs (respectivement 37 et 25,8% vs 30,4 et 20,5%).

Tableau 4 : Répartition des expérimentations (nExpe) de la BDD IPASAR en fonction des caractéristiques des animaux utilisés

Total animaux 93 (345)	Bovins 78 (285)		Caprins 11 (31)		Ovins 4 (29)	
Sexe	Femelles	Mâles	Femelles	Mâles	Femelle	Mâles
	75 (273)	3 (12)	7 (17)	4 (14)	0	4 (29)
Stade physiologique						
Lactation	67 (237)		3 (6)			
Entretien	4 (14)		4 (11)	3 (11)		3 (17)
Croissance	3 (12)			1 (3)		1 (12)
Tarie	1 (10)					
Engraissement		3 (12)				

Les chiffres entre parenthèses correspondent au nombre d'observations au total (certains animaux étant répétés : design en carré latin) au sein des nExpe de chaque catégorie.

IPASAR : Indicateurs Périphériques de l'Acidose Ruminale Subaiguë

Tableau 5 : Description des différents protocoles d'inductions de l'ARSA

Répartition des protocoles	nExpe
Schémas expérimentaux	
Carré latin	63
Blocs aléatoires	21
Longitudinale (mesures répétées)	9
Régimes d'induction de l'ARSA	
Pourcentage F:C	57
Type de concentré	19
Taille des particules	10
Type de fourrage	5
Type de fourrage et de concentré	2

F:C = ratio Fourrage : Concentré

ARSA : Acidose Ruminale SubAiguë

Tableau 6 : Caractéristiques moyennes des rations utilisées dans les traitements contrôles et acidogènes

Composition ration	Traitements contrôles				Traitements acidogènes			
	Moyenne	Ecart type	Min	Max	Moyenne	Ecart type	Min	Max
% amidon	19,7	8,6	0,0	41,5	30,4	8,6	9,7	60,2
% NDF	37,0	7,2	16,1	64,0	30,4	5,9	13,4	52,1
% NDF fourrage	25,8	5,2	15,0	34,4	20,5	5,3	12,5	32,5
% concentré	38,9	17,5	0,0	90,0	59,6	14,7	23,0	100,0

NDF : Neutral Detergent Fiber

Une hétérogénéité dans les méthodes de mesure du pH a été mise en évidence (Tableau 7). Pour la moitié des études, des techniques *ex-vivo* ont été utilisées. La mesure du pH a été faite après prélèvement de jus ou contenu ruminal à travers une canule (nExpe = 44) ou par sondage gastro-œsophagien (nExpe = 1). L'autre moitié a eu recours à des techniques *in-vivo* par l'intermédiaire de sondes immergées (nExpe = 36) ou de bolus ruminiaux (nExpe = 11). La majorité des expérimentations ont spécifié le lieu de mesure du pH dans le rumen (nExpe = 60) alors que 33 auteurs ne l'ont pas mentionné de façon précise. Pour la plupart, une seule localisation dans le rumen a été étudiée : sac ventral (nExpe = 43) et réticulum (nExpe = 3). Pour les 14 autres expérimentations, le pH ruminal a été évalué sur un échantillon recomposé à partir de prélèvements réalisés à différentes localisations du rumen. Lorsque des techniques *ex-vivo* étaient employées, le nombre de mesures réalisées pour calculer les indicateurs de pH ruminal journaliers était de 5 prélèvements pour le sondage gastro-œsophagien et en moyenne de 10 pour les prélèvements par canule ruminale. Les mesures s'échelonnaient sur la période post-prandiale (du repas jusqu'à 10h après le repas, en moyenne). Le pH ruminal était évalué sur 1 à 2 jours pendant la période expérimentale. Les techniques de mesures *in-vivo* permettent des fréquences et des durées de mesures plus importantes. En moyenne, 96 et 2430 mesures par jour ont été effectuées pour, respectivement, les capteurs ruminiaux et les sondes immergées. Généralement, une fréquence de mesure toutes les 15 minutes est programmée pour les capteurs ruminiaux et toutes les 35 secondes pour les sondes immergées. Ces mesures étaient effectuées en moyenne sur 18 et 8 jours respectivement.

Recensement et description des indicateurs pH calculés par jour

Neuf indicateurs du pH journalier ont été recensés et parfois calculés dans les expérimentations (Tableau 8). Le pH moyen a été évalué dans toutes les expérimentations de la BDD (nExpe = 93). Les valeurs de pH extrêmes ont, quant à elles, été reportées dans 41 et 30 expérimentations pour, respectivement, le pH min et le pH max. Pour l'indicateur « temps passé sous une valeur de pH de référence », la valeur seuil la plus fréquente était de 5,8 (nExpe = 41), les deux autres valeurs de référence 6 et 5,6 ont été répertoriées dans moins de 30 expérimentations. Enfin, le calcul de l'aire sous la courbe (ASC) d'un pH de référence a été l'indicateur le moins rencontré (nExpe < 30) quelle que soit la valeur du pH de référence (5,6, 5,8, ou 6).

Tableau 7 : Répartition des méthodes de mesures du pH ruminal (nExpe=93)

Technique de mesure du pH		nExpe	Nombre de mesures/jour	Nb de jours de mesure du pH
<i>In vivo</i>	Bolus*	11	96	18
	Sonde pH immergée	36	2 430	8
<i>Ex vivo</i>	Sondage gastroœsophagien	1	5	1
	Prélèvement par canule	44	10	2
Localisation	Réticulum	3	96	47
	Rumen	33	1 081	2
	Multi-sites dans le rumen	14	11	1.5
	Sac ventral rumen	43	1 464	7

*Bolus : Dispositif téléométrique sans fil avalé par la vache qui fournit des mesures continues et précises du pH, et de la température à l'intérieur du réticulum. Il enregistre des données à intervalle d'une minute et enregistre des moyennes toutes les 15 minutes pour fournir 96 lectures par jour. Ces données sont stockées sur le bolus et peuvent ensuite être récupérées à distance via un mobile positionné à 30 cm du réticulum.

Tableau 8 : Valeurs moyennes de chaque indicateur pH relevé dans les 93 expérimentations de la BDD IPASAR

Indicateurs pH journalier	Moyenne	Ecart type	Minimum	Maximum	nTrt	nExpe	P-Value*
pH moyen	6,10	0,25	5,28	6,87	345	93	0,39
pH min	5,51	0,34	4,77	6,25	165	41	0,10
pH max	6,70	0,18	6,32	7,13	121	30	<0,05
Temps pH<5,6, min/j	189	202	0	930	103	29	<0,05
Temps pH<5,8, min/j	376	277	0	1020	157	39	0,05
Temps pH<6, min/j	472	303	0	1139	113	15	<0,05
ASC pH<5,8, pH x min/j	150	169	0	1228	89	23	<0,05
ASC pH<5,6, pH x min/j	69	119	0	660	54	17	<0,05
ASC pH<6, pH x min/j	216	353	0	2579	58	15	<0,05

* Test normalité Kolmogorov-Smirnov

ASC = Aire Sous la Courbe

nTrt = nombre de Traitements

nExpe = nombre d'Expérimentations

IPASAR : Indicateurs Périphériques de l'Acidose Ruminale Subaiguë

Comme les indicateurs pH moyen et pH min ont été les plus utilisés et leurs répartitions suivaient une loi normale ($P > 0,05$), ils ont alors été retenus pour réaliser les analyses de variance-covariance par un GLM avec les paramètres périphériques recensés dans la BDD. Sur l'ensemble des 345 traitements issus des 93 expérimentations, l'indicateur pH moyen avait une valeur moyenne de 6,10 avec un écart type de 0,25 et des valeurs extrêmes comprise entre 5,28 à 6,87 (Figure 8). Le pH min avait lui une valeur moyenne de 5,51, un écart type de 0,34 et des valeurs extrêmes égales à 4,77 et 6,25 (Figure 9). L'analyse descriptive des indicateurs pH de chaque traitement (contrôles et acidogènes) est présentée dans le Tableau 9. La valeur moyenne du pH journalier des traitements contrôles était de $6,26 \pm 0,20$ alors qu'elle était de $5,96 \pm 0,22$ pour les traitements acidogènes. La valeur moyenne du pH min des traitements contrôles était de $5,69 \pm 0,33$ alors qu'il était de $5,32 \pm 0,29$ pour les traitements acidogènes.

Paramètres périphériques mesurés de façon non-invasive dans les compartiments

Répartition des paramètres dans les compartiments et leurs associations

La Figure 10 représente la répartition des différents compartiments étudiés sur l'ensemble de l'échantillon. La composition de la ration est un paramètre qui est systématiquement mesurée de façon précise dans les 93 expérimentations. Des échantillons de lait ont été réalisés dans 62 expérimentations pour mesurer différents paramètres. Le sang et des paramètres comportementaux des animaux (incluant le niveau d'ingestion) ont quant à eux été étudiés dans plus de 30 expérimentations. Enfin les fèces et urines ont été échantillonnées dans, respectivement, 17 et 16 expérimentations. En intra-expériences, les paramètres ont été recherchés majoritairement dans 2 ou 3 compartiments pour, respectivement, 38 et 35 expérimentations (Figure 10). Au-delà, le nombre d'expérimentations est limité : 4 ont analysé simultanément 4 compartiments, puis, respectivement, 3 et une expérimentation(s) pour l'analyse de 5 et 6 compartiments. Cinq expérimentations n'ont mesuré que la composition de la ration et des paramètres ruminiaux incluant notamment le pH. Les principales associations de compartiments échantillonnés pour étudier l'ARSA sont présentées dans la Figure 10. L'association majoritaire a combiné des données de rations et de mesures dans le lait ($n = 62$) ou dans le sang ($n = 34$) ou les 3 ensembles ($n = 18$). Les combinaisons (lait-comportement) et (lait-sang) ont été étudiées dans 22 et 18 expérimentations, respectivement. Les associations à 4 compartiments incluant la mesure du niveau d'ingestion, des paramètres comportementaux et l'échantillonnage de lait et de sang par exemple, ont été moins représentés dans cette BDD ($n = 4$).

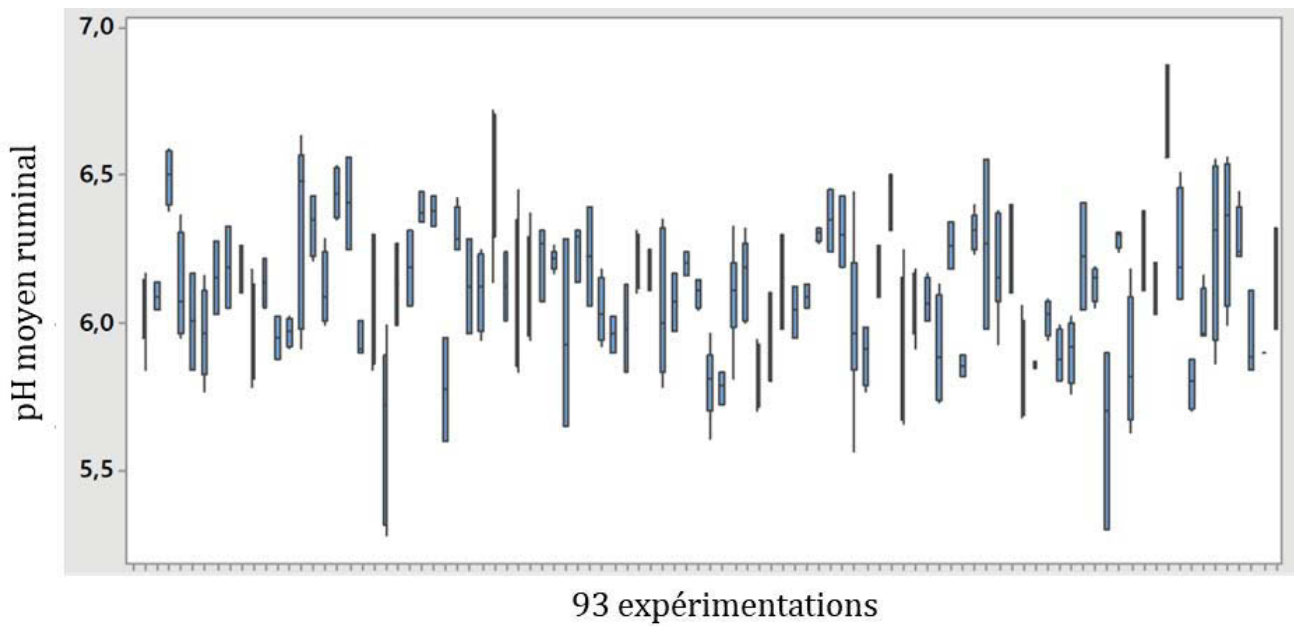


Figure 8 : Evolution intra-expérience du pH moyen en fonction des traitements

IPASAR : Indicateurs Périphériques de l'Acidose Ruminale Subaiguë
 D'après BDD IPASAR (nExpe = 93, n Trt = 345)

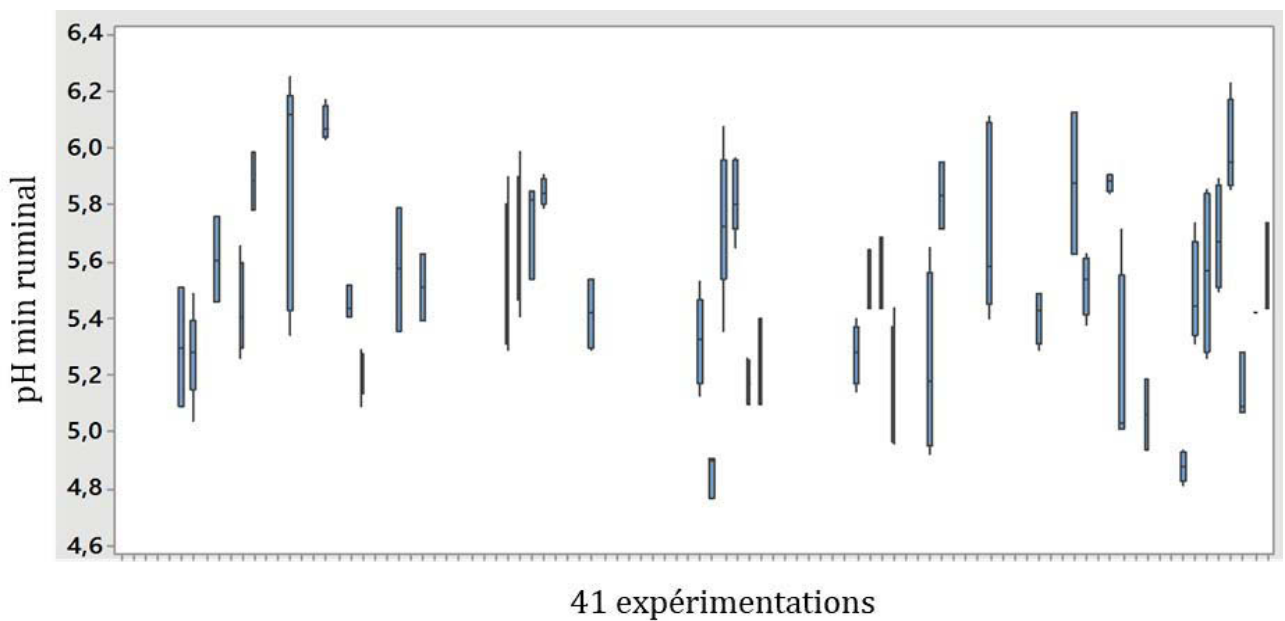


Figure 9 : Evolution intra-expérience du pH minimum en fonction des traitements

IPASAR : Indicateurs Périphériques de l'Acidose Ruminale Subaiguë
 D'après BDD IPASAR (nExpe = 41, n Trt = 165)

Tableau 9: Analyse descriptive des indicateurs pH en fonction des traitements contrôles et acidogènes

Traitements	Contrôles				Acidogènes			
	Moyenne	Ecart type	Min	Max	Moyenne	Ecart type	Min	Max
Indicateur pH journalier								
pH moyen	6,26	0,20	5,83	6,87	5,96	0,22	5,28	6,56
pH min	5,69	0,33	4,91	6,25	5,32	0,29	4,77	6,03
pH max	6,81	0,16	6,58	7,13	6,63	0,19	6,32	7,08
Temps pH < 5,6, min/j	69	73	0	234	282	214	4	930
Temps pH < 5,8, min/j	185	186	0	784	584	234	118	1020
Temps pH < 6, min/j	267	201	0	747	714	239	180	1139
ASC pH < 5,8, pH x min/j	66	76	0	295	258	250	24	1228
ASC pH < 5,6, pH x min/j	41	109	0	463	130	166	12	660
ASC pH < 6, pH x min/j	113	107	0	442	401	613	5	2579

ASC = Aire Sous la Courbe
D'après BDD IPASAR (nExpe=93)

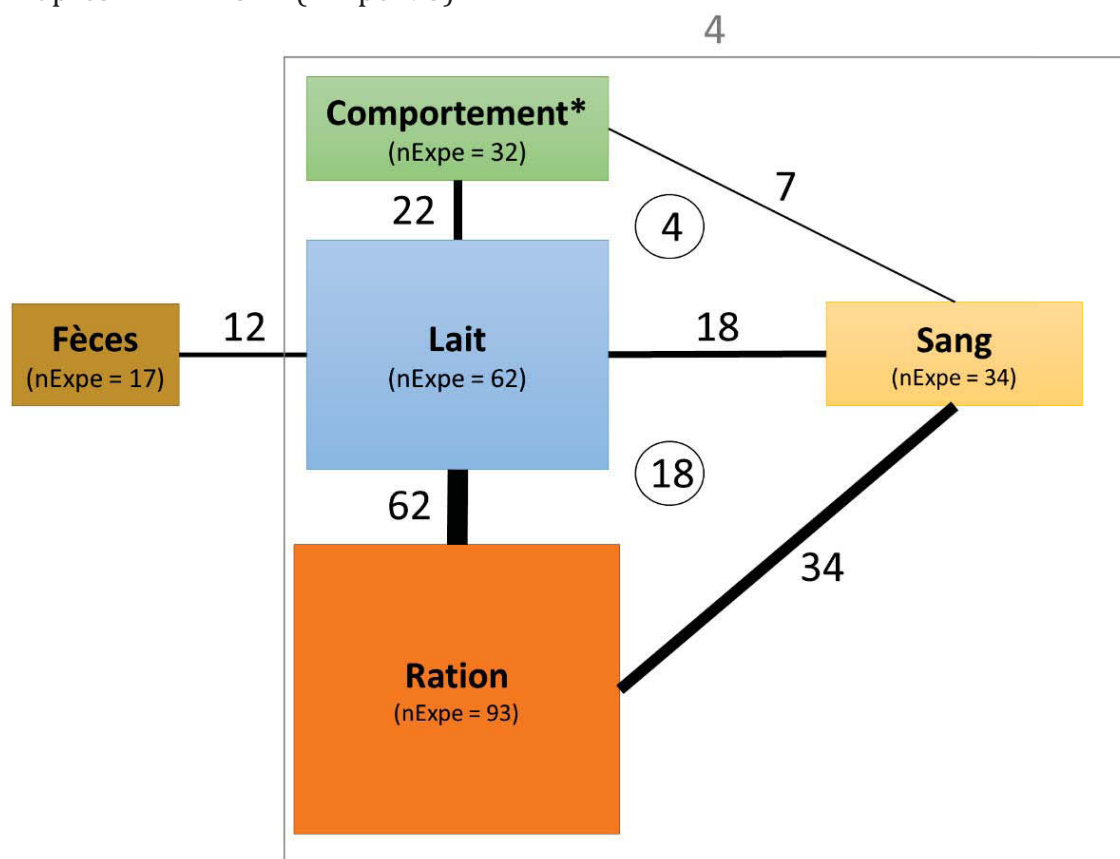


Figure 10 : Répartition des expérimentations en fonction des compartiments étudiés et de leur analyse combinée

*Comportement alimentaire et général hors niveau d'ingestion
D'après BDD IPASAR (nExpe=93)

Des paramètres recherchés dans différents compartiments

Pour chaque compartiment, la Figure 11 recense les paramètres les plus représentés ayant été analysés dans au moins 15 expérimentations et 40 traitements. Les caractéristiques de la ration sont très bien représentées dans la plupart des expérimentations. Dans le lait, les paramètres majoritairement mesurés ont été la production journalière (PL), les taux butyreux (TB) et protéiques (TP). Dans ce compartiment, les paramètres ($n_{\text{Expe}} > 54$) mesurés de façon secondaire étaient l'urée et la production de matière grasse corrigée à 4%, dans respectivement 23 et 18 expérimentations. Pour caractériser le comportement alimentaire, les temps de rumination, mastication et ingestion ont été les plus étudiés. Concernant des mesures sanguines, la glycémie a été le paramètre le plus évalué ($n_{\text{Expe}} = 15$).

Relations entre les covariables pH et les paramètres mesurés de façon non-invasive

Lors de la mise en relation des paramètres mesurés avec les données pH, il a été observé que les données des petits ruminants ne pouvaient pas être comparées à celles des bovins notamment en termes de PL ou MSI. Ainsi, seules les données concernant les bovins ont été conservées. Au sein de cette espèce, les femelles en lactation étant les individus les plus représentés dans la BDD ($n_{\text{Expe}} = 67$ et $n_{\text{Trt}} = 237$), seules les expérimentations utilisant cette population ont été conservées dans le but de pouvoir quantifier de façon plus affinée les relations entre les paramètres étudiés et le pH ruminal (**synthèse quantitative**). Ainsi, le nombre d'expérimentations éliminées a été de 4 pour les ovins, de 11 pour les caprins et de 11 pour les bovins. Un récapitulatif des relations entre les paramètres mesurés dans chaque compartiment (Y) et les covariables X (pH moyen et pH min) a été présenté dans les Tableau 10. Seuls les paramètres ayant été recensés dans au moins 5 expérimentations et 15 traitements ont été répertoriés. Le tableau a été divisé en 5 compartiments périphériques au rumen (ration, lait, sang, urine, comportement) car les paramètres mesurés dans le compartiment fécal étaient trop faiblement représentés ($n_{\text{Expe}} = 3$ au maximum pour chaque paramètre fécal mesuré) et, par conséquent, non reportés. Un total de 67 expérimentations comportant 237 traitements a finalement été utilisé pour cette synthèse quantitative.

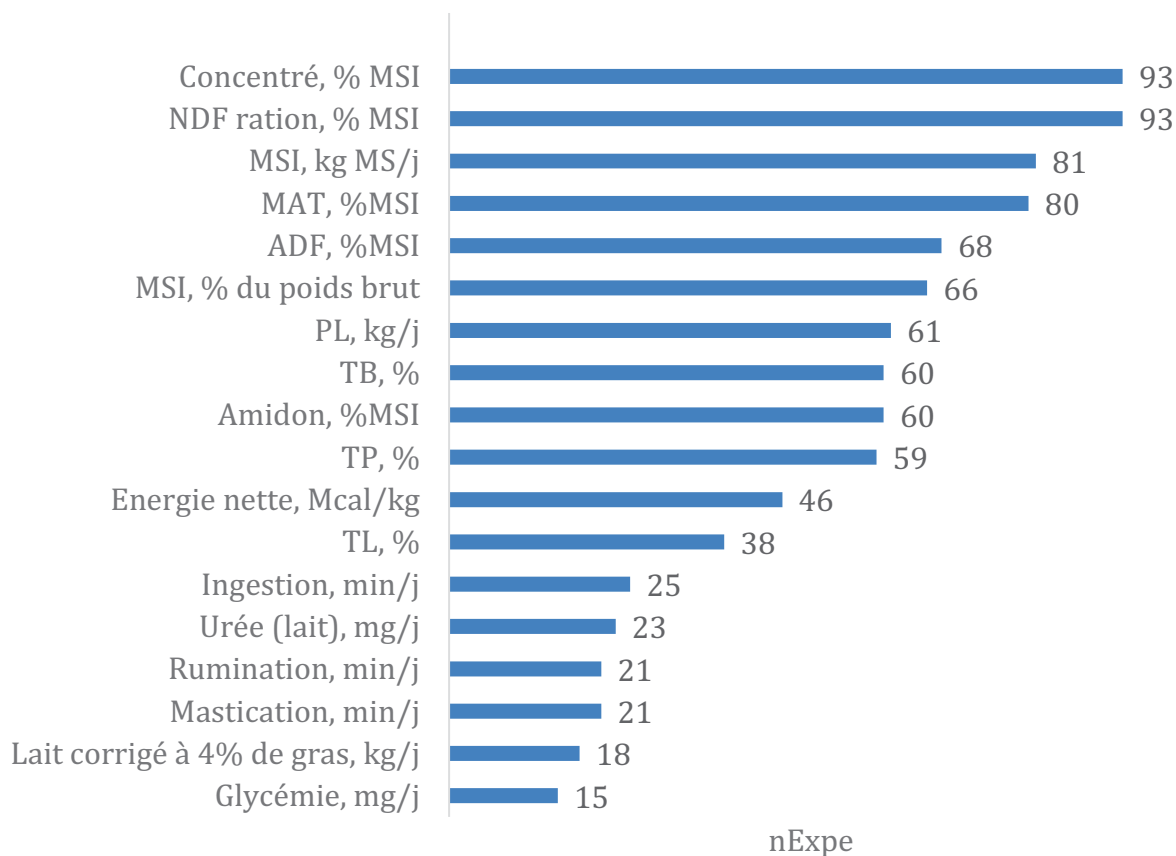


Figure 11 : Fréquence des principaux paramètres étudiés

Seuls les paramètres ayant été étudiés au moins dans 15 expérimentations différentes et pour 40 traitements sont présentés sur cette figure.

ADF: Acid Detergent Fiber, MAT : Matière Azotée Totale, MS : Matière Sèche, MSI : Matière Sèche Ingérée, NDF : Neutral Detergent Fiber, PL : Production Laitière, TB : Taux Butyreux, TP : Taux Protéique

D'après BDD IPASAR (nExpe=93)

Tableau 10 (Partie1/2) : Paramètres périphériques indiquant des variations significatives des pH ruminiaux moyens ou minimums chez les vaches laitières en lactation (début)

Compartiment	Paramètre étudié (Y)	X = pH moyen			X = pH min		
		nExpe	P-value	Equation	nExpe	P-value	Equation
Ration	Teneur de la ration distribuée, % MSI						
	NDF	67	0,000	$y = -33,06 + 10,86X$	31	0,000	$y = -18,58 + 9,56X$
	MAT	66	0,027	$y = 7,93 + 1,53X$	30	0,000	$y = 9,72 + 1,35X$
	ADF	56	0,000	$y = -44,09 + 10,61X$	25	0,000	$y = -33,98 + 9,92X$
	Amidon	47	0,000	$y = 134,68 - 17,98X$	28	0,000	$y = 119,86 - 17,16X$
	NDF fourrage	12	0,000	$y = -77,15 + 15,92X$	8	0,000	$y = -68,21 + 15,94X$
	MS ration, % du poids brut	53	0,000	$y = 132,67 - 12,26X$	25	0,007	$y = 89,46 - 5,32X$
	MSI, kg MS/j	59	0,000	$y = 35,37 - 2,31X$	29	0,082	$y = 21,51 - 0,07X$
	Concentré, % ration totale	67	0,000	$y = 314,48 - 43,63X$	31	0,000	$y = 260,76 - 38,13X$
Energie nette, Mcal/kg MSI	43	0,001	$y = 2,95 - 0,22X$	21	0,000	$y = 2,62 - 0,18X$	
Sang	Glucose, mg/L	10	0,014	$y = 1233,79 - 97,51X$	6	0,060	$y = 1462,25 - 152,1X$
	Insuline, μ U/mL	7	0,678		3	0,828	
	LBP, mg/L	6	0,340		3	0,236	
	SAA, mg/L	6	0,034	$y = 405,44 - 51,41X$	3	0,561	
	AGNE, mmol/L	6	0,073	$y = -1,03 + 0,21X$		ND	
	Hp, mg/L	5	0,104		2	0,651	
	β -OH, mmol/L	5	0,012	$y = 3,37 - 0,41X$	4	0,002	$y = 2,68 - 0,29X$
Comportement	Temps d'alimentation, min/j						
	Temps ingestion	18	0,000	$y = -233,18 + 80,3X$	11	0,006	$y = -65,11 + 60,57X$
	Temps de mastication	16	0,000	$y = -757,39 + 238,45X$	9	0,008	$y = -272,02 + 175,16X$
	Temps de rumination	16	0,001	$y = -488,15 + 152,91X$	10	0,078	$y = -70,95 + 93,93X$
	Temps d'alimentation, min/kg MSI						
	Temps ingestion	16	0,001	$y = -17,77 + 4,93X$	10	0,005	$y = -9,46 + 3,92X$
	Temps de mastication	14	0,000	$y = -52,24 + 13,92X$	8	0,007	$y = -30,3 + 11,28X$
Temps de rumination	15	0,000	$y = -35,28 + 9,35X$	10	0,016	$y = -16,7 + 6,92X$	
Urine	Allantoïne, mmol/j	5	0,059	$y = 1170 - 127X$		ND	
	Acide urique, mmol/j	5	0,052	$y = 153,08 - 16,92X$		ND	
Lait	PL, kg/j)	58	0,000	$y = 55,24 - 3,91X$	28	0,000	$y = 54,97 - 4,4X$
	Composants, %						
	TB	57	0,000	$y = -2,79 + 1,04X$	27	0,000	$y = -0,49 + 0,74X$
	TP	56	0,000	$y = 6,59 - 0,55X$	26	0,000	$y = 5,16 - 0,35X$
	TB/TP	56	0,000	$y = -1,82 + 0,48X$	26	0,000	$y = -0,81 + 0,35X$
	TL	35	0,086	$y = 5,04 - 0,05X$	20	0,040	$y = 5,08 - 0,07X$
	SNG	5	0,019	$y = 12,15 - 0,57X$		ND	
	Urée, mg/L	22	0,000	$y = -427,78 + 96,84X$	10	0,163	
	Lait corrigé à 4% de gras, kg/j	18	0,217		8	0,420	
CS, nb/mL	9	0,774		4	0,887		

Tableau 10 (Partie 2/2): Paramètres périphériques indiquant des variations significatives des pH ruminiaux moyens ou minimums chez les vaches laitières en lactation (suite et fin)

Compartiment	Paramètre étudié (Y)	X = pH moyen			X = pH min		
		nExpe	P-value	Equation	nExpe	P-value	Equation
Lait	Acide gras (% AG totaux)						
	6:0	6	0,755		4	0,858	
	8:0	6	0,446		4	0,489	
	10:0	6	0,753		4	0,723	
	12:0	6	0,491		4	0,685	
	14:0	6	0,717		6	0,228	
	15:0	8	0,002	y= 4,54 - 0,55X	5	0,487	
	16:0	11	0,008	y= -0,51 + 4,84X	7	0,031	y= 9,03 + 3,46X
	17:0	8	0,036	y= 1,47 - 0,12X	5	0,114	
	18	12	0,000	y= -23,16 + 5,31X	8	0,042	y= -8,15 + 3,04X
	cis-9 18:1	11	0,061	y= 0,53 + 2,92X	8	0,174	
	cis-11 18:1	8	0,036	y= 3,22 - 0,4X	5	0,825	
	cis-12 18:1	8	0,384		5	0,141	
	cis-13 18:1	6	0,002	y= 0,8 - 0,12X	4	0,160	
	trans-9 18:1	8	0,059	y= 2,29 - 0,31X	5	0,917	
	trans-10 18:1	10	0,004	y= 23,35 - 3,59X	8	0,240	
	trans-11 18:1	11	0,266		8	0,752	
	trans-10/trans-11 18:1	10	0,062	y= 11,12 - 1,67X	8	0,202	
	trans-12 18:1	6	0,687		4	0,726	
	cis-9, trans-11 18:1	11	0,688		8	0,320	
	18:2	5	0,141		2	0,306	
	18:2n-6	5	0,000	y= 14,9 - 1,92X	4	0,509	
	18:3n-3	7	0,182		6	0,321	
	18:3n-6	6	0,578		5	0,613	
	20:0	6	0,350		4	0,651	
	AGMI	5	0,430		2	0,476	
	AGPI	5	0,090	y= 20,84 - 2,75X	2	0,348	
	AGS	5	0,092	y= 2,33 + 10,1X	2	0,377	

P-value : effet sur la pente pour l'ensemble des relations intra-expérience

ADF: Acid Detergent Fiber, AG: Acide Gras, AGMI: Acide Gras Mono-Insaturé, AGNE: Acide Gras Non Estérifié, AGPI: Acide Gras Poly-Insaturé, AGS: Acide Gras Saturé, β-OH: Béta HydrOxybutyrate, CS: Cellule Somatique, Hp: Haptoglobine, LBP: Lipid Binding Protein, MAT: Matière Azotée Totale, MS: Matière Sèche, MSI: Matière Sèche Ingérée, NDF: Neutral Detergent Fiber, PL: Production Laitière, SAA: Serum Amyloïde A, SNG: Solides Non Gras, TB: Taux Butyreux, TL: Taux Lactose, TP: Taux Protéique
D'après BDD IPASAR (nExpe=67)

Ration. Les pourcentages de concentrés dans la ration ainsi que celui du NDF ont été systématiquement renseignés ou calculés dans chaque publication. La MSI, la concentration en énergie nette et le pourcentage d'amidon ont, quant à eux, été mentionnés dans, respectivement, 59, 43 et 47 expérimentations (sur 67 expérimentations) et seulement 1 expérimentation n'a pas indiqué la teneur en MAT de ces rations. Chaque caractéristique de ration a été significativement corrélée aux variations de pH moyen ruminal ($P < 0,05$). Les teneurs en matière azotée totale (**MAT**), acid detergent fiber (**ADF**), et NDF sont corrélées positivement avec le pH ruminal alors que l'énergie nette, la MSI, les pourcentages d'amidon, de matière sèche (**MS**) et de concentré de la ration le sont négativement.

Lait. La majorité des paramètres mesurés dans ce compartiment ont varié significativement avec le pH moyen et le pH min. Le nombre d'expérimentations utilisées pour évaluer ces relations était supérieur à 15 excepté pour le paramètre solides non gras (**SNG**) et le nombre de cellules somatiques (**CS**) qui ont été mesurés respectivement dans 5 et 9 articles. La PL était inversement corrélée aux indicateurs du pH ruminal ($P < 0,001$) tout comme le TP, et les SNG avec le pH moyen ($P = 0,019$). Le TB, ratio TB/TP et le taux d'urée étaient quant à eux diminué lorsque le pH moyen ruminal était plus faible ($P < 0,001$). Le nombre CS et le lait corrigé à 4% de gras n'ont pas été modifiés significativement par les variations du pH. Concernant les AG du lait, seuls les acides gras 16:0 et 18:0 ont une concentration corrélée positivement à la fois au pH moyen et pH min ($P < 0,05$) alors que la somme des AG saturés tend à augmenter uniquement avec le pH moyen ($P = 0,06$). Les concentrations des acides gras à chaîne impaire 15:0 et 17:0 varient négativement avec le pH moyen ($P < 0,01$). Pour les isomères *cis* de 18:1, les concentrations en *cis*-11 et *cis*-13 diminuent avec le pH moyen ($P < 0,05$) alors que la concentration en *cis*-9 tend à augmenter avec le pH moyen ($P = 0,06$). Pour les isomères *trans* de 18:1, les concentrations du *trans*-9 ($P = 0,06$) et *trans*-10 ($P < 0,01$) diminuent avec le pH moyen alors qu'il n'apparaît pas de variation pour la forme *trans*-11. Ainsi, le ratio *trans*-10/*trans*-11 tend à baisser avec le pH moyen ($P = 0,06$). Pour les acides gras polyinsaturés, la concentration en 18:2n-6 et leur somme diminuent avec le pH moyen ($P < 0,01$).

Sang. Pour les paramètres sanguins, le nombre d'expérimentations utilisées était compris entre 5 et 10. La glycémie ainsi que la concentration en bêta-hydroxybutyrate (**β -OH**) ont été corrélées négativement avec les 2 indicateurs pH ($P < 0,05$). Les concentrations en serum amyloid A (**SAA**) et acides gras non estérifiés (**AGNE**) augmentaient et diminuaient respectivement avec la chute du pH moyen ($P < 0,07$) alors qu'aucune relation n'a été montrée avec le pH min.

Urine. Cinq expérimentations au sein de notre BDD ont étudié les variations de 2 mêmes composés dans les urines. Les concentrations en allantoiné et en acide urique ont eu tendance à

varier ($P = 0,05$) avec le pH ruminal : une augmentation de la concentration de ces composés a été observée lorsque le pH moyen diminuait ($P < 0.1$).

Comportement. Entre 14 et 18 articles ont répertorié des données sur le comportement alimentaire chez les vaches laitières. Que ce soit pour l'ingestion, la mastication ou la rumination, une diminution des temps passés à ces processus mécaniques a été associée ($P < 0,05$) à des pH moyen ou minimum faibles.

DISCUSSION

L'objectif principal de cette étude bibliographique a été de réaliser un état de l'art sur les paramètres mesurés au niveau d'un lot d'animaux, de façon non invasive, dans des compartiments périphériques au rumen et d'observer les indicateurs de variations significatives de pH ruminal en intra-expérience en vue d'améliorer le diagnostic de l'ARSA.

L'ARSA est une maladie d'origine nutritionnelle

L'ARSA est définie classiquement par une baisse de pH ruminal résultant d'un déséquilibre entre une production importante d'acides provenant des fermentations microbiennes dans le rumen et les mécanismes contrecarrant cette accumulation d'acides (Dijkstra *et al.*, 1993). L'analyse de la BDD a bien confirmé que le changement d'alimentation est le seul facteur extrinsèque à l'animal étudié pour induire une situation acidogène. Parmi les différents facteurs d'origine alimentaire testés, le ratio F:C a été le plus étudié. La diminution de la part de fourrage au profit de celle de concentré modifie à la fois la composition chimique de la ration et la taille moyenne des particules de la ration. Expérimentalement, le ratio F:C le plus communément utilisé pour induire l'ARSA est de l'ordre de 40:60 en accord avec la valeur à risque rapportée par Krause *et al.* (2002) et Beauchemin *et al.* (2003). Concernant la composition chimique, la diminution du ratio F:C s'accompagne généralement d'une augmentation de la part des glucides rapidement fermentescibles dans le rumen tels que l'amidon au détriment de celle des glucides pariétaux. L'amidon est prioritairement dégradé par les microorganismes dans le rumen pour produire des AGV puis une faible proportion est ensuite digérée dans l'intestin grêle (Theurer *et al.*, 1999).

De par une vitesse de dégradation élevée dans le rumen, la part d'amidon dégradée dans le rumen contribue à l'accumulation d'acides dans le rumen. La digestion de l'amidon dans le rumen varie alors en fonction de la nature de la céréale distribuée et de sa forme de présentation (Offner *et al.*, 2003). La teneur maximale en amidon recommandée pour se situer avec de faibles risques d'ARSA est de 25% MS (Sauvant *et al.*, 1999). Les rations acidogènes de cette BDD sont caractérisées par des proportions en amidon situées dans la catégorie de risque élevé d'apparition d'ARSA selon ces mêmes préconisations.

La part de NDF dans la ration ainsi que la taille moyenne des particules ingérées peuvent également moduler l'efficacité de neutralisation de l'acidité dans le rumen. De plus un pourcentage minimal de 32% en NDF dans la ration ainsi qu'une taille de particule dans la ration supérieure à 2,6mm sont préconisées pour limiter le risque d'acidose par les rations distribuées aux animaux (Sauvant et Mertens, 2001). En effet, dans les rations acidogènes, la baisse de teneurs en fibres longues induit une moindre mastication et rumination (Bailey et Balch, 1961, Beauchemin, 1991, Zebeli *et al.*, 2012) et, de ce fait limite la production de salive contenant les substances tampons indispensables à la neutralisation du pH du rumen. Dans cette BDD, nous confirmons que, quel que soit le mode d'expression, les temps d'ingestion, de mastication et de rumination diminuent lorsque le pH chute. En parallèle, les niveaux d'ingestion de la matière sèche et d'amidon augmentent avec la baisse du pH ruminal. Cela pourrait provenir d'un plus faible encombrement de la ration dans le rumen qui s'explique par une diminution de la proportion de fourrages associée généralement à une augmentation de la concentration en amidon. A même proportion de concentrés, la nature et le type de traitement technologique appliqué à la céréale peuvent également augmenter la vitesse de dégradation de l'amidon (Offner *et al.*, 2003). Une accumulation d'acide dans le rumen pourra alors être observée. Ces caractéristiques ont été utilisées dans certains protocoles d'induction de l'ARSA répertoriés dans notre BDD. Les fourrages testés pouvaient varier en fonction des teneurs en NDF et en constituants présentant des propriétés tampons (protéines ou calcium). Ainsi, dans la BDD, des corrélations négatives entre le pH ruminal et la MSI, les pourcentages d'amidon, et de concentrés dans la ration ainsi que des corrélations positives entre le pH ruminal et les teneurs en NDF ou ADF corroborent avec les relations établies par Sauvant et Peyraud (2010).

Les protocoles d'induction de l'acidose rapportés dans cette BDD sont majoritairement basés sur l'enrichissement en amidon et la diminution de la teneur en constituants pariétaux. De ce fait, il apparaît difficile de dissocier les effets dus à une chute du pH ruminal de ceux liés à une modification du régime alimentaire distribué dans les différents traitements aux animaux. Cependant, d'autres situations alimentaires à risque sont répertoriées de façon moins fréquentes dans la bibliographie telles qu'une situation au pâturage (O'Grady *et al.*, 2008) ou des rations riches en fibres ayant des parois rapidement fermentescibles (luzerne) (Lettat *et al.*, 2012).

Les relations significatives entre la chute du pH ruminal, le comportement alimentaire et les caractéristiques des régimes alimentaires confirment que ces paramètres doivent être des éléments constitutifs du diagnostic de l'ARSA.

Diagnostic difficile de l'ARSA

Indicateurs des variations du pH ruminal

Même si certains auteurs n'ont trouvé que très peu de corrélations entre des symptômes de l'ARSA et le pH ruminal (Bramley *et al.*, 2008), cette synthèse quantitative recense un certain nombre de paramètres périphériques non spécifiques présentant des relations significatives avec le pH en intra-essai. Ces paramètres pourraient alors être pressentis comme indicateurs périphériques de l'ARSA. Pour certains, leurs variations peuvent refléter une modification du fonctionnement ruminal ou de l'activité métabolique de l'animal. Pour d'autres, ils peuvent caractériser des perturbations accompagnant l'ARSA comme, par exemple, des modifications de performances animales, le développement d'un état inflammatoire ou infectieux ou le comportement des animaux comme vu précédemment.

Lait. Par la possibilité d'échantillonnages réguliers et la facilité à être mesurées, les performances laitières sont les paramètres les plus évalués dans la BDD en parallèle de la mesure du pH ruminal. Des corrélations positives entre le pH ruminal et différents paramètres tels que la production laitière, le TP, le TB, le TB/TP et le taux d'urée ont été observées. La production laitière augmente avec la densité énergétique et le niveau de matière sèche ingérée de rations acidogènes. La baisse du TB du lait est un paramètre communément utilisé dans le diagnostic des acidoses au sein des fermes commerciales. Une relation positive entre le TB et le pH ruminal a déjà été établie (Allen, 1997, Enemark *et al.*, 2004, Sauvant et Peyraud, 2010). En effet, en abaissant le pH ruminal les rations riches en amidon conduisent à une forte production d'isomères *trans*-10 anti-lipogénique.

La baisse du TB peut être reliée à une diminution de la production d'acétate dans le rumen, principal précurseur plasmatique des matières grasses synthétisées dans la mamelle suite à l'insuffisance de fibres dans la ration et à leur moindre dégradation ruminale en lien avec une acidité du contenu ruminal maintenue pendant de longues périodes dans la journée. Aussi, à pH acide, les voies de biohydrogénation des AG seraient modifiées et ces intermédiaires de biohydrogénation de forme *trans* exerceraient un effet anti-lipogénique au niveau de la mamelle (Bauman et Griinari, 2003). Quant au TP, son augmentation peut refléter l'élévation de la densité énergétique des rations acidogènes. Ainsi, le ratio TB:TP pourrait constituer un paramètre d'intérêt. En accord avec Gao et Oba (2014), l'analyse de cette BDD montre que la teneur en MUN du lait diminue avec le pH. Néanmoins, d'autres facteurs liés aux caractéristiques de la ration (teneur en MAT de la ration, dégradabilité des sources azotées et équilibre entre les apports en énergie et en azote...) ou propres aux animaux (stade de lactation, saison, fréquence de traite, parité...) peuvent être répertoriés (Gao et Oba, 2015).

Les principaux facteurs de variation d'origine alimentaire du profil en AG du lait dépendent à la fois de la composition de la ration (teneurs en fibres et/ou en amidon) et ensuite de la composition en AGV du rumen, de la nature et de la concentration des AG ingérés ainsi que du niveau de l'apport énergétique. Les conditions de pH défavorables à l'action de la flore cellulolytique et la diminution du rapport acétate:propionate générées par les rations riches en amidon, modulent le profil en AG du lait ce qui permet de les utiliser comme des indicateurs périphériques d'intérêt pour évaluer l'ARSA. Néanmoins, dans cette BDD, les AG individuels ont été analysés dans un nombre d'expérimentations limité ($n_{\text{Expe}} < 11$).

Les précurseurs de la synthèse des AG à chaîne paire et moyenne (nombre de carbone < 16) dans la mamelle sont les AGV (principalement, l'acétate et le butyrate) synthétisés dans le rumen et issus de la digestion des glucides de la ration. Bien que leurs concentrations varient fortement avec les rations acidogènes, il n'apparaît pas de relation entre le pH ruminal et la concentration de ces AG dans le lait. Dans la bibliographie, une attention particulière est accordée aux AG à chaîne impaire ou ramifiée, principalement synthétisés par les micro-organismes du rumen (Fievez *et al.*, 2012). Les AG ramifiés présents en forte concentration (ex, *iso-14:0* et *iso-15:0*) dans les membranes des bactéries cellulolytiques (Vlaeminck *et al.*, 2006) n'ont pas été répertoriés en nombre suffisant dans cette BDD pour être analysés. A contrario, certains AG à chaîne impaire et linéaire (15:0 et 17:0) sont reliés négativement au pH du rumen ce qui confirme les données de la bibliographie car la chaîne carbonée de ces AG est synthétisée dans la mamelle à partir d'acides gras à chaîne impaire, le propionate, principalement, issu de la dégradation ruminale de l'amidon (Fievez *et al.*, 2012).

Enfin, la concentration dans le lait de certains intermédiaires de biohydrogénation des AG polyinsaturés varie avec le pH dans l'analyse de notre BDD. L'augmentation de la teneur en *trans*-10 18:1 avec la baisse de pH que nous avons répertoriée est en accord avec Enjalbert *et al.* (2008) alors qu'il n'apparaît pas dans cette base de données de corrélation entre la teneur en *trans*-11 18:1 et le pH. Au final, le ratio *trans*-10/*trans*-11 tend à augmenter dans les conditions acidogènes toujours en accord avec Enjalbert *et al.* (2008). Ces changements proviendraient de modifications du microbiote ruminal. En effet, les bactéries qui réalisent les biohydrogénations de type *trans*-10 sont aéro et acido-tolérantes ce qui peut expliquer la prédominance de la forme *trans*-10 pour les rations acidogènes. A pH acide, la somme des AGS diminue alors que la somme des AGPI augmente, indiquant que la biohydrogénation est incomplète, ce qui corrobore les données de la bibliographie (Lechartier et Peyraud, 2010). La plus faible activité de biohydrogénation ruminale à pH acide pourrait être reliée à la diminution de la concentration des bactéries cellulolytiques qui sont les principaux agents bactériens intervenant dans ce phénomène (Buccioni *et al.*, 2012).

Sang. Des modifications de la composition du sang en relation avec un état d'acidose ruminale ont été recherchées dans un nombre limité d'expérimentations ($4 < n_{\text{Expe}} < 9$). La glycémie est le paramètre le plus étudié et son taux plasmatique bien que fortement variable est corrélé aux variations de pH du rumen. L'hyperglycémie plasmatique pourrait être mise en relation avec une forte concentration en propionate dans le rumen suite à la dégradation des glucides rapidement fermentescible. En effet, le propionate constitue le principal précurseur de la néoglucogenèse dans le foie (Mohan *et al.*, 2015). Des relations ont aussi été mises en évidence entre le β -OH et les indicateurs pH. Celles-ci s'expliquent par le fait que l'apport d'une ration énergétique acidogène peut favoriser la voie de production de butyrate dans le rumen, principal précurseur du β -OH (Rémond *et al.*, 1995). Lorsqu'un état d'ARSA chronique s'installe, des phénomènes d'inflammation ou d'infection peuvent apparaître chez ces animaux. Des endotoxines telles que les lipopolysaccharides (**LPS**), constituants des parois des bactéries gram négatives, peuvent être libérées dans le contenu ruminal suite à la lyse de ces bactéries à pH acide ($\text{pH} < 6$) (Plaizier *et al.*, 2012). Sous l'action de ces molécules et de son contact prolongé avec le contenu acide, l'épithélium ruminal peut présenter des zones d'inflammation. Ces molécules peuvent ensuite se concentrer dans le compartiment sanguin suite à un phénomène de translocation à travers la paroi ruminale et entraîner une activation du système immunitaire (Plaizier *et al.*, 2012). Dans la phase aiguë de l'inflammation, les marqueurs d'inflammation et d'infection tels que la SAA, les lipopolysaccharides binding protein (**LBP**) et l'haptoglobine (**Hp**) sont les plus recherchés.

Toutefois, les indicateurs d'inflammation sont peu représentés dans notre BDD. Seule la concentration en SAA est négativement corrélée au pH moyen ruminal. La réponse inflammatoire étant un processus dynamique, l'absence de corrélation pourrait s'expliquer par une mauvaise synchronisation des prélèvements d'échantillon de sang. Des molécules pro-inflammatoires telles que les LPS ou les cytokines ont l'avantage de répondre précocement à la maladie et pourraient alors être toutefois investiguées dans des études futures (Trevisi *et al.*, 2015).

Urine. Les concentrations en allantoïne et acide urique qui représentent les dérivés de purines totaux sont négativement corrélés au pH moyen du rumen. Ces paramètres informent sur le niveau de synthèse microbienne chez les animaux. Dans les régimes acidogènes, l'apport de matière organique fermentescible stimule la synthèse microbienne ce qui peut justifier une corrélation négative entre le pH du rumen et la concentration des dérivés de purines totaux (Krause *et al.*, 2002).

Cette synthèse quantitative met en évidence des relations significatives entre les indicateurs pH, qui sont la référence pour caractériser l'ARSA à l'heure actuelle, et des paramètres périphériques souvent recherchés dans des études où la maladie a été induite expérimentalement afin d'explorer un phénomène particulier subséquent. Nous pouvons soulever le fait que des paramètres moins représentés dans cette BDD sont souvent que très peu corrélés significativement aux indicateurs pH. L'absence réelle de lien entre ces variables ou le manque de données pourraient justifier leur faible corrélation. Ces paramètres exploratoires demandent donc à être plus investigués avant de statuer sur leur potentiel statut d'indicateurs de l'ARSA. De plus, certains paramètres communément recherchés dans des matrices spécifiques pourraient à l'avenir être étudiés dans d'autres échantillons biologiques. Par exemple, la salive est une matrice qui est de plus en plus utilisée pour rechercher des indicateurs du statut physiologique des animaux (Lamy et Mau, 2012) mais ce compartiment n'est pour le moment pas étudié dans le contexte de l'ARSA.

Ce travail bibliographique part du postulat que le diagnostic de l'ARSA est en première intention basé sur des chutes de pH ruminal mais qu'il peut être enrichi et amélioré par l'intégration d'indicateurs périphériques au rumen. Les paramètres identifiés dans cette BDD pourront être utilisés en tant qu'indicateurs de l'ARSA s'ils contribuent à renforcer la sensibilité et la spécificité du diagnostic des animaux malades.

Variabilité des mesures des paramètres étudiés entre expérimentations

Certains paramètres sont impactés significativement par des chutes anormales du pH ruminal. Néanmoins, les précisions de ces variations que ce soit au niveau des paramètres périphériques ou de la mesure du pH se doivent d'être améliorées pour préciser les équations quantitatives entre ces différentes variables.

La précision de la mesure de pH pourrait varier considérablement avec la technique de mesure retenue. Ainsi, quatre techniques ont été répertoriées dans la BDD. Elles se distinguaient par des localisations, des fréquences journalières et des durées de mesure expérimentales dans le rumen. Or, la localisation ainsi que le type de cinétique pour évaluer le pH sur une journée sont des critères ayant déjà été démontrés comme apportant de la variation dans ces indicateurs. La mise en évidence d'un gradient de pH au sein du rumen (Lane *et al.*, 1968, Geishauser, 1993, Kimura *et al.*, 2012) ainsi que des dynamiques pH variant au cours de la journée en fonction de la distribution des repas (Dijkstra *et al.*, 1993) expliqueraient respectivement les raisons de ces variations. Des données détaillées expliquant les limites des indicateurs pH dans le diagnostic de l'ARSA sont présentées dans le Chapitre II.2 et plus loin dans le Chapitre V.2 de ce manuscrit. Afin d'obtenir des indicateurs fiables du pH à l'échelle journalière, il est maintenant reconnu qu'une cinétique précise doit être recueillie. La démocratisation des capteurs ruminiaux devrait contribuer à l'obtention d'indicateurs pH plus représentatifs avec lesquels des seuils de risque pourraient tendre à s'universaliser entre expérimentations (Villot *et al.*, 2017).

Une deuxième source de biais pourrait provenir de l'absence de standardisation des méthodes de mesures des paramètres périphériques recherchés même si cet aspect n'a pas été exploré dans l'analyse de notre BDD. Nous pouvons citer un exemple sur l'analyse du comportement alimentaire qui peut être effectuée selon différentes méthodologies et avec différents outils pouvant apporter des biais dans les réponses de ces paramètres. Beauchemin *et al.* (1989) ont testé la précision des mesures des temps de rumination, ingestion et mastication des animaux par des outils d'enregistrement de mouvements de mâchoire en comparaison à des enregistrements vidéos. Il a été démontré que les temps de rumination et d'ingestion étaient respectivement allongés de 4,7 et 17,6% via les enregistrements automatiques par rapport aux analyses vidéo. La quantification de différents composés dans le lait (urée, TB, TP, AG...) peut être impactée par les techniques employées. Des méthodologies chimiques ou ayant recours à l'infrarouge sont utilisées pour leur dosage. Au sein même de ces techniques, des variations peuvent être observées dans l'analyse des données.

Pour la quantification par spectres infrarouge, les équations de prédiction basées sur les spectres recueillis peuvent changer d'un laboratoire à l'autre (Inal *et al.*, 2015). L'amélioration de la précision des mesures des différents paramètres pourrait nous aider à mettre en évidence des corrélations plus fiables entre variables.

Validation de la sensibilité des paramètres périphériques pour le diagnostic de l'ARSA

Pour améliorer la sensibilité des indicateurs périphériques à l'ARSA, il semble nécessaire de procéder à une validation externe des corrélations obtenues entre les indicateurs et le pH ruminal pour deux raisons principales. D'une part, bien que l'ARSA soit définie par une diminution du pH ruminal, nous ne sommes pas en mesure actuellement de poser un diagnostic de certitude de l'ARSA à partir de la seule prise en compte du pH. En effet, les choix d'indicateurs de pH et leurs valeurs seuils ne font pas consensus. D'autre part, on peut se demander si les paramètres périphériques identifiés sont suffisamment sensibles pour détecter des cas d'ARSA au sein d'un traitement alimentaire acidogène. Il apparaît, en effet, une grande variabilité de susceptibilité à l'ARSA entre animaux (Dohme *et al.*, 2008) dont l'origine n'est pas connue précisément. Le passé de l'animal (Monteils *et al.*, 2012), sa génétique (Chen et Oba, 2012), son stade physiologique (Penner *et al.*, 2007) et ses capacités d'adaptation à des régimes acidogènes (Schwartzkopf-Genswein *et al.*, 2003) peuvent être autant de facteurs mis en cause. Or, les paramètres identifiés à l'heure actuelle à partir de notre BDD ont été établis à partir de réponses moyennes de lots d'animaux homogènes recevant des régimes alimentaires acidogènes. Cela peut apporter une certaine confusion entre la variation du pH ruminal et celle de la composition chimique de la ration.

Améliorer la sensibilité et la spécificité du diagnostic de l'ARSA avec des combinaisons de paramètres périphériques au rumen?

Outre des limitations sur la précision des relations entre le pH ruminal et des paramètres périphériques, la spécificité des paramètres à l'ARSA doit faire l'objet d'une attention particulière. L'ARSA est initiée par un dysfonctionnement ruminal pouvant s'accompagner par la suite de nombreuses perturbations métaboliques à l'échelle de l'animal (Martin *et al.*, 2006). Par conséquent, de nombreux indicateurs reflétant des fonctions de l'animal altérées peuvent être mis en évidence mais leurs variations ne sont pas liées spécifiquement à l'apparition de l'ARSA.

Par exemple, une chute du TB peut être observée également lorsque des rations sont enrichies en lipides (Meignan *et al.*, 2017) alors qu'une augmentation du β -OH sanguin pourrait informer en première intention d'un état de cétose chez l'animal (Enjalbert *et al.*, 2001). Ainsi les paramètres observés individuellement ne semblent pas assez spécifiques pour pouvoir être considérés comme des indicateurs à eux seuls d'un état d'ARSA. Afin d'accroître la spécificité du diagnostic, une combinaison de plusieurs paramètres périphériques mesurés simultanément pourrait être proposée. Dans notre BDD, on peut observer que plusieurs paramètres provenant de différents compartiments sont souvent mesurés dans la même expérimentation. A titre d'exemple, la combinaison majoritairement observée (nExpe > 30) comprend le pourcentage de NDF dans la ration, le niveau d'ingestion des animaux ainsi que leur production laitière et les teneurs en matières grasses et protéines dans le lait mais aucune équation quantitative combinant plusieurs paramètres mesurés n'a été proposée. De plus, il apparaît que les expérimentations induisant l'ARSA sont bien souvent conduites uniquement dans le but d'explorer une seule conséquence physiopathologique à la chute de pH. Par conséquent, il est généralement retrouvé des expérimentations évaluant de façon systématique les performances globales des animaux en acidose et évaluant ensuite spécifiquement l'état inflammatoire altéré alors que d'autres vont s'intéresser à la composition du lait ou encore au comportement alimentaire ou général de l'animal.

CONCLUSION

Ce travail a permis de construire une BDD expérimentale rapportant à la fois des paramètres périphériques et des cinétiques de pH ruminal mesurés sur des animaux soumis à des protocoles d'induction de l'ARSA. Ainsi, nous avons pu répertorier 30 indicateurs périphériques des variations significatives du pH ruminal. Ces paramètres peuvent refléter des modifications de performances zootechniques, de comportement alimentaire, de qualité nutritionnelle du lait ou d'état inflammatoire accompagnant l'état d'acidose et regroupent également certaines caractéristiques de la ration. Néanmoins, cette BDD a pu montrer que, pour la majorité des expérimentations, seule une fonction altérée était étudiée dans les protocoles d'induction de l'ARSA à l'échelle moyenne des traitements. Afin de développer un diagnostic plus précis de l'ARSA, nous suggérons de mener de nouvelles expérimentations développant une approche diagnostic multiparamétrique et synchrone de l'ARSA à l'échelle de l'animal afin de renforcer la fiabilité de la détection de la maladie.

BIBLIOGRAPHIE

- Allen, M. S. 1997. Relationship between fermentation acid production in the rumen and the requirement for physically effective fiber. *Journal of Dairy Science* 80(7):1447-1462.
- Bailey, C. et C. Balch. 1961. Saliva secretion and its relation to feeding in cattle. 2. The composition and rate of secretion of mixed saliva in the cow during rest. *British Journal of Nutrition* 15:383-402.
- Bauman, D. E. et J. M. Griinari. 2003. Nutritional regulation of milk fat synthesis. *Annual review of nutrition* 23(1):203-227.
- Beauchemin, K., S. Zelin, D. Genner, et J. Buchanan-Smith. 1989. An automatic system for quantification of eating and ruminating activities of dairy cattle housed in stalls. *Journal of Dairy Science* 72(10):2746-2759.
- Beauchemin, K. A. 1991. Effects of Dietary Neutral Detergent Fiber Concentration and Alfalfa Hay Quality on Chewing, Rumen Function, and Milk Production of Dairy Cows¹. *Journal of Dairy Science* 74(9):3140-3151.
- Beauchemin, K. A., W. Z. Yang, D. P. Morgavi, G. R. Ghorbani, W. Kautz, et J. A. Leedle. 2003. Effects of bacterial direct-fed microbials and yeast on site and extent of digestion, blood chemistry, and subclinical ruminal acidosis in feedlot cattle. *Journal of Animal Science* 81(6):1628-1640.
- Bramley, E., I. J. Lean, W. J. Fulkerson, M. A. Stevenson, A. R. Rabiee, et N. D. Costa. 2008. The Definition of Acidosis in Dairy Herds Predominantly Fed on Pasture and Concentrates. *Journal of Dairy Science* 91(1):308-321.
- Buccioni, A., M. Decandia, S. Minieri, G. Molle, et A. Cabiddu. 2012. Lipid metabolism in the rumen: New insights on lipolysis and biohydrogenation with an emphasis on the role of endogenous plant factors. *Animal Feed Science and Technology* 174(1):1-25.
- Chen, Y. et M. Oba. 2012. Variation of bacterial communities and expression of Toll-like receptor genes in the rumen of steers differing in susceptibility to subacute ruminal acidosis. *Veterinary Microbiology* 159(3):451-459.
- Dijkstra, J., H. Boer, J. Van Bruchem, M. Bruining, et S. Tamminga. 1993. Absorption of volatile fatty acids from the rumen of lactating dairy cows as influenced by volatile fatty acid concentration, pH and rumen liquid volume. *British Journal of Nutrition* 69(2):385-396.
- Dohme, F., T. DeVries, et K. Beauchemin. 2008. Repeated ruminal acidosis challenges in lactating dairy cows at high and low risk for developing acidosis: Ruminal pH. *Journal of Dairy Science* 91(9):3554-3567.
- Enemark, J. M., R. J. Jorgensen, et N. B. Kristensen. 2004. An evaluation of parameters for the detection of subclinical rumen acidosis in dairy herds. *Veterinary Research Communication* 28(8):687-709.
- Enjalbert, F., M. Nicot, C. Bayourthe, et R. Moncoulon. 2001. Ketone bodies in milk and blood of dairy cows: Relationship between concentrations and utilization for detection of subclinical ketosis. *Journal of Dairy Science* 84(3):583-589.
- Enjalbert, F., Y. Videau, M.-C. Nicot, et A. Troegeler-Meynadier. 2008. Effects of induced subacute ruminal acidosis on milk fat content and milk fatty acid profile. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 92(3):284-291.
- Fievez, V., E. Colman, J. Castro-Montoya, I. Stefanov, et B. Vlaeminck. 2012. Milk odd-and branched-chain fatty acids as biomarkers of rumen function—An update. *Animal Feed Science and Technology* 172(1):51-65.
- Gao, X. et M. Oba. 2014. Relationship of severity of subacute ruminal acidosis to rumen fermentation, chewing activities, sorting behavior, and milk production in lactating dairy cows fed a high-grain diet. *Journal of Dairy Science* 97(5):3006-3016.
- Gao, X. et M. Oba. 2015. Short communication: Noninvasive indicators to identify lactating dairy cows with a greater risk of subacute rumen acidosis. *Journal of Dairy Science* 98(8):5735-5739.
- Gasteiner, J., M. Horn, et A. Steinwider. 2015. Continuous measurement of reticuloruminal pH values in dairy cows during the transition period from barn to pasture feeding using an indwelling wireless data transmitting unit. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 99(2):273-280.
- Geishauser, T. 1993. An instrument for collection and transfer of ruminal fluid and for administration of water soluble drugs in adult cattle. *Bovine Practitioner* 27:38-38.

- González, L. A., X. Manteca, S. Calsamiglia, K. S. Schwartzkopf-Genswein, et A. Ferret. 2012. Ruminal acidosis in feedlot cattle: Interplay between feed ingredients, rumen function and feeding behavior (a review). *Animal Feed Science and Technology* 172(1–2):66-79.
- Inal, F., E. Gürbüz, B. Coşkun, et M. S. Alataş. 2015. A comparison of different analysis methods for milk urea nitrogen. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg* 21(5):767-772.
- INRA. 2010. Valeur alimentaire des fourrages et des matières premières: tables et prévisions. in *Alimentation des bovins, ovins et caprins. Besoins des animaux.* . Institut National de la Recherche Agronomique ed. Quae. Institut National de la Recherche Agronomique, Paris, France.
- Kimura, A., S. Sato, H. Goto, N. Yamagishi, K. Okada, H. Mizuguchi, et K. Ito. 2012. Simultaneous estimation of the pH of rumen and reticulum fluids of cows using a radio-transmission pH-measurement system. *Journal of Veterinary Medical Science* 74(4):531-535.
- Kleen, J. L. et C. Cannizzo. 2012. Incidence, prevalence and impact of SARA in dairy herds. *Animal Feed Science and Technology* 172(1):4-8.
- Krause, K. M., D. K. Combs, et K. A. Beauchemin. 2002. Effects of Forage Particle Size and Grain Fermentability in Midlactation Cows. I. Milk Production and Diet Digestibility. *Journal of Dairy Science* 85(8):1936-1946.
- Lamy, E. et M. Mau. 2012. Saliva proteomics as an emerging, non-invasive tool to study livestock physiology, nutrition and diseases. *Journal of Proteomics* 75(14):4251-4258.
- Lane, G., C. Noller, V. Colenbrander, K. Cummings, et R. Harrington. 1968. Apparatus for obtaining ruminoreticular samples and the effect of sampling location on pH and volatile fatty acids. *Journal of Dairy Science* 51(1):114-116.
- Lechartier, C. et J. L. Peyraud. 2010. The effects of forage proportion and rapidly degradable dry matter from concentrate on ruminal digestion in dairy cows fed corn silage-based diets with fixed neutral detergent fiber and starch contents. *Journal of Dairy Science* 93(2):666-681.
- Leonardi, C. et L. Armentano. 2003. Effect of quantity, quality, and length of alfalfa hay on selective consumption by dairy cows. *Journal of Dairy Science* 86(2):557-564.
- Lettat, A., P. Nozière, M. Silberberg, D. P. Morgavi, C. Berger, et C. Martin. 2012. Rumen microbial and fermentation characteristics are affected differently by bacterial probiotic supplementation during induced lactic and subacute acidosis in sheep. *BMC Microbiology* 12.
- Li, S., E. Khafipour, D. O. Krause, A. Kroeker, J. C. Rodriguez-Lecompte, G. N. Gozho, et J. C. Plaizier. 2012. Effects of subacute ruminal acidosis challenges on fermentation and endotoxins in the rumen and hindgut of dairy cows. *Journal of Dairy Science* 95(1):294-303.
- Lohölter, M., R. Rehage, U. Meyer, P. Lebzien, J. Rehage, et S. Dänicke. 2013. Evaluation of a device for continuous measurement of rumen pH and temperature considering localization of measurement and dietary concentrate proportion. *Applied Agricultural and Forestry Research* :61.
- Martin, C., L. Brossard, et M. Doreau. 2006. Mécanismes d'apparition de l'acidose latente et conséquences physiopathologiques et zootechniques. *INRA Productions Animales* 19(2):93-108.
- Meignan, T., C. Lechartier, G. Chesneau, et N. Bareille. 2017. Effects of feeding extruded linseed on production performance and milk fatty acid profile in dairy cows: A meta-analysis. *Journal of Dairy Science* 100(6):4394-4408.
- Mohan, G., A. Kumar, et B. Naik. 2015. Effect of rumen fermentative disorders on physiological parameters in buffaloes. *Internal Journal of Veterinary Science* 4(1):10-14.
- Moher, D., A. Liberati, J. Tetzlaff, D. G. Altman, et P. Group. 2009. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. *PLoS medicine* 6(7):e1000097.
- Monteils, V., M. Rey, M. Silberberg, L. Cauquil, et S. Combes. 2012. Modification of activities of the ruminal ecosystem and its bacterial and protozoan composition during repeated dietary changes in cows. *Journal of Animal Science* 90:4431-4440.
- Neubauer, V., E. Humer, I. Kröger, T. Braid, M. Wagner, et Q. Zebeli. 2017. Differences between pH of indwelling sensors and the pH of fluid and solid phase in the rumen of dairy cows fed varying concentrate levels. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*.
- O'Grady, L., M. L. Doherty, et F. J. Mulligan. 2008. Subacute ruminal acidosis (SARA) in grazing Irish dairy cows. *The Veterinary Journal* 176(1):44-49.

- Offner, A., A. Bach, et D. Sauvant. 2003. Quantitative review of in situ starch degradation in the rumen. *Animal Feed Science and Technology* 106(1):81-93.
- Penner, G., K. Beauchemin, et T. Mutsvangwa. 2007. Severity of ruminal acidosis in primiparous Holstein cows during the periparturient period. *Journal of Dairy Science* 90(1):365-375.
- Plaizier, J. C., E. Khafipour, S. Li, G. N. Gozho, et D. O. Krause. 2012. Subacute ruminal acidosis (SARA), endotoxins and health consequences. *Animal Feed Science and Technology* 172(1-2):9-21.
- Reis, L. F., A. H. Minervino, C. A. Araújo, R. S. Sousa, F. L. Oliveira, F. A. Rodrigues, E. Meira-Júnior, R. A. Barrêto-Júnior, C. S. Mori, et E. L. Ortolani. 2014. Comparison of rumen fluid pH by continuous telemetry system and bench pH meter in sheep with different ranges of ruminal pH. *The Scientific World Journal* 2014.
- Rémond, D., I. Ortigues, et J.-P. Jouany. 1995. Energy substrates for the rumen epithelium. *Proceedings of the Nutrition Society* 54(1):95-105.
- Sauvant, D. et D. Mertens. 2001. Empirical modeling of ruminal pH from dietary NDF and mean particle size. *Journal of Dairy Science* 84:198-199.
- Sauvant, D., F. Meschy, et D. Mertens. 1999. Les composantes de l'acidose ruminale et les effets acidogènes des rations. *INRA Productions Animales* 12:49-60.
- Sauvant, D. et J. Peyraud. 2010. Calculs de ration et évaluation du risque d'acidose. *INRA Productions Animales* 23(4):333.
- Sauvant, D., P. Schmidely, J.-J. Daudin, et N. R. St-Pierre. 2008. Meta-analyses of experimental data in animal nutrition. *Animal* 2(8):1203-1214.
- Schwartzkopf-Genswein, K., K. Beauchemin, D. Gibb, D. Crews Jr, D. Hickman, M. Streeter, et T. McAllister. 2003. Effect of bunk management on feeding behavior, ruminal acidosis and performance of feedlot cattle: A review. *Journal of Animal Science* 81:149-158.
- Stone, W. C. 1999. The effect of subclinical rumen acidosis on milk components. Pages 40-46 in *Proc. Proc. Cornell Nutr. Conf. Feed Manuf. Cornell Univ., Ithaca NY*.
- Theurer, C., O. Lozano, A. Alio, A. Delgado-Elorduy, M. Sadik, J. Huber, et R. Zinn. 1999. Steam-processed corn and sorghum grain flaked at different densities alter ruminal, small intestinal, and total tract digestibility of starch by steers. *Journal of Animal Science* 77(10):2824-2831.
- Trevisi, E., N. Jahan, G. Bertoni, A. Ferrari, et A. Minuti. 2015. Pro-inflammatory cytokine profile in dairy cows: consequences for new lactation. *Italian Journal of Animal Science* 14(3).
- Villot, C., B. Meunier, J. Bodin, C. Martin, et M. Silberberg. 2017. Relative reticulo-rumen pH indicators for subacute ruminal acidosis detection in dairy cows. *Animal* :1-10.
- Vlaeminck, B., V. Fievez, S. Tamminga, R. Dewhurst, A. Van Vuuren, D. De Brabander, et D. Demeyer. 2006. Milk odd-and branched-chain fatty acids in relation to the rumen fermentation pattern. *Journal of Dairy Science* 89(10):3954-3964.
- Wiese, B. I. 2017. Defining the risk, prevalence, and pathological threshold of low ruminal pH in feedlot cattle. Thèse.
- Zebeli, Q. et B. U. Metzler-Zebeli. 2012. Interplay between rumen digestive disorders and diet-induced inflammation in dairy cattle. *Research in Veterinary Science* 93(3):1099-1108.
- Zebeli, Q., B. U. Metzler-Zebeli, et B. N. Ametaj. 2012. Meta-analysis reveals threshold level of rapidly fermentable dietary concentrate that triggers systemic inflammation in cattle. *Journal of Dairy Science* 95(5):2662-2672.

HYPOTHÈSES ET STRATÉGIE DE TRAVAIL

Cette thèse s'inscrit au sein du projet **PeriRAPa** (Peripheral's Rumen Acidosis Parameters) entrepris par l'INRA avec le support financier des entreprises Lallemand, Terrena, et Valorex. Il a débuté en Décembre 2013 devant l'hypothèse que même si le pH ruminal semble être le paramètre le plus pertinent pour refléter la dynamique des fermentations ruminales, il comporte cependant des limites et il n'est sans doute pas le seul indicateur du dysfonctionnement du rumen induit lors des situations d'ARSA.

Comme cela a été montré dans la partie bibliographique de ce manuscrit, définir précisément cette maladie est un challenge car il n'existe aucun gold standard. Même si des valeurs seuils entre 5,5 et 5,8 sont souvent évoquées dans la littérature pour déterminer les animaux en ARSA, aucun consensus scientifique n'est à ce jour clairement établi (Tableau 1, p 4). Cet état ruminal perturbé de façon temporaire n'est alors pas suffisamment intense et long pour engendrer des signes cliniques immédiats (Nocek, 1997, Maulfair et al., 2013). Néanmoins l'ARSA est connu comme une maladie pouvant entraîner sur le long terme un grand nombre de conséquences physiopathologiques impactant la santé et les performances zootechniques des vaches laitières (Martin et al., 2006). Suite au désordre digestif induit en majeure partie par des rations très rapidement fermentescibles au niveau du rumen, des paramètres périphériques à ce compartiment digestif peuvent être perturbés et de nombreuses études se sont attachées à les mettre en évidence. Il pourrait alors être envisagé de les utiliser pour contribuer au diagnostic de l'ARSA dans les élevages. La baisse du niveau d'ingestion, du ratio TB/TP dans le lait ou encore l'apparition de marqueurs de l'inflammation dans le sang sont autant de paramètres classiquement recherchés. Cependant, ces derniers peuvent être modifiés dans d'autres situations, ils ne renferment alors pas une spécificité suffisamment importante pour cette maladie notamment en condition d'élevage où de nombreux facteurs interférents sont présents. Par ailleurs, une forte variabilité de réponse à l'échelle de l'individu face à l'induction de l'ARSA en conditions expérimentales est souvent observée, à la fois au niveau ruminal et/ou au niveau du métabolisme général de l'animal (Gao and Oba, 2014). Il semble donc inévitable de rassembler un maximum de critères informatifs permettant d'asseoir le diagnostic de l'ARSA sur le terrain.

Hypothèses et stratégie

Dans ce contexte, il apparaît évident qu'il est d'une part nécessaire d'améliorer les indicateurs pH permettant d'objectiver l'ARSA à l'échelle individuelle. L'hypothèse de travail serait que des indicateurs du pH ruminal obtenus de façon non invasive en utilisant des bolus intra-ruminaux pourraient être plus consensuels si le signal pH pouvait être normalisé pour chaque animal.

D'autre part, un seul paramètre périphérique au rumen ne semble pas suffisant pour refléter spécifiquement un état d'ARSA chez la vache laitière. C'est la raison pour laquelle notre seconde hypothèse serait que la combinaison de paramètres périphériques au rumen, lorsque mesurés de façon synchronisée, contribuerait à un diagnostic de l'ARSA plus précis et potentiellement plus précoce à l'échelle de l'individu.

Enfin, nous suspectons que des modèles de 2 ou 3 paramètres périphériques au rumen développés dans des conditions expérimentales soient éprouvés dans les élevages où la variabilité est très prononcée. Nous veillerons alors à évaluer la capacité prédictive de l'ARSA des modèles développés sur des animaux sélectionnés directement en élevage.

Mon programme de recherche s'est alors articulé autour de 4 grandes étapes :

1) **Etape préliminaire** : Réaliser une étude bibliographique quantitative, la plus exhaustive possible de la littérature pour sélectionner les paramètres périphériques représentatifs de situations d'ARSA et corrélés à des variations significatives du pH ruminal. Une pré-sélection de paramètres périphériques au rumen a alors été établie sur 1) leur capacité à varier face à des chute de pH ruminal, 2) leur pertinence scientifique face à l'induction de l'ARSA et 3) leur simplicité de mesure sur le terrain et leur caractère non-invasif pour l'animal.

Le résultat de ce travail bibliographique est présenté dans le Chapitre II.3 de ce manuscrit.

- 2) **Etude 1:** Une étude expérimentale conduite sur 11 vaches laitières primipares en situation d'ARSA provoquée a été réalisée afin de :

Objectif 1 : calculer de nouveaux indicateurs relatifs du pH ruminal (NpH) plus spécifiques et sensibles à l'ARSA, basés sur des cinétiques de pH normalisées et filtrées permettant une meilleure identification des individus en ARSA (*Chapitre III.1*).

Objectif 2 : décrire et observer les variations des paramètres périphériques au rumen présélectionnés dans l'étape préliminaire ainsi que d'autres plus novateurs que nous avons souhaité étudier. Des modèles combinant plusieurs paramètres périphériques au rumen ont alors été créés pour renforcer la précision du diagnostic de l'ARSA sur le terrain (*Chapitre IV.1*).

- 3) **Etude 2:** Un nouveau jeu de données obtenu dans le cadre d'un autre projet de recherche de l'équipe où un challenge d'ARSA a été induit chez 14 vaches laitières en lactation selon un protocole acidogène a été utilisé pour :

Objectif 1 : Valider les indicateurs relatifs du pH ruminal (NpH) mis en évidence dans l'étude 1 et étudier leur robustesse face à des individus présentant des variabilités en termes de stade physiologique de lactation et de conduites expérimentales (*Chapitre III.2*).

Objectif 2 : Etablir des seuils de risque de ces nouveaux indicateurs relatifs de pH ruminal (NpH) calculés pour identifier des animaux atteints d'ARSA ou non (*Chapitre III.2*).

- 4) **Etude 3:** un essai conduit initialement sur 64 vaches laitières équipées de bolus intraruminaux et provenant de 16 fermes différentes a permis de :

Objectif 1 : Identifier sur le terrain, des animaux en ARSA et des animaux non atteints au regard des valeurs individuelles des indicateurs NpH et de leur seuil de risque établis précédemment (*Chapitre IV.2*).

Objectif 2 : Evaluer les capacités prédictives des modèles de paramètres périphériques au rumen établis dans l'étude 1 pour le diagnostic de l'ARSA directement dans des élevages commerciaux (*Chapitre IV.2*).

RÉSULTATS

CHAPITRE III : DÉVELOPPEMENT D'INDICATEURS RELATIFS DU PH (NPH) RUMINAL POUR LE DIAGNOSTIC DE L'ARSA

1. Calcul d'indicateurs relatifs du pH ruminal (NpH) pour la détection de l'ARSA chez la vache laitière

Animal, page 1 of 10 © The Animal Consortium 2017
doi:10.1017/S1751731117001677



Relative reticulo-rumen pH indicators for subacute ruminal acidosis detection in dairy cows

C. Villot^{1,2,3,4}, B. Meunier¹, J. Bodin⁵, C. Martin¹ and M. Silberberg^{1†}

¹Université Clermont Auvergne, Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), VetAgro Sup, UMR Herbivores, F-63122 Saint-Genès-Champanelle, France;

²Lallemand Animal Nutrition, F-31702 Blagnac, France; ³Valorex, La Messayais, F-35210 Combourtille, France; ⁴Terrena, La Noëlle, F-44150 Ancenis, France;

⁵Arkesys, F-69007 Lyon, France

(Received 1 February 2017; Accepted 14 June 2017)

Publié dans Animal, Juin 2017

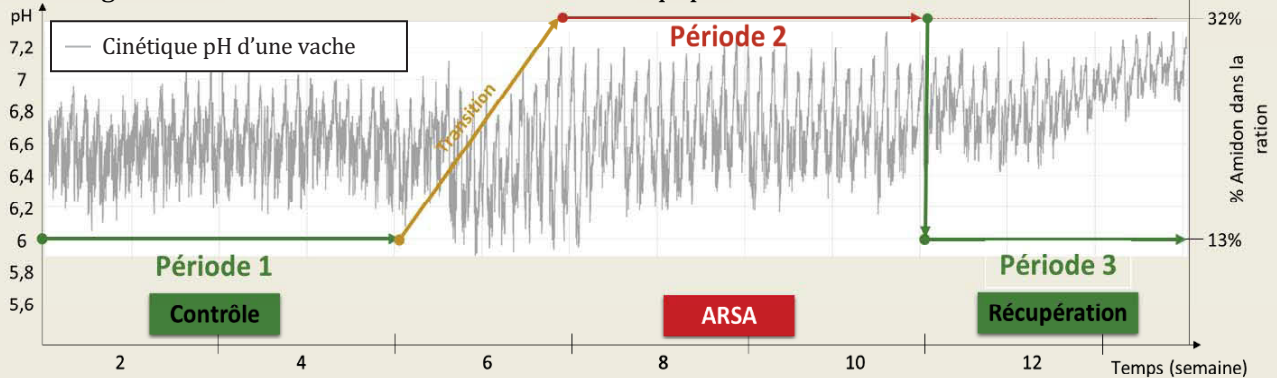
CALCUL D'INDICATEURS RELATIFS DU PH RUMINAL (NpH) POUR LA DETECTION DE L'ARSA CHEZ LA VACHE LAITIERE

Objectifs :

- Etudier les variations journalières de pH ruminal caractérisant une situation d'ARSA
- Décomposer et nettoyer la cinétique du pH mesuré en continu avec des capteurs réticulo-ruminaux afin d'extraire et calculer des indicateurs de l'ARSA plus précis

Matériel & Méthodes :

Etude longitudinale de l'ARSA sur 10 vaches laitières équipées de canules ruminales

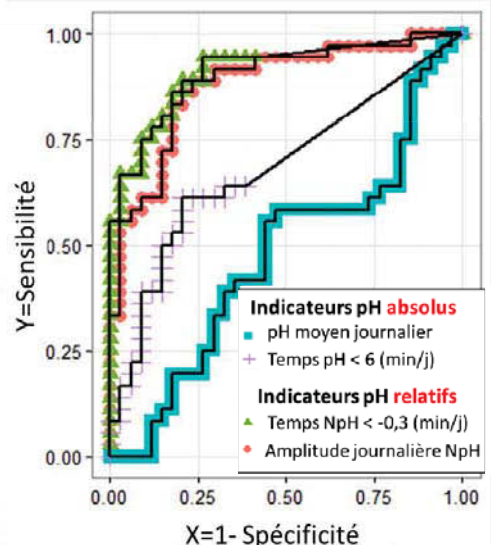
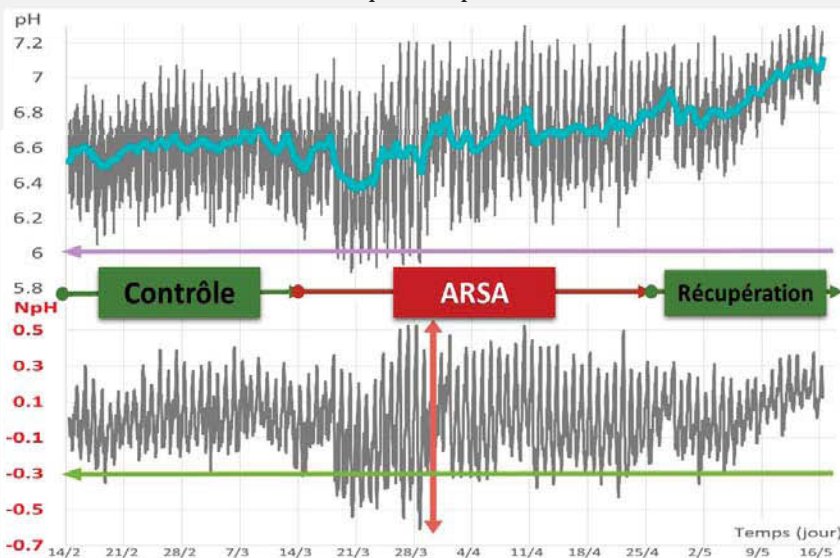


- Analyses des paramètres physiologiques couramment étudiés lors de challenge d'ARSA
- Suivi en continu du pH avec des bolus ruminaux
- Calcul et comparaison d'indicateurs du pH ruminal issus de cinétiques brutes et normalisées

Résultats :

1. Filtrage du signal pH (bruit de mesure, dérive des capteurs)
2. Normalisation des cinétiques de pH sur 0

3. Test diagnostique de l'ARSA (courbe ROC)



⇒ Signal pH normalisé et filtré : **NpH**

⇒ Aire sous la courbe (ASC) des indicateurs **NpH** > pH absolu

Conclusion :

- La cinétique des données brutes du pH ruminal est composée de plusieurs signaux interférents (bruits de mesure et dérive)
- Les indicateurs pH journaliers calculés sur des cinétiques normalisées et filtrées (**NpH**) permettent une meilleure détection de l'ARSA en conditions expérimentales que les indicateurs couramment utilisés

Relative reticulo-rumen pH indicators for subacute ruminal acidosis detection in dairy cows

C. Villot^{1,2,3,4}, B. Meunier¹, J. Bodin⁵, C. Martin¹ and M. Silberberg^{1†}

¹Université Clermont Auvergne, Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), VetAgro Sup, UMR Herbivores, F-63122 Saint-Genès-Champanelle, France;

²Lallemand Animal Nutrition, F-31702 Blagnac, France; ³Valorex, La Messayais, F-35210 Combourtille, France; ⁴Terrena, La Noëlle, F-44150 Ancenis, France;

⁵Arkesys, F-69007 Lyon, France

(Received 1 February 2017; Accepted 14 June 2017)

Subacute ruminal acidosis (SARA) is usually characterized by abnormal and intermittent drops in rumen pH. Nevertheless, high individual animal variability in rumen pH and the difference in measurement methods for pH data acquisition decrease the sensitivity and accuracy of pH indicators for detecting SARA in ruminants. The aim of this study was to refine rumen pH indicators in long-term SARA based on individual dairy cow reticulo-rumen pH kinetics. Animal performances and rumen parameters were studied weekly in order to validate SARA syndrome and rumen pH was continuously measured using reticulo-rumen sensors. In total, 11 primiparous dairy cows were consecutively fed two different diets for 12 successive weeks: a control diet as low-starch diet (LSD; 13% starch for 4 weeks in period 1), an acidotic diet as high-starch diet (HSD; 32% starch for 4 weeks in period 2), and again the LSD diet (3 weeks in period 3). There was a 1-week dietary transition between LSD and HSD. Commonly used absolute SARA pH indicators such as daily average, area under the curve (AUC) and time spent below pH < 5.8 and pH < 6 were processed from absolute (raw) daily kinetics. Then signal processing was applied to raw pH values in order to calculate relative pH indicators by filtering and normalizing data to remove inter-individual variability, sensor drift and sensor noise. Normalized AUC, times spent below $NpH < -0.3$ and $NpH < -0.5$, NpH range and NpH standard deviation were calculated. Those relative pH indicators were compared with commonly used pH indicators to assess their ability to detect SARA. This syndrome induced by HSD was confirmed by consistent expected changes in milk quality, dry matter intake and acetate : propionate ratio in the rumen, whereas the ruminal concentration of lipopolysaccharide was increased. Commonly used pH SARA indicators were not able to discriminate SARA syndrome due to high animal variability and sensor drift and noise, whereas relative pH indicators developed in this study appeared more relevant for SARA detection as assessed by receiver operating characteristic tests. This work shows that absolute pH kinetics should be corrected for drift, noise and animal variability to produce relative pH indicators that are more robust for SARA detection. These relative pH indicators could be more relevant for identifying affected animals in a herd and also for comparing SARA risk among studies.

Keywords: subacute ruminal acidosis (SARA), reticulo-rumen pH sensor, relative pH indicators, signal processing, dairy cow

Implications

Subacute ruminal acidosis (SARA) is mainly characterized by pH depression, but hitherto no universal rumen pH indicators have been established because of variability in animals and in pH measurement methods. In the present work we have implemented a mathematical method for processing rumen pH signals recorded by *in situ* rumen sensors, thus overcoming inter-animal variability and suppressing noise and drift of the sensor. The relative pH indicators obtained appeared more relevant than commonly used pH indicators for detection of long-term SARA syndrome in dairy cows.

Introduction

Intensive production systems have the common practice of feeding high-producing dairy cows with large quantities of starch associated with low fibre content to meet the energy requirements for milk production. Such unbalanced diets may negatively impact rumen function due to high acid production and reduced buffering capacity (Nagaraja and Titgemeyer, 2007). With a dairy cows prevalence of 15% in European countries (Kleen and Cannizzo, 2012; Stefańska *et al.*, 2016), the main ruminal disorder is known to be SARA which hitherto has been characterized by intermittent and moderate periods of depressed rumen pH (Enemark *et al.*, 2002).

† E-mail: Mathieu.silberberg@inra.fr

Rumen pH is the parameter most monitored when making SARA diagnosis. Historically, depending on the severity of SARA, daily average pH thresholds of 5.50 to 6.25 have been proposed (Sauvant *et al.*, 1999). However, pH value is significantly impacted by the measurement technique (Duffield *et al.*, 2004; Shen *et al.*, 2012) and depends upon sampling location (Gasteiner *et al.*, 2009), rumen contents and the frequency of pH measurement. The large variability of rumen conditions between animals also alters the robustness of absolute rumen pH indicators of SARA (Schwartzkopf-Genswein *et al.*, 2003). Consequently there is still no scientific consensus regarding pH thresholds for detection of SARA.

The use of rumen sensors to monitor reticulo-rumen pH is growing fast. Such devices are considered to be relevant, non-invasive and affordable tools that can help prevent SARA in the field (Kleen *et al.*, 2003; Klevenhusen *et al.*, 2014; Castro-Costa *et al.*, 2015). In addition, rumen sensors allow high-resolution kinetics of rumen pH (up to 1 measurement/min with some systems) and provide the opportunity to explore other integrative daily indicators of pH (time spent below threshold, pH range, etc.), which may be more relevant than average pH alone (Sauvant *et al.*, 1999; Kolver and De Veth, 2002). However, interpreting high-resolution pH kinetics is complex and requires guidelines to help researchers to obtain consensual data. The aim of this study was therefore to improve the accuracy of SARA syndrome detection in using relative pH indicators obtained from mathematically processed reticulo-rumen sensor data in dairy cows.

Material and methods

The trial was conducted at the dairy cow research facilities of the French National Institute for Agricultural Research in France (INRA, Theix) and was agreed by French ethics committee (approval no. C2E2A-02).

Animals, diets and experimental procedures

In total, 11 primiparous Holstein cows, including six rumen-fistulated animals, were tethered in individual stalls on concrete floors with rubber mats and had *ad libitum* access to water. At the start of the experiment, the average physiological status was as follows: a BW of 658 ± 37 kg, 135 ± 7 days in milk, a milk yield of 27.5 ± 2.3 kg/day. Two different total mixed diets (TMD) (Table 1) were distributed over 12 weeks of the longitudinal experiment (Figure 1). Cows received a low-starch diet (LSD) as control containing 13% starch for 4 weeks (period 1; P1). The amount of starch was then increased gradually every 2 days, from 13% to 35% during a 6-day transition to induce SARA. A high-starch diet (HSD) containing 35% starch was distributed for 4 weeks in order to maintain a long-term SARA challenge (period 2; P2). Finally, cows were again fed the control diet (LSD), without transition for 3 weeks (period 3; P3). All the diets were formulated to cover 105% of the requirements of lactating dairy cows and to be equivalent in terms of CP and gross energy

Table 1 *Ingredients and composition of experimental diets*

Item	Low-starch diet	High-starch diet
	P1 and P3	P2
Ingredients (% of DM)		
Concentrate : forage ratio	32 : 68	54 : 46
Hay	7.0	1.8
Corn silage	20.0	29.7
Grass silage	41.0	14.7
Wheat	5.6	20.9
Barley	5.0	20.6
Sugarcane molasses	0.38	0.15
Dehydrated beet pulp	7.5	2.9
Soybean meal	9.0	7.5
Rapeseed meal	3.8	1.5
Magnesium oxide	0.13	0.05
Dicalcium phosphate	0.25	0.10
Sodium chloride	0.13	0.05
Flavouring	0.04	0.01
Mineral–vitamin premix	0.19	0.07
Chemical composition (% of DM) ¹		
OM	91.0	95.0
NDF	39.0	30.0
ADF	21.0	17.0
Starch	13.0	35.0
Rumen digestible starch	10.3	30.0
CP	16.0	15.5
DCAD (mEq/DM kg)	380	235
Gross energy (MJ/kg of DM) ²	18.6	18.5

DM = dry matter; OM = organic matter; DCAD = dietary cation–anion difference.

¹Average chemical composition of a pool of samples ($n = 2$) collected in weeks 1 and 3 of each period 1, 2 and 3.

²Calculation according to INRA (2010).

(Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), 2010). Portions of 60% and 40% of the daily amount of the TMD were offered twice daily at 0900 and 1630 h, respectively. The desired quantity of TMD was obtained by daily adjustment of the amounts offered, depending on the refusals of the previous day.

Measurements and analysis

Intake and feed. Feed intake was measured and recorded twice daily throughout the experiment by weighing the feed offered and subtracting refusal weight. During each period, a representative sample of TMD (800 g) was taken in weeks 1 and 3 and pooled by diet; 500 g of each pool was used to determine dry matter (DM) content (60°C for 48 h), and 300 g were stored at -20°C . After defrosting at 21°C , pools were ground (0.75 mm screen sieve; Retsch GmbH, Haan, Germany) and analysed for chemical composition by InVivo Labs (Chierry, France). Organic matter was determined by ashing at 550°C for 6 h (method 942.05; Association of Official Analytical Chemists (AOAC), 2005). Total azote was analysed by combustion according to the Dumas method (method 968.06; AOAC, 2005), and CP content was calculated as $\text{N} \times 6.25$. Fibre (NDF and ADF) was determined (Van Soest *et al.*, 1991) after pre-treatment with amylase and

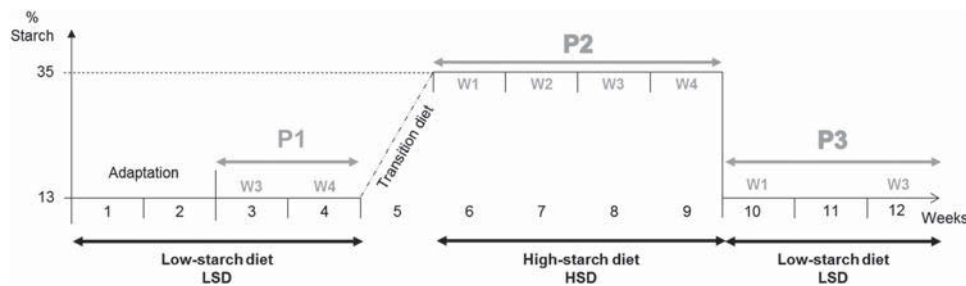


Figure 1 Experimental design of subacute ruminal acidosis challenge. All lactating cows ($n = 11$) were successively submitted to a low-starch diet (LSD; 32% concentrate + 68% forage) in period 1 (P1), a high-starch diet (HSD; 54% concentrate + 46% forage) in period 2 (P2) and a LSD similar to P1 in period 3 (P3); 8-week measurements were performed: 2 weeks in P1: W3P1, W4P1; 4 weeks in P2: W1P2, W2P2, W3P2, W4P2; and 2 weeks in P3: W1P3, W3P3.

expressed as exclusive of residual ash. Starch was analysed using an enzymatic method (Faisant *et al.*, 1995).

Milk yield and composition. Throughout the experiment, cows were milked twice daily at 0700 and 1600 h. Milk samples were collected over 2 days (four consecutive milkings) of each measurement week. The samples were stored at 4°C for a maximum of 20 h with potassium dichromate (Merck Chimie SAS, Fontenay-sous-Bois, France) before analysis of fat and protein content and somatic cell count (SCC) by mid IR (AOAC, 1997) using a three-channel spectrophotometer (MilkoScan 4000; Foss Electric A/S, Hillerod, Denmark and Laiterie Interprofessionnelle Auvergne Limousin, Theix, France). For each sample measurement, daily parameters were calculated based on the individual effective morning and evening milk production.

Kinetics of rumen pH. Rumen pH was monitored continuously throughout the experiment using a commercial sensor (eBolus; eCow, Exeter, UK). One sensor per cow was immersed in the reticulum through the oesophagus with the use of dedicated balling gun. The sensor was calibrated according to the manufacturer's recommendations before use. Each sensor was set up to record mean pH over 15 min (96 data points/day) with an accuracy of ± 0.1 . Data were downloaded every 15 days using eCow handset (smartphone + antenna) with eCow android application.

Rumen samples. Rumen samples were collected from the six fistulated cows for 2 weeks in P1 (weeks 3 and 4), 4 weeks in P2 (weeks 1 to 4) and 2 weeks in P3 (weeks 1 and 3). On day 3 of each measurement week, samples (500 g) of whole rumen content were collected through the rumen cannula 4 h after the morning feeding and subdivided:

(1) A first portion (~100 g) of rumen content was homogenized on ice (3×1 min cycles with 1-min intervals) using a polytron grinding mill (Fisher Scientific, Illkirch, France). One subsample of 0.5 g was stored (-80°C) in 2 ml Eppendorf tubes pending microbiota analyses by molecular biology, and another one (50 g) was transferred into a 50 ml sterile tube (-80°C) until analysis of free lipopolysaccharide (LPS) endotoxins. Deoxyribonucleic acid extraction was performed using the method of Yu and Morrison (2004). Quantitative polymerase chain reaction analyses were

performed using the Takara SYBR Premix Ex Taq kit (Lonza, France) on a Step One Plus apparatus (Applied Biosystems, Villebon sur Yvette, France) as described in Silberberg *et al.* (2013). Quantitative polymerase chain reaction conditions and primer sets targeting the *rrs* gene were those described previously by Denman and McSweeney (2006) for *Fibrobacter succinogenes* and *Ruminococcus flavefaciens* and by Stevenson and Weimer (2007) for *Selenomonas ruminantium* and *Streptococcus bovis*. For general bacteria quantification, primers 520f and 799r2 were used (Edwards *et al.*, 2007). Lipopolysaccharide concentration were determined by a chromogenic Limulus amoebocyte lysate end-point assay (QCL-1000; Cambrex Bio Science, Walkersville, MD, USA), in 96-well microtitre plates using pyrogen-free materials (glassware heated at 180°C for 4 h) and reagents. All samples were treated as previously described by Silberberg *et al.* (2013).

(2) The remaining portion of rumen content was filtered (400 μm nylon cloth) to separate and collect rumen fluid. For analysis of volatile fatty acids (VFA), 800 μl of rumen fluid was added to 500 μl of 0.5 N HCl containing 2% (w/v) metaphosphoric acid and 0.4% (w/v) crotonic acid before storage at -20°C . For protozoa enumeration, 1 ml of rumen fluid was added to 1 ml of methyl green-formalin-saline (MFS) solution (3.5% formaldehyde, 0.14 M NaCl, 0.92 mM methyl green) and stored at room temperature in the dark. Rumen fluid/MFS solution was diluted in an equal volume and protozoa were enumerated under a microscope (400 \times) in a Neubauer chamber (Dutscher, Brumath, France).

Calculations and statistical analysis

Rumen sensor pH data. Collected data were summarized with Excel Software and a Visual Basic for Application program was developed to synchronize and process the raw reticulo-rumen pH kinetics from all sensors. Each raw sequence of pH measurements is a time series (X_t) which may be modelled by adding a trend and cyclical components of different time constants: $X_t = Dt + Ct + Nt$ where Dt is the offset and long-term drift due, respectively, to initial calibration (± 0.05 pH unit), measurement accuracy over time (± 0.1 pH unit/30 days) and cow initial pH value; Ct the daily variation impacted by meal delivery frequency and diet composition; and Nt the high-frequency noise due to a matrix effect (rumen) and environmental conditions (temperature,

pressure, electrical artefacts). A signal processing algorithm was developed in order to isolate the potentially more interesting components (Ct) from abnormal or random variation (Dt and Nt). To this end a decomposition of the signal was performed using different combinations of weighted moving averages (WMA), which were (1) centred to avoid phase shifting, (2) weighted with a Gaussian function to give more importance to the neighbouring points and (3) windowed with a period of time adapted to the time constant of the component of interest. Thus, the noise (Nt) was removed with a WMA of 180 min producing smoothed kinetics (XtS) and the offset and drift were modelled with a WMA of 8 weeks and subtracted from the smoothed kinetics (XtS) to produce filtered-normalized kinetics (XtN). Information carried by the raw signal (Xt) was summarized on a daily basis by calculating the following absolute pH indicators (strictly from the synchronized raw data):

- pH average;
- pH minimum;
- pH maximum;
- time pH < 5.6, 5.8 and 6 (min/day).

After signal processing, the calculation of relative daily indicators was possible using the filtered and normalized kinetics (XtN):

- NpH range = $NpH_{\max} - NpH_{\min}$;
- NpH standard deviation;
- time NpH < -0.3 and NpH < -0.5 pH units (min/day): cumulative time when pH was below the relative pH threshold of 0.3 or 0.5 units lower than the individual NpH centred to 0.
- Area under curve (AUC) NpH < -0.3 and NpH < -0.5 relative pH units: AUC of the relative pH threshold of 0.3 or 0.5 units lower than individual NpH centred to 0, measured in pH × minutes.

Statistical analysis

All data were analysed using R3.2.3 software. For each variable, individual data collected daily (or several days a week) throughout the experiment were averaged per week. When necessary, data were log-transformed before analysis in order to create a normal distribution and to reach assumptions of the statistical models (LPS, total protozoa, pH indicators: time pH < 5.6, 5.8, 6, time NpH < -0.3, < -0.5 and AUC NpH < -0.3, < -0.5). Three different data analysis methods were implemented successively:

(1) A linear mixed model to identify the variables significantly modified between the 8 weeks of the experiment (2 weeks in P1, 4 weeks in P2 and 2 weeks in P3):

$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + C_k + \varepsilon_{ijk}$, where Y_{ijk} is the dependant variable, μ the mean, A_i the fixed effect of period, B_j the fixed effect of week nested in period, C_k the random animal effect and ε_{ijk} the residual error term (denominator degrees of freedom (DDFM), Kenward-Roger). Week was considered as a repeated measure. Least square means with the standard error (SE) of the model were reported in tables of results.

Differences were considered significant when $P < 0.05$, and *post hoc* analyses were carried out using the Tukey test to establish pairwise differences between the 8 weeks of measurements and the three periods.

(2) A principal component analysis (PCA) was designed to illustrate mixed models and highlight the relationships between dairy cow performances and rumen parameters during SARA challenge. Principal component analysis was performed on variables averaged by week for P1 (2 weeks) and P2 (4 weeks); in P3, weeks 1 and 3 were kept individually in order to study the potential of each variable to recover normal values following a SARA challenge. To eliminate high inter-animal variability and also to discover useful information with the PCA, an individual normalization cow by cow was implemented. To deal with missing row values of non-fistulated cows, the imputation approach described in Josse and Husson (2012) was applied. Principal component analysis performed only with the results from the six fistulated cows showed similar scores and loading plots.

(3) A receiver operating characteristic (ROC) to evaluate the potential interest of absolute and relative rumen pH indicators as a prognostic test for SARA (Greiner *et al.*, 2000). Sensitivity of the test was the probability of a positive test given that a cow would be in SARA challenge; specificity was the probability of a negative test given that a cow would not be in SARA challenge. Overall accuracy of the indicators in detecting SARA was represented by AUC with a 95% confidence interval. Best cut-off point was defined as the maximum sum of sensitivity and specificity. Receiver operating characteristic analyses were performed on all the subsequent rumen pH indicators from reticulo-rumen sensors in which weekly means of P1 (2 weeks) and P3 (2 weeks) (LSD) with weekly means of P2 (4 weeks) (HSD) were differentiated. All calculations were performed by using the statistical package of the pROC test in R3.2.3 software. To compare the accuracy of pH indicators in detecting SARA syndrome, DeLong's test was performed for each individual ROC result compared with time pH < 6 as reference. A P -value < 0.05 was considered statistically significant.

Results

Cow performances, rumen microbiota and fermentative parameters

Cow performances and rumen parameters differed between periods ($P < 0.001$; Table 2). A decrease in dry matter intake (DMI) was observed when cows were fed with HSD (P2) compared with LSD (P1 and P3); and on average DMI in P3 remained lower than in P1 (17.67 v. 18.98 kg/day). According to week effect, intake of the cows remained lower for each week of HSD and W1P3 in comparison with W3W4P1 except for W3P2 where intake was not different to W3P1. The lowest DMI was recorded at W2P2. Cows recovered initial W3W4P1 values of intake at W3P3.

A continuous decrease of milk yield was observed during the three periods of the experiment ($P < 0.001$). Milk fat: protein ratio was inverted (<1) when cows were fed with

Table 2 Effect of high-starch diet on dairy cow performances and rumen parameters

Items	LSD ¹			LSD			HSD			LSD			Week	Model	
	Mean over the period			P1			P2			P3					P-value
	P1	P2	P3	Week 3	Week 4	Week 1	Week 2	Week 3	Week 4	Week 1	Week 2	Week 3			
Dry matter intake (kg/day)	18.98 ^C	16.54 ^A	17.67 ^B	<0.001	19.51 ^C	18.45 ^{bc}	16.86 ^a	15.96 ^a	17.23 ^{ab}	16.13 ^a	16.14 ^a	19.19 ^c	16.14 ^a	<0.001	1.01
Milk yield (kg/day)	27.18 ^C	25.68 ^B	24.74 ^A	<0.001	27.49 ^C	26.87 ^{bc}	25.84 ^{ac}	25.68 ^{ab}	25.86 ^{ac}	25.36 ^{ab}	24.90 ^a	24.58 ^a	24.90 ^a	<0.001	1.35
Milk composition (g/l)															
Fat	39.47 ^B	33.5 ^A	38.62 ^B	<0.001	39.09 ^b	39.85 ^b	35.51 ^{ab}	31.54 ^a	32.08 ^a	34.87 ^{ab}	38.36 ^b	38.88 ^b	38.36 ^b	<0.001	4.35
Protein	32.77 ^A	34.32 ^B	34.16 ^B	<0.001	32.84 ^a	32.71 ^a	34.47 ^{bc}	33.88 ^{ac}	33.93 ^{ac}	34.98 ^c	34.87 ^{bc}	33.45 ^{ab}	34.87 ^{bc}	<0.001	1.16
Lactose	52.73 ^B	52.54 ^B	51.92 ^A	0.012	52.67	52.79	52.31	52.75	52.75	52.33	51.91	51.92	51.92	0.126	0.94
Fat: protein ratio	1.21 ^B	0.97 ^A	1.13 ^B	<0.001	1.21 ^d	1.22 ^d	1.02 ^{ac}	0.92 ^a	0.94 ^{ab}	0.99 ^{ac}	1.10 ^{cd}	1.16 ^d	1.10 ^{cd}	<0.001	0.13
Log ₁₀ somatic cell count	4.81 ^A	5.15 ^B	4.75 ^A	0.006	4.80 ^a	4.90 ^a	5.36 ^b	5.03 ^{ab}	5.01 ^{ab}	5.19 ^{ab}	4.42 ^a	5.08 ^{ab}	4.42 ^a	0.012	0.43
Rumen total VFA (mM)	212	202	205	0.429	211 ^{ab}	214 ^{ab}	178 ^a	194 ^a	232 ^b	206 ^{ab}	196 ^{ab}	214 ^{ab}	196 ^{ab}	0.006	21.2
Rumen VFA composition (% of total)															
Acetate	60.9 ^B	58.1 ^A	61.8 ^B	<0.001	60.0 ^{bc}	62.0 ^c	64.0 ^c	55.4 ^a	56.8 ^{ab}	56.4 ^{ab}	62.5 ^c	61.1 ^c	62.5 ^c	<0.001	2.5
Propionate	19.6 ^A	22.5 ^B	18.0 ^A	<0.001	19.7 ^{ab}	19.6 ^{ab}	19.1 ^{ab}	27.1 ^c	22.7 ^{bc}	21.2 ^{ab}	17.7 ^a	18.2 ^a	17.7 ^a	<0.001	2.6
Acetate: propionate ratio	3.13 ^B	2.72 ^A	3.48 ^B	0.001	3.08 ^{bc}	3.19 ^{bc}	3.56 ^c	2.04 ^a	2.57 ^{ab}	2.70 ^{abc}	3.59 ^c	3.38 ^{bc}	3.59 ^c	<0.001	0.53
Butyrate	14.3 ^B	12.2 ^A	13.8 ^{AB}	0.008	15.0 ^c	13.6 ^{bc}	11.3 ^{ab}	10.1 ^a	12.6 ^{ab}	14.7 ^{bc}	13.1 ^{bc}	14.5 ^{bc}	13.1 ^{bc}	0.002	2.0
Valerate	2.5 ^A	3.9 ^B	2.8 ^A	<0.001	2.7 ^a	2.4 ^a	3.0 ^{ab}	4.1 ^{bc}	4.3 ^c	4.2 ^{bc}	2.8 ^a	2.9 ^a	2.8 ^a	<0.001	0.7
Rumen total bacteria (Log ₁₀ gene copy numbers/g DM)	12.71	12.73	12.72	0.948	10.66	10.76	10.62	10.82	ND	10.74	ND	10.72	ND	0.469	0.18
Rumen bacteria species (% of total bacteria)															
<i>Fibrobacter succinogenes</i> (×10 ⁻¹)	2.62	4.20	3.04	0.800	1.60	3.66	4.74	3.76	ND	4.11	ND	3.04	ND	0.110	0.19
<i>Ruminococcus albus</i> (×10 ⁻²)	0.98	1.54	0.9	0.122	0.74	1.22	1.55	1.84	ND	1.21	ND	1.81	ND	0.256	0.90
<i>Megasphaera elsdenii</i> (×10 ⁻²)	5.78 ^A	29.71 ^B	10.96 ^A	<0.001	4.88 ^a	6.67 ^a	35.52 ^b	17.27 ^{ab}	ND	36.34 ^b	ND	10.96 ^a	ND	0.001	15.0
<i>Selenomonas ruminantium</i> (×10 ⁻³)	7.31	8.88	7.22	0.580	6.87	7.74	10.26	6.75	ND	9.64	ND	7.22	ND	0.469	4.6
<i>Streptococcus bovis</i> (×10 ⁻²)	0.23	0.11	0.20	0.104	0.16	0.32	0.15	0.07	ND	0.12	ND	0.20	ND	0.131	0.18
Genus <i>Prevotella</i>	2.36	2.65	2.63	0.722	1.83 ^a	2.89 ^{ab}	1.90 ^a	3.79 ^b	ND	2.27 ^{ab}	ND	2.63 ^{ab}	ND	0.022	0.92
Total rumen protozoa (Log ₁₀ /ml)	5.35 ^B	4.89 ^A	5.02 ^A	0.001	5.31 ^c	5.38 ^{bc}	4.85 ^{ac}	4.75 ^a	4.93 ^{ac}	5.02 ^{ac}	4.87 ^{ac}	5.16 ^{ac}	4.87 ^{ac}	0.002	0.25
Rumen lipopolysaccharide (EU/ml)	3030	29085	6619	NA	1622	4438	9080	20985	50065	36213	7004	6235	7004	NA	22270
Log ₁₀ value	3.43 ^A	4.38 ^B	3.82 ^A	<0.001	3.21 ^a	3.65 ^{ab}	3.96 ^{ab}	4.32 ^c	4.70 ^c	4.56 ^c	3.85 ^b	3.79 ^b	3.85 ^b	0.002	0.423

NA = not applicable because the statistical analysis was conducted on natural Log₁₀ data; ND = not determined; SE = standard error of the global model.

A,B,C, Within a parameter, values with different superscripts differed when the period effect was significant (P-value <0.05).

a,b,c,d, Within a parameter, values with different superscripts differed when the week effect was significant (P-value <0.05).

¹Low-starch diet (LSD): 32% concentrate + 68% forage, containing 13% of starch.

²High-starch diet (HSD): 54% concentrate + 46% forage, containing 35% of starch; 8-week measurements were performed: 2 weeks in period 1 (P1); W3P1, W4P1; 4 weeks in period 2 (P2); W1P2, W2P2, W3P2, W4P2; and 2 weeks in period 3 (P3); W1P3, W3P3.

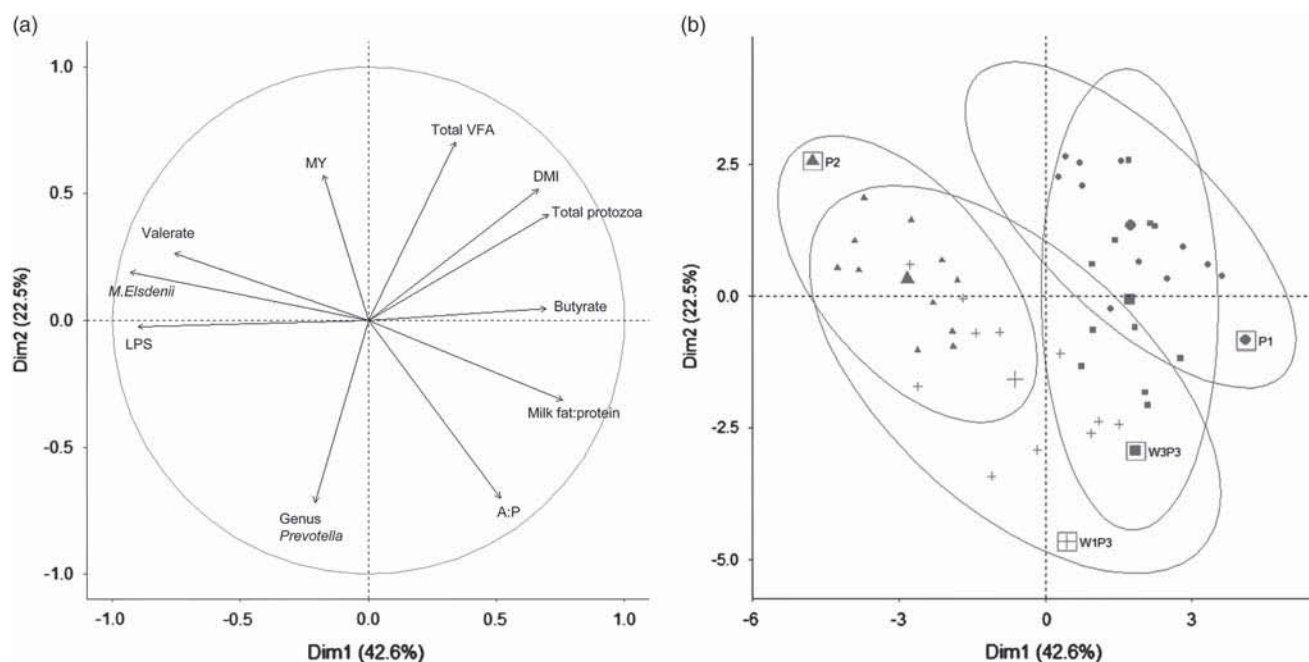


Figure 2 Principal component analysis (PCA) of dairy cow performances and rumen parameters. Results of PCA presented as (a) loading plot of the different variables, (b) score plot mean of 11 dairy cows (mean of weeks 3 and 4 in two observations/cow for period 1 (P1), mean of 4 observations/cow for period 2 (P2) and individual observation/cow for week 1 of period 3 (W1P3) and week 3 of P3 (W3P3)). The PCA was designed to illustrate mixed model results, and missing values were regenerated as described in Josse and Husson (2012). MY = milk yield; DMI = dry matter intake; VFA = volatile fatty acid; LPS = lipopolysaccharide; A : P = acetate : propionate ratio.

HSD ($P < 0.05$) and significantly lower than cows were fed with LSD. According to the week effect, the lowest fat : protein ratio was recorded during W2P2. Somatic cell count concentration was higher when cows were fed with HSD compared with LSD and a maximum concentration was observed during W1P2.

High-starch diet did not affect the concentration of total VFA compared with LSD, but significant variations among weeks of HSD were observed ($P < 0.05$). According to the week effect ($P = 0.006$), VFA concentration of W3P2 was greater than W1W2P2. Acetate : propionate ratio was below 3 when cows were fed with HSD ($P < 0.001$), and significantly higher with LSD. The lowest ratio was measured in W2P2 (2.04). An increase in valerate proportion was observed when HSD was distributed in comparison with LSD. The highest value of valerate was measured in W3P2. A decrease ($P = 0.008$) in butyrate proportion was noted during HSD distribution compared with P1 (LSD) and initial values did not completely recover during P3. According to the week effect, the lowest value of this parameter was observed in W2P2.

No significant variations of *F. succinogenes*, *Ruminococcus albus*, *S. ruminantium* and *S. bovis* were observed according to week and period effects. HSD did not affect the proportion of the genus *Prevotella* compared with LSD, but significant variations among weeks of HSD were observed ($P < 0.05$). The percentage of the genus *Prevotella* was significantly higher (3.79% of total bacteria) in W2P2 compared with W1P2 (1.90% of total bacteria) of HSD.

Higher *Megasphaera elsdenii* proportions were observed when cows were fed with HSD in comparison with LSD. For

total protozoa, a decrease was observed in P2 compared with P1 and initial values did not recover during P3. According to the week effect, a lowest value of total protozoa was observed in W2P2 in comparison with W3W4P1.

Relationships between dairy cow performances and rumen parameters

The first and second principal components (Dim1 and Dim2, respectively, 42.6% and 22.5%, Figure 2) of the PCA described 65.1% of the total variability in cow performances and rumen parameters observed throughout the experiment (P1 to P3). Observations of P1, P2 and W3P3 were mainly distributed along the Dim1 axis, with a negative correlation with Dim1 for P2, whereas P1 and W3P3 overlapped and clustered positively to Dim1. Lipopolysaccharide concentration and proportions of valerate and *M. elsdenii* were negatively correlated with Dim1, whereas DMI, milk fat : protein ratio, proportion of butyrate and concentration of total protozoa clustered positively to Dim1. A combination of variables was also able to describe clearly P1 and W3P3 v. P2: milk fat : protein, and A:P ratios, DMI, total protozoa, butyrate and valerate proportions. Butyrate proportion, milk fat : protein, and A : C ratios decreased during P2, whereas LPS concentration and valerate proportion increased. The W1P3 observations overlapped in P2 and P1.

Reticulo-rumen pH indicators

During P1, the signal of one reticulo-rumen pH sensor was irrecoverable in one non-fistulated cow, therefore, for all rumen pH variables, 10 cows were taken into account.

Table 3 Effect of high-starch diet on reticulo-rumen pH subacute ruminal acidosis indicators

Items	LSD ¹ HSD ² LSD			Period <i>P</i> -value	LSD		HSD				LSD		Week	Model SE
	Mean over the period				P1		P2				P3			
	P1	P2	P3		Week 3	Week 4	Week 1	Week 2	Week 3	Week 4	Week 1	Week 3		
Absolute pH indicators														
Average pH	6.46 ^A	6.54 ^B	6.70 ^C	<0.001	6.46 ^a	6.45 ^a	6.55 ^{ab}	6.52 ^a	6.51 ^a	6.57 ^{ab}	6.70 ^b	6.71 ^b	<0.001	0.11
pH min	6.26 ^B	6.09 ^A	6.40 ^B	<0.001	6.14 ^a	6.17 ^a	6.07 ^b	6.08 ^b	6.07 ^b	6.12 ^{ab}	6.38 ^c	6.41 ^c	<0.001	0.14
pH max	6.81 ^A	7.04 ^B	7.05 ^B	<0.001	6.86 ^a	6.77 ^a	7.04 ^b	7.04 ^b	7.03 ^b	7.05 ^b	7.08 ^b	7.02 ^b	<0.001	0.10
Time pH < 5.6 (min/day)	0	7	0	0.127	0	0	11	5	13	0	0	0	0.313	14.5
Time pH < 5.8 (min/day)	0 ^A	35 ^B	0 ^A	0.004	0 ^a	0 ^a	40 ^b	36 ^b	42 ^b	24 ^b	1 ^a	0 ^a	0.092	42.5
Time pH < 6 (min/day)	33 ^A	120 ^B	41 ^A	<0.001	18 ^a	48 ^a	122 ^b	124 ^b	131 ^b	102 ^b	19 ^a	63 ^{ab}	0.008	81
Relative pH indicators														
NpH range	0.46 ^A	0.78 ^B	0.54 ^A	<0.001	0.52 ^{ab}	0.40 ^a	0.80 ^c	0.79 ^c	0.79 ^c	0.76 ^c	0.55 ^b	0.52 ^{ab}	<0.001	0.10
NpH standard deviation	0.14 ^A	0.26 ^C	0.17 ^A	<0.001	0.16 ^{ab}	0.12 ^a	0.28 ^c	0.26 ^c	0.27 ^c	0.25 ^c	0.18 ^b	0.16 ^{ab}	<0.001	0.04
Time NpH < -0.3 (min/day)	23 ^A	218 ^B	31 ^A	<0.001	44 ^a	3 ^a	187 ^{bc}	203 ^c	285 ^c	197 ^{bc}	23 ^a	38 ^{ab}	<0.001	108.1
Time NpH < -0.5 (min/day)	0 ^A	41 ^B	0 ^A	<0.001	0 ^a	0 ^a	47 ^{ab}	30 ^{ab}	55 ^b	32 ^{ab}	0 ^a	0 ^a	<0.001	38.1
AUC NpH < -0.3	1.6 ^A	27.4 ^B	1.4 ^A	<0.001	3.2 ^a	0.0 ^a	30.4 ^b	20.8 ^b	36.2 ^b	22.2 ^b	1.3 ^a	1.5 ^a	<0.001	17.6
AUC NpH < -0.5	0.0 ^A	5.1 ^B	0.0 ^A	0.012	0.0 ^a	0.0 ^a	10.2 ^b	2.3 ^{ab}	6.2 ^{ab}	1.7 ^{ab}	0.0 ^a	0.0 ^a	0.014	7.22

SE = standard error of the model; AUC = area under the curve.

^{A,B,C} Within a parameter, values with different superscripts differed when the period effect was significant (P -value < 0.05).

^{a,b,c} Within a parameter, values with different superscripts differed when the week effect was significant (P -value < 0.05).

¹ Low-starch diet (LSD): 32% concentrate + 68% forage, containing 13% of starch.

² High-starch diet (HSD): 54% concentrate + 46% forage, containing 35% of starch; 8-week measurements were performed: 2 weeks in period 1 (P1): W3P1, W4P1; 4 weeks in period 2 (P2): W1P2, W2P2, W3P2, W4P2; and 2 weeks in period 3 (P3): W1P3, W3P3.

A high inter-animal variability and/or calibration inaccuracy was observed in individual daily pH average in P1, starting from 6.1 to 6.7 among dairy cows. Average pH increased in the three periods (6.46, 6.54 and 6.70 for P1, P2 and P3, respectively, P < 0.001; Table 3). Minimum pH was lower when cows received HSD (6.09) compared with LSD in P1 (6.26) and in P3 (6.40). A pH sensor drift was observed during the experiment (0.025 pH units/week). This drift was modelled using an 8-week moving average and then removed from the raw kinetics, thus producing normalized kinetics. Some high-frequency noise was observed as random negative peaks of pH. Normalized kinetics were smoothed using a 180-min moving average, thus producing filtered-normalized kinetics.

SARA indicators from raw kinetics: during P2, more time spent pH < 5.8 was observed (35 min/day) in comparison with P1 and P3 (0 min/day) (P = 0.004). The same result was observed for pH 6 threshold with more time spent pH < 6 in P2 (120 min/day) in comparison with P1 (33 min/day) and P3 (41 min/day) (P < 0.001). The values of these indicators peaked during W3P2.

SARA indicators from filtered-normalized kinetics: NpH range, standard deviation, time and AUC under relative thresholds of NpH -0.3 and -0.5 were increased significantly (P < 0.001) when cows were fed with HSD compared with LSD. The highest values of the NpH range (0.80) and NpH standard deviation (0.28) were noted in W1P2. More time spent under NpH thresholds of -0.3 (285 min/day) and -0.5 (55 min/day) were observed in W3P2. The highest values of the AUC under NpH thresholds of -0.3 (36.2) and -0.5 (6.2) were also observed in W3P2.

Table 4 Receiver operating characteristic test on both absolute and relative reticulo-rumen pH subacute ruminal acidosis indicators

Items	AUC of ROC curve ¹		
	Sensitivity ^{2,3}	Specificity ^{3,4}	
Absolute pH indicators			
Average pH	0.48	0.56	0.56
pH minimum	0.67	0.47	0.88
pH maximum	0.69	0.69	0.68
Time pH < 5.6 (min/day)	0.64	0.22	1.00
Time pH < 5.8 (min/day)	0.71	0.44	1.00
Time pH < 6 (min/day)	0.68	0.61	0.79
Relative pH indicators			
NpH range	0.88*	0.83	0.82
NpH standard deviation	0.90*	0.83	0.85
Time NpH < -0.3 (min/day)	0.91*	0.86	0.88
Time NpH < -0.5 (min/day)	0.78*	0.61	1.00
AUC NpH < -0.3	0.91*	0.86	0.82
AUC NpH < -0.5	0.78*	0.61	1.00

AUC = area under the curve; ROC = receiver operating characteristic.

ROC test performed on mean indicator pH results for W3P1, W4P1, W1P3 and W3P3 as health status, as opposed to W1P2, W2P2, W3P2, W4P2 as subacute ruminal acidosis (SARA) disease.

¹ Area under the curve of the ROC.

² The probability of a positive test given that the cow is in SARA conditions.

³ According to the best cut-off point defined as the maximum sum of sensitivity and specificity.

⁴ The probability of a negative test given that the cow is not in SARA conditions.

*AUC significantly different from time pH < 6 (P < 0.05, DeLong's test for two correlated ROC curves).

Receiver operating characteristic

For all absolute pH indicators (Table 4), the AUC of ROC curves were lower than 0.71. Time pH < 6 indicator had an AUC of 0.68 and 61% (sensitivity) of the results when cows

were fed with LSD were classified as non-SARA, whereas 79% (specificity) of the results when cows were fed with HSD were classified as SARA. For average pH, the ROC AUC was lower than 0.5, demonstrating that the test cannot distinguish between animals fed HSD and animals fed LSD.

For relative pH indicators, the highest AUC of ROC curves (0.91) was found for time $NpH < -0.3$ and for its AUC. Both sensitivities were 86% and specificity values were above 82%. DeLong's test indicated higher AUC of ROC curves for relative pH indicators compared with time spent under pH 6 ($P < 0.05$).

Discussion

We have investigated the extent to which relative pH indicators can help to improve the diagnosis of SARA in dairy cows. Since SARA has historically been characterized by rumen pH depression, the measurement of this indicator is still considered as the 'gold' standard in diagnosing this nutritional disease (AlZahal *et al.*, 2007). Single-point measurements of rumen pH were most commonly used until the rumen sensor was commercialized, and it has been clearly demonstrated that rumen pH kinetics carry more relevant information on rumen conditions because of large daily pH variability (Krause *et al.*, 2006). Therefore, monitoring rumen pH in real time is by far the most reliable technique to evaluate the risk of SARA (Penner *et al.*, 2007). In our study the absolute daily average pH did not decrease during SARA. Even if animals spent longer time under pH 5.8 and 6 during SARA, the lengths of time are clearly low compared with previous studies. For instance, Zebeli *et al.* (2008) reported an average of more than 320 min/day to define SARA, whereas in our study animals spent only 35 min/day under pH 5.8. Based only on daily average and pH thresholds established by previous studies to diagnose SARA, one may conclude that in our experiment cows did not experience SARA when they were fed HSD (P2). Nevertheless, cow performances and rumen parameters during the experiment clearly showed that the animals had other commonly described signs of SARA.

The high level of non-fibre carbohydrate in the HSD induced an increase in the rumen rate of carbohydrate fermentation and triggered rumen disorders confirmed by changes in performance data and rumen fermentative parameters. For instance, reduced DMI, altered milk production, decreased fat : protein ratio and increased SCC demonstrated that HSD had a consistent negative impact on cow performance in comparison with LSD as previously described (Plaizier *et al.*, 2008; Kleen and Cannizzo, 2012). Nevertheless, it is well known that not all of these parameters are specific to SARA and the variation of each parameter can appear at different time during SARA syndrome. Therefore, a combination of several parameters would be more appropriate and reliable in confirming acidotic conditions for cows fed HSD. Principal component analysis of all cow performance variables and rumen fermentative parameters clearly demonstrates the separation between P1 and W3P3 v. P2 and distinguishes the two contrasted conditions highlighting

SARA syndrome in P2. These results confirm that absolute pH indicators have several limitations for SARA detection.

In a harsh environment like reticulum where rumen fluid could slowly diffuse into the sensor and poison the reference electrode, drift (Dt) and noise (Nt) are frequently observed (Kaur *et al.*, 2010). In our experiment, both Dt and Nt were detected from the data of 10 sensors. This long-term drift started at day 29 and lasted until the end of the study. In addition, we observed large initial between-animal variability in daily average rumen pH, starting at 6.1 to 6.7, with a standard deviation of 0.25 pH units in P1. Consequently, absolute rumen pH changes in SARA syndrome also appear to vary greatly, as reported in several studies (Schwartzkopf-Genswein *et al.*, 2003; Penner *et al.*, 2007; Mohammed *et al.*, 2012). It is also well known that reticulo-rumen pH is higher than rumen pH, consequently it appears necessary to adapt SARA detection thresholds in respect to localization and pH measurement techniques (Sato *et al.*, 2012). Moreover reticulo-rumen sensors provides high-resolution pH kinetics that needs to be analysed in a standardized manner to obtained accurate and comparable SARA thresholds.

In the present study we aimed to propose a standardization of pH monitoring and signal processing from rumen pH sensors. Our first action was to use weighted reticulo-rumen sensors so they may always be located within the reticulum in order to avoid pH variations due to localization. Therefore, we do not advise the use of floating rumen pH sensors. At the end of the experiment the six sensors inserted in fistulated cows were recovered as expected in the reticulum. We also made the choice to apply a mathematical correction of the raw pH kinetics in order to establish more consensual SARA pH indicators. Taken together, the pH drift and noise associated with inter-animal variability clearly explained why the absolute average pH was not altered by SARA and why animals spent little time below thresholds of pH 5.8 or 6, compared with previous studies. Our approach using relative pH seems to be relevant and would allow more confident comparisons between studies, farms or animals in determining SARA syndrome. This approach would then allow the definition of relative pH thresholds and other accurate indicators such as range and standard deviation of daily rumen NpH during HSD.

A classification of both relative and absolute pH indicators was performed with a ROC test to establish their ability to detect SARA induced in our experimental conditions. The ROC AUC of absolute daily average pH (0.48) represents 0 discrimination, so using this indicator to detect SARA was non-informative. Numerous authors have reported that averaged pH values are not affected by large dietary changes. For example, Kennelly *et al.* (1999) did not observe a significant drop in rumen pH when concentrate was increased from 50% to 75% in the diet. The ROC test also showed that other absolute pH indicators have good specificity but low sensitivity. In such a case, a false prediction of SARA would rarely be made (low proportion of false positives), but many of the cows that actually have SARA would be missed (high proportion of false negatives). The relative

pH indicators that we calculated appear to have greater ROC AUC values ($P < 0.05$) compared with absolute parameters. According to the ROC AUC classification established by Gardner and Altman (1989), NpH range (AUC = 0.88) and NpH standard deviation (AUC = 0.90) were good (0.81 to 0.90) at diagnosing SARA syndrome in our experimental conditions, whereas time and AUC NpH < -0.3 (AUC = 0.91) were classified as excellent (0.91 to 1.0). Those indicators expressed in relative thresholds gave more true positives and fewer false positives and consequently are able to improve diagnosis of SARA in dairy cows.

Conclusion

During experimental SARA, we demonstrated that common absolute pH indicators do not allow detection of SARA because of their strong limitations (sensor drift, noise and animal variability). A new approach to signal processing of rumen pH kinetics was proposed in order to highlight relative changes in pH values instead of dealing with absolute pH values. Relative pH indicators overcoming drift, noise and inter-animal variability were then proposed and evaluated. We show that time or AUC of NpH < -0.3 were the most relevant pH indicators in detection of SARA. This demonstrates that rumen pH sensors provide high-resolution pH kinetics, which are of great interest in detecting SARA if rumen pH is analysed properly. This approach needs to be confirmed by further studies with other acidotic diets and more animals in order to determine precisely threshold of each relative pH indicator. Moreover, the individual initial rumen pH pattern should be taken into consideration to create SARA thresholds adapted to each animal. This kind of rumen pH analysis could be of great value in enhancing precision livestock farming.

Acknowledgements

The present research (PhD) of Clothilde Villot was financially supported by Valorex, Terrena and Lallemand. The authors thank the personnel of the INRA experimental unit (Herbipôle) for cow welfare, feeding and sampling. The authors particularly thank Lucette Genestoux, Clothilde Dos Santos and Aurélie Ameilbonne (Lallemand) for skilled technical assistance and Diego Morgavi for reviewing this paper thoroughly.

References

AlZahal O, Kebreab E, France J and McBride BW 2007. A mathematical approach to predicting biological values from ruminal pH measurements. *Journal of Dairy Science* 90, 3777–3785.

Association of Official Analytical Chemists 1997. Official methods of analysis, 16th edition. AOAC International., Gaithersburg, MD, USA.

Association of Official Analytical Chemists 2005. Official methods of analysis, 18th edition. AOAC International, Arlington, VA, USA.

Castro-Costa A, Salama AAK, Moll X, Aguiló J and Caja G 2015. Using wireless rumen sensors for evaluating the effects of diet and ambient temperature in nonlactating dairy goats. *Journal of Dairy Science* 98, 4646–4658.

Denman SE and McSweeney CS 2006. Development of a real-time PCR assay for monitoring anaerobic fungal and cellulolytic bacterial populations within the rumen. *Fems Microbiology Ecology* 58, 572–582.

Duffield T, Plaizier JC, Fairfield A, Bagg R, Vessie G, Dick P, Wilson J, Aramini J and McBride B 2004. Comparison of techniques for measurement of rumen pH in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 87, 59–66.

Edwards JE, Huws SA, Kim EJ and Kingston-Smith AH 2007. Characterization of the dynamics of initial bacterial colonization of nonconserved forage in the bovine rumen. *FEMS Microbiology Ecology* 62, 323–335.

Enemark JMD, Jorgensen R and Enemark PS 2002. Rumen acidosis with special emphasis on diagnostic aspects of subclinical rumen acidosis: a review. *Veterinarija ir Zootechnika* 20, 16–29.

Faisant N, Planchot V, Kozłowski F, Pacouret M-P, Colonna P and Champ M 1995. Resistant starch determination adapted to products containing high level of resistant starch. *Sciences des Aliments* 15, 83–89.

Gardner M and Altman D 1989. Calculating confidence intervals for proportions and their differences. *Statistics with confidence*. British Medical Journal Publishing Group, London. 28–33.

Gasteiner J, Fallast M, Rosenkranz S, Häusler J, Schneider K and Guggenberger T 2009. Measuring rumen pH and temperature by an indwelling and wireless data transmitting unit and application under different feeding conditions. In *Proceedings Fourth European Conference Precision Livestock Farming 09*, Wageningen, The Netherlands, pp. 127–133.

Greiner M, Pfeiffer D and Smith R 2000. Principles and practical application of the receiver-operating characteristic analysis for diagnostic tests. *Preventive Veterinary Medicine* 45, 23–41.

Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) 2010. Valeur alimentaire des fourrages et des matières premières: tables et prévisions. In *Alimentation des bovins, ovins et caprins. Besoins des animaux*. Quae. Institut National de la Recherche Agronomique, Paris, France.

Josse J and Husson F 2012. Handling missing values in exploratory multivariate data analysis methods. *Journal de la Société Française de Statistique* 153, 79–99.

Kaur R, Garcia S, Horadagoda A and Fulkerson W 2010. Evaluation of rumen probe for continuous monitoring of rumen pH, temperature and pressure. *Animal Production Science* 50, 98–104.

Kennelly JJ, Robinson B and Khorasani GR 1999. Influence of carbohydrate source and buffer on rumen fermentation characteristics, milk yield, and milk composition in early-lactation Holstein cows. *Journal of Dairy Science* 82, 2486–2496.

Kleen JL and Cannizzo C 2012. Incidence, prevalence and impact of SARA in dairy herds. *Animal Feed Science and Technology* 172, 4–8.

Kleen JL, Hooijer GA, Rehage J and Noordhuizen JPTM 2003. Subacute ruminal acidosis (SARA): a review. *Journal of Veterinary Medicine Series A* 50, 406–414.

Klevenhusen F, Pourazad P, Wetzels S, Kumar M, Khol-Parisini A and Zebeli Q 2014. Technical note: evaluation of a real-time wireless pH measurement system relative to intraruminal differences of digesta in dairy cattle. *Journal of Animal Science* 92, 5635–5639.

Kolver E and De Veth M 2002. Prediction of ruminal pH from pasture-based diets. *Journal of Dairy Science* 85, 1255–1266.

Krause KM, Garrett R and Oetzel GR 2006. Understanding and preventing subacute ruminal acidosis in dairy herds: a review. *Animal Feed Science and Technology* 126, 215–236.

Mohammed R, Stevenson D, Weimer P, Penner G and Beauchemin K 2012. Individual animal variability in ruminal bacterial communities and ruminal acidosis in primiparous Holstein cows during the periparturient period. *Journal of Dairy Science* 95, 6716–6730.

Nagaraja TG and Titgemeyer EC 2007. Ruminal acidosis in beef cattle: the current microbiological and nutritional outlook. *Journal of Dairy Science* 90 (suppl. 1), E17–E38.

Penner G, Beauchemin K and Mutsvangwa T 2007. Severity of ruminal acidosis in primiparous Holstein cows during the periparturient period. *Journal of Dairy Science* 90, 365–375.

Plaizier JC, Krause DO, Gozho GN and McBride BW 2008. Subacute ruminal acidosis in dairy cows: the physiological causes, incidence and consequences. *The Veterinary Journal* 176, 21–31.

Sato S, Ikeda A, Tsuchiya Y, Ikuta K, Murayama I, Kanehira M, Okada K and Mizuguchi H 2012. Diagnosis of subacute ruminal acidosis (SARA) by continuous reticular pH measurements in cows. *Veterinary Research Communication* 36, 201–205.

- Sauvant D, Meschy F and Mertens D 1999. Les composantes de l'acidose ruminale et les effets acidogènes des rations. *INRA Productions Animales* 12, 49–60.
- Schwartzkopf-Genswein K, Beauchemin K, Gibb D, Crews D Jr, Hickman D, Streeter M and McAllister T 2003. Effect of bunk management on feeding behavior, ruminal acidosis and performance of feedlot cattle: a review. *Journal of Animal Science* 81, 149–158.
- Shen J, Chai Z, Song L, Liu J and Wu Y 2012. Insertion depth of oral stomach tubes may affect the fermentation parameters of ruminal fluid collected in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 95, 5978–5984.
- Silberberg M, Chaucheyras-Durand F, Commun L, Mialon MM, Monteils V, Mosoni P, Morgavi DP and Martin C 2013. Repeated acidosis challenges and live yeast supplementation shape rumen microbiota and fermentations and modulate inflammatory status in sheep. *Animal* 7, 1910–1920.
- Stefańska B, Nowak W, Komisarek J, Taciak M, Barszcz M and Skomiał J 2016. Prevalence and consequence of subacute ruminal acidosis in Polish dairy herds. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 101, 694–702.
- Stevenson DM and Weimer PJ 2007. Dominance of *Prevotella* and low abundance of classical ruminal bacterial species in the bovine rumen revealed by relative quantification real-time PCR. *Applied Microbiology and Biotechnology* 75, 165–174.
- Van Soest P, Robertson J and Lewis B 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science* 74, 3583–3597.
- Yu Z and Morrison M 2004. Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples. *Biotechniques* 36, 808–813.
- Zebeli Q, Dijkstra J, Tafaj M, Steingass H, Ametaj B and Drochner W 2008. Modeling the adequacy of dietary fiber in dairy cows based on the responses of ruminal pH and milk fat production to composition of the diet. *Journal of Dairy Science* 91, 2046–2066.

2. Détermination des seuils de risque des indicateurs ruminiaux (NpH) pour diagnostiquer l'ARSA chez la vache laitière



ECPLF 2017
12 - 14 September 2017
Nantes - France

RELATIVE RUMEN PH THRESHOLDS TO PREDICT SUBACUTE RUMINAL ACIDOSIS (SARA) IN DAIRY COWS

C. Villot^{1,2,3,4}, C. Martin¹, B. Meunier¹, MM. Mialon¹, M. Silberberg¹

¹UMR1213 Herbivores, INRA, VetAgro Sup, Clermont université, université de Lyon, 63122 Saint-Genès-Champanelle, France

²Lallemand Animal Nutrition, F-31702 Blagnac, France

³Valorex, La Messayais, F-35210 Combourtille, France

⁴Terrena, La Noëlle, F-44150 Ancenis, France

Corresponding author: mathieu.silberberg@inra.fr

Current address: INRA, UMR1213 Herbivores, F-63122 Saint-Genès-Champanelle, France

Publié dans les actes de la conférence ECPLF en Septembre 2017

DETERMINATION DES SEUILS DE RISQUE DES INDICATEURS RUMINAUX (NpH) POUR DIAGNOSTIQUER L'ARSA CHEZ LA VACHE LAITIERE

Objectifs :

- Déterminer des seuils de risque de l'ARSA pour les indicateurs relatifs du pH ruminal
- Evaluer la capacité prédictive journalière des indicateurs NpH établis pour le diagnostic de l'ARSA

Matériel & Méthodes :

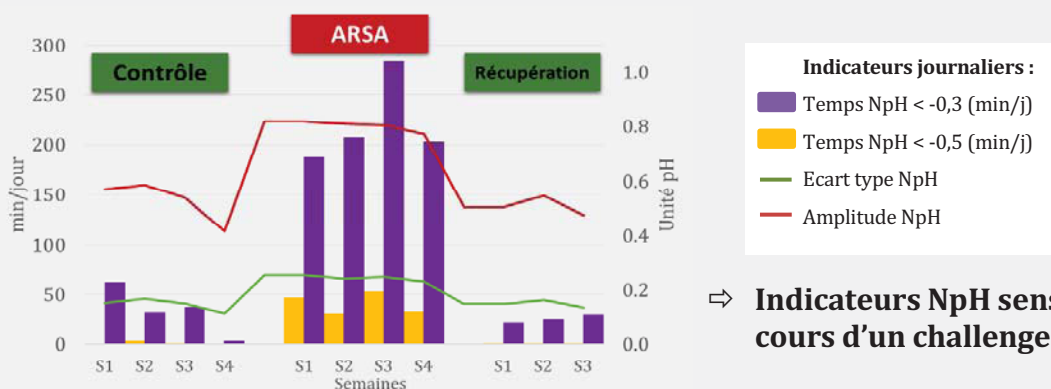
	Etude 1		Etude 2	
	Contrôle	ARSA	Contrôle	ARSA
Nb animaux	10	10	14	14
Nb jours de mesure/animal	28	28	24	14
Nb total données pour le calcul de chaque indicateur	Calcul seuils /semaine		Validation indicateurs /jour	
	40	40	208	145

1 : Détermination des seuils de risque pour l'ARSA avec des données moyennées par semaine

2 : Validation externe des indicateurs NpH avec des données journalières et comparaison des capacités prédictives des différents indicateurs pour le diagnostic de l'ARSA

Résultats :

Évolution des indicateurs journaliers du NpH ruminal pendant un challenge ARSA (étude 1)



⇒ **Indicateurs NpH sensibles au cours d'un challenge ARSA**

- Détermination des seuils de risque (test ROC) (étude 1) et évaluation de leurs capacités prédictives journalières de l'ARSA (étude 2)

	Etude 1		Etude 2	
	Seuil	ASC	Se (%)	Sp (%)
Amplitude journalière NpH	0,80	0,88	83	94
Ecart type journalier NpH	0,20	0,90	77	95
Temps passé NpH < - 0,3 (min/j)	50	0,90	72	76
Temps passé NpH < - 0,5 (min/j)	5	0,78	41	99

Conclusion :

- Seuils permettant de prédire l'ARSA à l'échelle individuelle et en conditions expérimentales :
 - Amplitude journalière du pH ruminal normalisé > **0,80** unité pH
 - Ecart type journalier > **0,20** unité pH
 - Temps passé sous NpH < - 0,3 > **50min/j**
- **Se** et **Sp** élevées pour les nouveaux indicateurs NpH évalués dans l'étude 2

ABSTRACT

In ruminants, subacute ruminal acidosis (SARA) is a digestive disorder usually induced by an overload of rapidly fermentable carbohydrates ingested by animals and characterized by abnormal and intermittent drops in rumen pH. Up to now no pH threshold is admitted to describe SARA in dairy cows due to the inaccuracy of measurement techniques and the high rumen pH variability between animals. In this context, two studies were carried out to propose relative pH indicators of SARA based on the normalized pH kinetics. Twenty four dairy cows were followed during 2 different longitudinal studies (experiment #1; n=10 and #2; n=14) inducing both a long-term SARA challenge with high starch diets (30% rumen digestible starch). Individual raw rumen pH kinetics were recorded continuously by reticulo-rumen sensors. Relative daily pH parameters were calculated on a filtered and normalized pH kinetics (NpH): drift was suppressed, pH signal was cleaned from noises and normalized on 0. Thresholds for SARA diagnostic of NpH parameters were described with a receiver operating characteristics (ROC) test using the daily individual dataset of experiment #1. The optimum thresholds were 0.80 and 0.20 pH units for daily NpH range and standard deviation respectively, 50 min when $NpH < -0.3$ and 5 min when $NpH < -0.5$ pH units. A daily NpH range superior to 0.80 had the best combination of sensitivity (94%) and specificity (83%) for the prediction of SARA challenge based on the independent dataset (#2). This study demonstrated the interest of relative rumen pH indicators to overcome various measurement issues and the high variability between animals in SARA conditions. The proposed method can be implemented in the precision livestock farming devices to detect digestive disorders in cows.

Keywords: reticulo-rumen pH sensor, subacute ruminal acidosis (SARA), dairy cows, relative rumen pH indicators

Table 1 : Ingredients and composition of experimental diets

Experiments	Low starch diet (LSD)		High starch diet (HSD)	
	#1	#2	#1	#2
Concentrate : forage ratio	32 : 68	25 : 75	54 : 46	46 : 54
Ingredients (% of DM)				
Hay	7.0	19.0	1.8	14.0
Wrapped hay	0	56.0	0	40.0
Corn silage	20.0	0	29.7	0
Grass silage	41.0	0	14.7	0
Wheat and barley mix	10.6	25	41.5	46
Concentrate for production	21.4	25.0	12.3	0
Chemical composition (% of DM)				
OM ¹	91.0	93.3	95.0	94.7
NDF ²	39.9	52.1	30.0	39.4
ADF ³	21.0	30.4	17.0	21.6
Starch	13.0	10.5	35.0	36.5
Rumen digestible starch	10.3	7.5	30.0	31.5
Crude protein	16.0	17.4	15.5	14.2

¹OM = Organic matter, ²NDF = Neutral detergent fiber, ³ADF = Acid detergent fiber

INTRODUCTION

With a dairy cows prevalence of 15% in European countries (Stefańska *et al.*, 2016), the main ruminal disorder is known to be subacute ruminal acidosis (SARA) which hitherto has been characterized by intermittent and moderate periods of depressed rumen pH (Enemark *et al.*, 2002). Rumen pH is the parameter most monitored when making SARA diagnosis. Historically, depending on the severity of SARA, daily average pH thresholds of 5.50 to 6.25 have been proposed (Sauvant *et al.*, 1999). However, pH value is significantly impacted by the measurement technique (Duffield *et al.*, 2004) and depends upon sampling location (Gasteiner *et al.*, 2009), and the frequency of pH measurement. The large variability of rumen conditions between animals also alters the robustness of absolute rumen pH indicators of SARA (Schwartzkopf-Genswein *et al.*, 2003). Consequently there is still no scientific consensus regarding pH thresholds for detection of SARA. The use of rumen sensors to monitor reticulo-rumen pH is growing fast. Such devices are considered to be relevant, non-invasive and affordable tools that can help prevent SARA on field (Kleen *et al.*, 2003, Castro-Costa *et al.*, 2015). In this context, two studies were carried out to propose relative pH indicators of SARA based on the filtered and normalized pH kinetics (NpH). Relative pH indicators for SARA detection were highlighted in a first study where 10 cows underwent a SARA challenge (#1) and specific thresholds were calculated for SARA diagnostic. In a second experiment those thresholds were assessed for validation on 14 other animals undergoing an experimentally induced acidosis (#2).

MATERIAL AND METHODS

Experimental design

All cows (113 ± 11 days in milk) from experiment #1 (n=10) and #2 (n=14) were submitted to the same design for SARA induction. All the cows received initially a low-starch diet (LSD) (Table 1) as control during 4 weeks. The amount of starch was then increased gradually every 2 days, to reach up to 35% and 36.5% in experiment #1 and #2 respectively to induce SARA. In order to maintain a long-term SARA challenge the high starch diet (HSD) was distributed during 4 weeks in #1 whereas it was distributed during 2 weeks in #2. Finally, cows resumed to their initial control diet (LSD) for 3 weeks without transition.

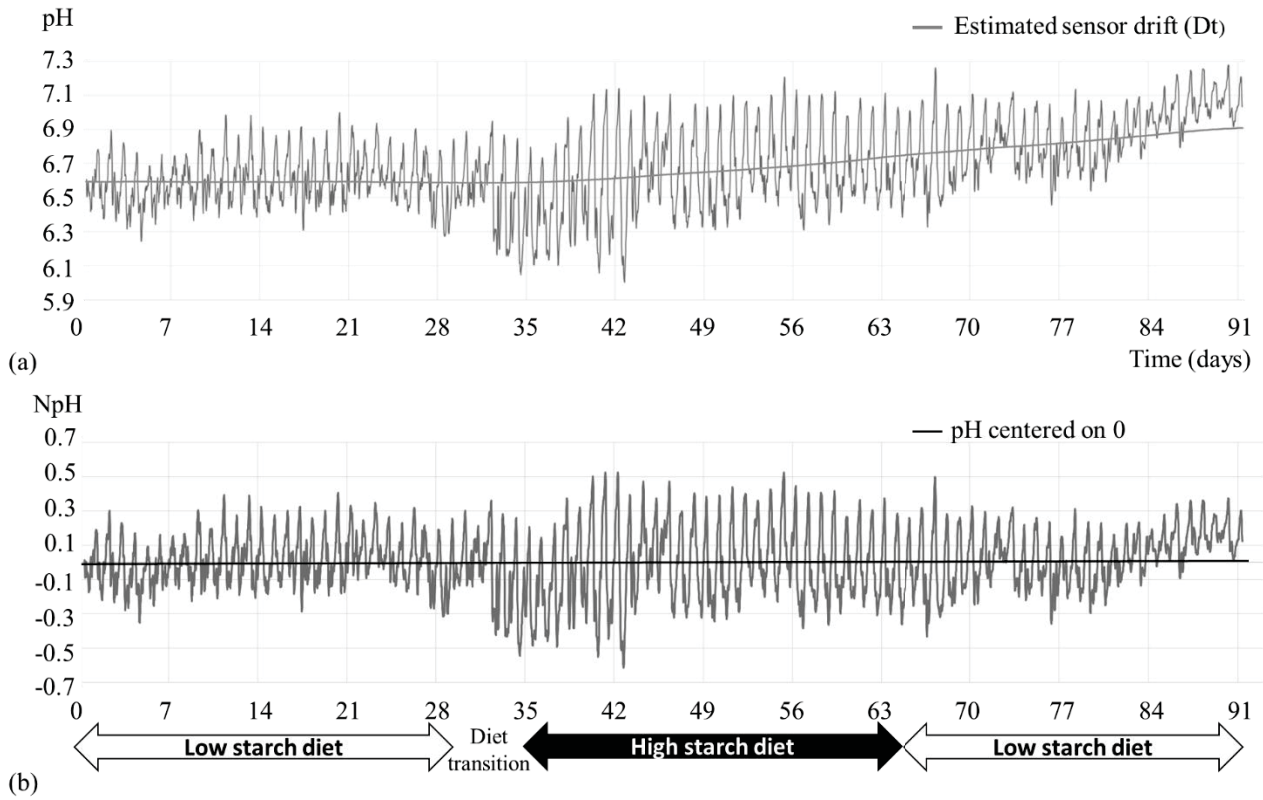


Figure 12 : Comparison between (a) raw pH kinetics (X_t) with (b) filtered and normalized NpH kinetics after signal processing.

During both experiments diets were distributed as follow: $\frac{3}{4}$ of the diet at 09:00 am and $\frac{1}{4}$ at 04:00 pm for experiment #1 and at 02:00 pm for #2 respectively. Both experiments were submitted to local ethical guidance and received ethical approval (CE#C2E2A-02 and APAFIS#366). All cows from both experiments were fitted with a reticulo-rumen Farm Bolus sensor monitoring continuously rumen pH (eCow, Exter, UK). The sensor was calibrated according to the manufacturer's recommendations before use. Each sensor was set up to record mean pH over 15 minutes (96 data points per day) with an accuracy of ± 0.1 . Data were downloaded every 15 days using eCow handset (smartphone + antenna) with a dedicated android application.

Experiment #1: determination of the relative pH indicators for SARA detection

Rumen pH processing and relative pH indicators calculations

All pH data from the 10 dairy cows of experiment #1 were summarized with Excel Software and a Visual Basic for Application program was developed to synchronize and process the raw reticulo-rumen pH kinetics. Each raw sequence of pH measurements is a time series (X_t) which may be modelled by adding a trend and cyclical components of different time constants: $X_t = D_t + C_t + N_t$; where D_t = offset and long-term drift due respectively to initial calibration (± 0.05 pH unit), measurement accuracy over time (± 0.1 pH unit/30 days) and cow initial pH value, C_t = daily variation impacted by meal delivery frequency and diet composition, and N_t = high-frequency noise due to a matrix effect (rumen) and environmental conditions (temperature, pressure, electrical artefacts) (Figure 12). A signal processing algorithm was developed in order to isolate the potentially more interesting components (t) from abnormal or random variation (D_t and N_t). To this end a decomposition of the signal was performed using different combinations of weighted moving averages (WMAs), which were (1) centred to avoid phase shifting, (2) weighted with a Gaussian function to give more importance to the neighbouring points and (3) windowed with a period of time adapted to the time constant of the component of interest. Thus, the noise (N_t) was removed with a WMA of 180 min producing smoothed kinetics and the offset and drift were modelled with a WMA of 8 weeks and subtracted from the smoothed kinetics to produce filtered-normalized kinetics. After signal processing, the calculation of relative daily indicators was possible using the filtered and normalized kinetics (NpH).

The calculated relative indicators were:

- NpH range = pHmax - pHmin
- NpH standard deviation
- Time NpH < -0.3 pH units (min/d): cumulative time when NpH was below the relative pH threshold of -0.3
- Time NpH < -0.5 pH units (min/d): cumulative time when NpH was below the relative pH threshold of -0.5.

Determination of relative rumen pH thresholds

From experiment #1, a total of 560 daily data was used from the raw kinetics rumen pH. Data from the individual 28 days of LSD were averaged by week (4 weeks) and classified as non-SARA conditions and data from the others 28 days where the cows were fed with HSD, were also averaged by week (4 weeks), and classified as SARA conditions. Relative pH thresholds of SARA indicators were determined using a receiver-operator characteristics (ROC) curve as calculated by the pROC test with the R version 3.2.3 software. ROC curves are often summarized by the area under the curve (AUC). The AUC can be interpreted as the probability that a diagnostic test or a classifier will rank a randomly chosen positive instance higher than a randomly chosen negative one. If all positive samples are ranked before negative ones, the AUC is 1.0. An AUC of 0.5 is equivalent to randomly classifying subjects as either positive or negative and is not better than tossing a coin.

Experiment #2: validation of the relative pH indicators for SARA detection

This dataset was dedicated to an external validation of the previously calculated relative pH indicators. Then collected data of experiment #2 were processed as for #1 and relative indicators were also calculated based on a total of 658 daily data retrieved from 14 cows. For the external validation, all daily values were used. Consecutively, a validation matrix was built using the following items: (i) True positives (correctly predicted SARA with daily indicators values upper than thresholds during SARA challenge), (ii) false positives (incorrectly predicted SARA with daily indicators values upper than thresholds during control periods), (iii) true negatives (correctly no-SARA predicted with daily indicators values lower than thresholds during control periods), and (iv) false negatives (incorrectly no-SARA predicted with daily indicators values lower than thresholds during SARA challenge). In addition, the sensitivity, specificity, positive predictive value, and negative predictive value were calculated to evaluate indicators of robustness.

RESULTS AND DISCUSSION

In a harsh environment like reticulum where rumen fluid could slowly diffuse into the sensor and poison the reference electrode, drift (Dt) and noise (Nt) are frequently observed (Kaur *et al.*, 2010). In our experiment #1, both Dt and Nt were detected from all the 10 sensors. This long-term drift started at day 30 and lasted until the end of the study. In addition, we observed a large initial between-animal variability in daily average rumen pH (pH ranged from 6.1 to 6.7), with a standard deviation of 0.25 pH units in the first LSD period. Such observations have already been reported (Gasteiner *et al.*, 2009). In addition, absolute rumen pH changes in SARA syndrome also appear to vary greatly, as reported in several studies (Schwartzkopf-Genswein *et al.*, 2003, Penner *et al.*, 2007). Nevertheless, SARA has historically been characterized by rumen pH depression and the measurement of this indicator is still considered as the “gold” standard in diagnosing this nutritional disease (AlZahal *et al.*, 2007). Single-point measurements of rumen pH were most commonly used until the rumen sensor was commercialized, and it has been clearly demonstrated that rumen pH kinetics carry more relevant information on rumen conditions because of large daily pH variability (Krause and Oetzel, 2006). Therefore, monitoring rumen pH in real time is by far the most reliable technique to evaluate the risk of SARA (Penner *et al.*, 2007). Since reticulo-rumen sensors provide high-resolution pH kinetics that needs to be analysed in a standardized manner to obtain accurate and comparable SARA thresholds. We then made the choice to apply a mathematical correction of the raw pH kinetics taking into account pH drift and noise associated with inter-animal variability in order to establish more consensual SARA NpH indicators. Then, in this article we sort more information from rumen pH kinetics than the commonly used absolute indicators (mean pH, min and max pH, time spent under pH 6.0 for instance) and we focus on how relative pH indicators can help to improve the diagnosis of SARA in dairy cows.

Determination of relative rumen pH thresholds for SARA detection

In experiment #1, when cows were fed HSD, the daily mean values of NpH range and standard deviation were respectively 0.78 ± 0.18 and 0.26 ± 0.06 . Whereas during the first control period (LSD) the daily NpH range was 0.46 ± 0.14 and standard deviation 0.14 ± 0.02 . Time NpH < -0.3 was significantly greater in HSD than in LSD (218 ± 114 and 23 ± 44 min/day respectively).

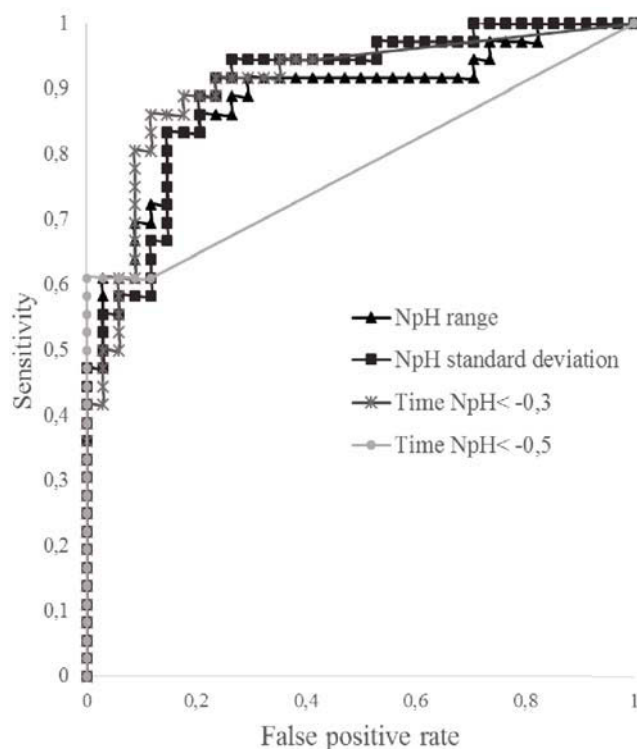


Figure 13 : Receiver-operator characteristics (ROC) curves of NpH range, NpH standard deviation, time NpH < -0.3 and time NpH < -0.5 indicators predicting SARA or non-SARA situation in experiment #1 (n=10)

The curves show the sensitivity (y-axis) and false positive rate at different thresholds values (x-axis) of NpH indicators for SARA detection.

Table 2 : Results of rumen NpH thresholds validation for SARA detection

pH indicators	Time NpH	Time NpH	NpH range	NpH standard deviation
	< -0.3	< -0.5		
Selected thresholds	50 min/d	5 min/d	0.80 pH unit	0.20 pH unit
True negative (TN)	159	206	196	198
True positive (TP)	105	60	121	112
False negative (FN)	40	85	24	33
False positive (FP)	49	2	12	10
Sensitivity (%)	72	41	83	77
Specificity (%)	76	99	94	95
Positive predictive value (%)	68	97	91	92
Negative predictive value (%)	80	71	89	86

Based on 353 (208 during no-SARA and 145 during SARA conditions) daily data recorded on 24 cows.

NpH = normalized pH on 0, sensitivity = $TP / (TP + FN) \times 100$, specificity = $TN / (TN + FP) \times 100$, positive predictive value = $TP / (TP + FP) \times 100$, negative predictive value = $TN / (TN + FN) \times 100$

The ROC test highlighted that the relative values of 0.80 for daily NpH range (AUC = 0.88); 0.20 for standard deviation (AUC = 0.90), 50 min/day for time NpH < -0.3 (AUC = 0.90) and 5 min/day for time NpH < -0.5 (AUC = 0.78) were the optimum thresholds for SARA detection (Figure 13). According to the ROC AUC classification established by Gardner and Altman (1989), NpH range, NpH standard deviation and time NpH < -0.3 were qualified as excellent (0.81 to 0.90) for diagnose SARA syndrome in our experiment whereas time NpH < -0.5 was qualified as good. The increase in range and standard deviation of ruminal daily NpH when a high fermentable carbohydrate diet is distributed indicates the difficulty for the animals to buffer their ruminal contents (Gasteiner *et al.*, 2009). Moreover, the ruminal microbiota is more sensitive to strong daily pH changes rather than a low but stable pH (Moya *et al.*, 2014). This instability of ecosystem can then alter the digestive health of animals, leading to enhance other subsequent pathologies and decreasing production (Martin *et al.*, 2006). Then to our point of view, NpH range and standard deviation, and time NpH < -0.3 may be good indicators of the rumen instability during chronic SARA.

Assessment of rumen relative pH SARA thresholds

Experiment #2 produced a dataset that we dedicated to the external validation of the relative indicators we calculated previously and their respective thresholds (Table 2). A total of 208 data during LSD (no-SARA) and 145 data during HSD (SARA) were used. According to the values of relative indicators, a good classification was observed when cows fed with HSD had individual daily indicators superior or equal to the established thresholds and when cows fed with LSD had inferior values of the thresholds. Previously calculated thresholds of 5 and 50min/d for time NpH < -0.5 and -0.3 had a sensitivity of 41 and 72% respectively in the prediction of SARA challenge in experiment #2. It appears that those indicators do not insure a good SARA prediction since more than 50 % (time NpH < -0.5) and 30% (time NpH < -0.3) of daily values measuring during HSD were under respectively 5 and 50 min/day. The predictive capacity of time NpH < -0.5 indicator is consistent with the fact that diagnostic result (ROC test in experiment #1) was only classified as good. The decrease of rumen pH during SARA is generally intermittent and can explain the low sensitivity of those indicators (Enemark *et al.*, 2002). Consequently, those indicators may be not appropriate for SARA detection when calculated and evaluated daily. Then the evaluation should be done at the week scale to conclude whether or not those indicators could decipher a SARA condition. NpH standard deviation threshold of 0.20 achieved a specificity of 95% and a sensitivity of 77%.

This indicator gives a good confidence for the classification of cows with no-SARA (daily values below 0.20 during LSD) whereas some values were lower than threshold during HSD indicating that several days in SARA conditions (20%) were missed. The threshold of 0.80 for NpH range achieved a specificity of 94% and sensitivity of 83%, this indicator had the capacity to well predict SARA and no-SARA conditions with only a percentage of false negative of 10%. The benefits of using AUC of ROC test to classify SARA indicators was well explained by Colman *et al.* (2015). Nevertheless no study highlighted the diagnostic capacity of absolute rumen pH thresholds used to characterize SARA. Therefore, we cannot discuss the diagnostic capacities of relative rumen NpH indicators with existing literature.

CONCLUSION

This validation study showed that new relative pH indicators can improve SARA diagnostic since some of them present both high sensitivity and specificity. A threshold of 0.80 for daily NpH range seems to be the most performant since it is able to distinguish a randomly chosen positive instance from a randomly chosen negative instance (ROC test results). The accuracy of time spent $NpH < -0.3$ and $NpH < -0.5$ evaluated daily is not good enough to predict SARA but those indicators need to be evaluated at the week scale since SARA usually occurs as repeated bouts over a long period of time.

The large daily variability of rumen pH and the instability of rumen conditions during SARA imply to monitor this parameter continuously to obtain high resolution kinetics. Then, a good interpretation of pH kinetic requires specific signal processing to highlight interesting indicators. In a near future, the proposed method could be implemented in some precision livestock farming devices (rumen boluses) to improve the detection of digestive disorders in cows at herd level.

REFERENCES

- AlZahal O, Kebreab E, France J and McBride BW 2007. A mathematical approach to predicting biological values from ruminal pH measurements. *Journal of Dairy Science* 90, 3777-3785.
- Castro-Costa A, Salama AAK, Moll X, Aguiló J and Caja G 2015. Using wireless rumen sensors for evaluating the effects of diet and ambient temperature in nonlactating dairy goats. *Journal of Dairy Science* 98, 4646-4658.
- Colman E, Waegeman W, De Baets B and Fievez V 2015. Prediction of subacute ruminal acidosis based on milk fatty acids: A comparison of linear discriminant and support vector machine approaches for model development. *Computers and Electronics in Agriculture* 111, 179-185.
- Duffield T, Plaizier JC, Fairfield A, Bagg R, Vessie G, Dick P, Wilson J, Aramini J and McBride B 2004. Comparison of techniques for measurement of rumen pH in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 87, 59-66.
- Enemark JMD, Jorgensen R and Enemark PS 2002. Rumen acidosis with special emphasis on diagnostic aspects of subclinical rumen acidosis: a review. *Veterinarija ir zootechnika* 20, 16-29.
- Gardner M and Altman D 1989. Calculating confidence intervals for proportions and their differences. *Statistics with confidence*. London: British Medical Journal Publishing Group, 28-33.
- Gasteiner J, Fallast M, Rosenkranz S, Häusler J, Schneider K and Guggenberger T 2009. Measuring rumen pH and temperature by an indwelling and wireless data transmitting unit and application under different feeding conditions. In *Proceedings Fourth European Conference Precision Livestock Farming 09*, Wageningen, the Netherlands, pp. 127-133.
- Kaur R, Garcia S, Horadagoda A and Fulkerson W 2010. Evaluation of rumen probe for continuous monitoring of rumen pH, temperature and pressure. *Animal Production Science* 50, 98-104.
- Kleen JL, Hooijer GA, Rehage J and Noordhuizen JP 2003. Subacute ruminal acidosis (SARA): a review. *Journal of Veterinary Medicine A Physiology Pathology Clinical Medicine* 50, 406-414.
- Krause KM and Oetzel GR 2006. Understanding and preventing subacute ruminal acidosis in dairy herds: A review. *Animal Feed Science and Technology* 126, 215-236.
- Martin C, Brossard L and Doreau M 2006. Mécanismes d'apparition de l'acidose latente et conséquences physiopathologiques et zootechniques. *INRA Productions Animales* 19, 93-108.
- Moya D, Holtshausen L, Marti S, Gibb D, McAllister T, Beauchemin K and Schwartzkopf-Genswein K 2014. Feeding behavior and ruminal pH of corn silage, barley grain, and corn dried distillers' grain offered in a total mixed ration or in a free-choice diet to beef cattle. *Journal of Animal Science* 92, 3526-3536.
- Penner G, Beauchemin K and Mutsvangwa T 2007. Severity of ruminal acidosis in primiparous Holstein cows during the periparturient period. *Journal of Dairy Science* 90, 365-375.
- Sauvant D, Meschy F and Mertens D 1999. Les composantes de l'acidose ruminale et les effets acidogènes des rations. *INRA Productions Animales* 12, 49-60.
- Schwartzkopf-Genswein K, Beauchemin K, Gibb D, Crews Jr D, Hickman D, Streeter M and McAllister T 2003. Effect of bunk management on feeding behavior, ruminal acidosis and performance of feedlot cattle: A review. *Journal of Animal Science* 81, 149-158.
- Stefańska B, Nowak W, Komisarek J, Taciak M, Barszcz M and Skomial J 2016. Prevalence and consequence of subacute ruminal acidosis in Polish dairy herds. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 101, 694-702.

CHAPITRE IV : DÉVELOPPEMENT DE MODÈLES DE PRÉDICTION DE L'ARSA CHEZ LA VACHE LAITIÈRE À PARTIR DE COMBINAISONS DE PARAMÈTRES PÉRIPHÉRIQUES AU RUMEN

1. Détermination de modèles prédictifs de l'ARSA chez la vache laitière à partir de combinaisons de paramètres périphériques au rumen

COMBINATION OF RUMEN PERIPHERAL PARAMETERS TO DETECT SUBACUTE RUMINAL ACIDOSIS IN DAIRY COWS

C. Villot,^{*,†,‡,§} C. Martin,^{*} J. Bodin,[#] D. Durand,^{*} B. Graulet,^{*} A. Ferlay,^{*} M.M. Richard,^{*} E. Trevisi,^{||} M. Silberberg^{*1}

^{*}Université Clermont Auvergne, INRA, VetAgro Sup, UMR Herbivores, F-63122 Saint-Genès-Champanelle, France

[†]Lallemand SAS, F-31702 Blagnac, France

[‡]Valorex, La Messayais, F-35210 Combourtille, France

[§]Terrena, La Noëlle, F-44150 Ancenis, France

[#]BR3 Consultants, F-69007 Lyon, France

^{||}Istituto di Zootecnica, Facoltà di Agraria, Facoltà di Agraria, Università Cattolica del Sacro Cuore, 29122 Piacenza, Italy.

¹Corresponding author: mathieu.silberberg@inra.fr

Current address: INRA, UMR1213 Herbivores, F-63122 Saint-Genès-Champanelle, France

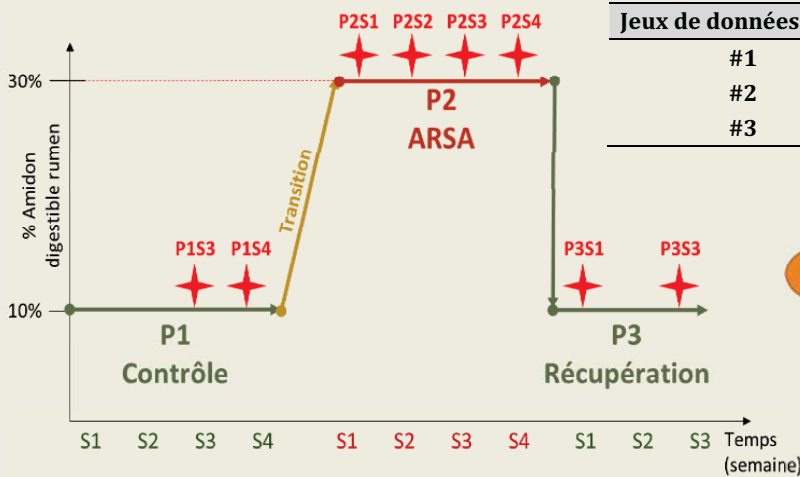
Soumis à Journal of Dairy Science, Octobre 2017

DES COMBINAISONS DE PARAMETRES PERIPHERIQUES AU RUMEN POUR DETECTER L'ARSA CHEZ LA VACHE LAITIERE

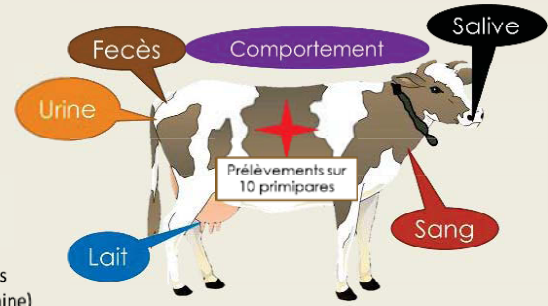
Objectifs :

- Screening simultané de paramètres non-invasifs potentiellement impactés par l'ARSA
- Développer des modèles combinant des paramètres pour renforcer le diagnostic de l'ARSA

Matériel & Méthodes :



Jeux de données (JDD)	P1	P2	P3
	Contrôle	ARSA	Récupération
#1	S3, 4	S1, 2, 3, 4	-
#2	S3, 4	S1, 2, 3, 4	S3, 4
#3	S3, 4	S1, 2, 3, 4	S4



- Screening de 136 paramètres par une analyse multivariée et une ANOVA à mesures répétées
- Des modèles de prédiction de l'ARSA combinant plusieurs paramètres ont été établis suivant une analyse linéaire généralisée à effet mixte
- La capacité prédictive de chaque modèle pour l'ARSA a été évaluée avec des matrices de confusions selon différents jeux de données #1, #2, #3

Résultats :

- 18 paramètres périphériques au rumen ont été identifiés comme les plus discriminants des situations contrôle et ARSA
- 20 modèles combinant 2 ou 3 paramètres ont été identifiés comme indicateurs de l'ARSA

Matrices et paramètres constituant les modèles							Capacités prédictives			
							JDD	#1	#2	#3
Modèle	Matrice	Paramètre	Matrice	Paramètre	Matrice	Paramètre	Se	Sp	Sp	Sp
1	Comportement	MSI	Sang	HCO ₃ ⁻	Lait	Urée	100	100	87,1	100
2	Lait	Urée	Salive	pH			97,7	95,2	79,1	84,4
3	Sang	Cholestérol	Lait	AGPI w6			95,5	90,9	70,5	90,9
4	Comportement	MSI	Lait	AGPI w6			95,5	90,9	70,5	87,9
5	Sang	HCO ₃ ⁻	Lait	Urée			93,9	100	87,1	90,0
6	Sang	HCO ₃ ⁻	Lait	TB/TP			93,9	90,0	75,0	81,0

- Spécificité avec JDD #3 > JDD #2 : temps de latence après challenge ARSA
- **13 modèles ont des sensibilités > 90%**

Conclusion :

- Les modèles établis pour diagnostiquer l'ARSA sont composés de **2 ou 3 paramètres**
- Le modèle intégrant les **concentrations en urée dans le lait, HCO₃⁻ dans le sang et la MSI** permettent de prédire précisément les animaux en situation d'ARSA

INTERPRETIVE SUMMARY**Combination of rumen peripheral parameters to detect subacute ruminal acidosis in dairy cows.** Villot et al.

Subacute ruminal acidosis (SARA) is a widespread digestive disorder of dairy cows that is difficult to characterize in on-farm situations. The decrease in rumen pH is responsible for subsequent digestive and metabolic disorders, but no specific clinical sign is established to diagnose SARA. This study proposes combinations of non-ruminal parameters in several models able to detect animals undergoing SARA in experimental conditions. Hence, we built the proof of concept that simultaneous analyses of rumen peripheral parameters could be used for on-farm detection of SARA.

ABSTRACT

Subacute ruminal acidosis (SARA) is traditionally characterized by transient rumen pH depression, accurate monitoring of which requires costly or invasive methods. No specific clinical signs are well established in identifying SARA, so its detection remains difficult on-farm. The aim of this study was to assess if a multi-parametric modelling approach combining rumen peripheral parameters was able to detect SARA in experimental conditions. A longitudinal study was conducted in 11 primiparous dairy cows fed with 2 different diets during 3 successive periods: a 4-wk control period (P1) with a low-starch diet (13% starch), a 4-wk SARA period (P2) with a high-starch diet (35% starch), and a 3-wk recovery period (P3) again with the low starch diet. Animal behaviour was monitored throughout the experiment and faeces, urine, saliva, milk and blood were sampled simultaneously in each animal at least once a week for analysis. Based on the negative impact on rumen parameters, all the cows experienced SARA during P2. A total of 136 rumen peripheral parameters (milk fatty acids, biomarkers of metabolism, inflammation...) was screened by different statistical approaches: partial least squares discriminant analysis, multivariate analysis and mixed effect models. Finally, 18 parameters were selected as the most representative of SARA. A generalized linear mixed model analysis was applied to highlight parsimonious combinations of parameters able to identify animals under our experimental SARA challenge. Twenty models were established and the combination of milk urea nitrogen, blood bicarbonate, and feed intake was the model with both highest specificity and sensitivity for SARA detection in our experimental conditions. Other parameters like the number of drinking acts, fat:protein in milk, saliva and faecal pH were the most frequently used in the proposed models. Finally, the established models highlight the necessity for animals to have more than 1 week of recovery diet to return closer to their initial control state after a SARA-induced challenge. The present pilot study demonstrates the interest of a multi-parametric approach to improve on-farm detection of SARA. However, the robustness of the proposed models needs to be experimented using a greater number of animals as well as different SARA inducing diets to appraise their abilities in SARA detection before being applied in on-farm conditions.

Key Words: multi-parametric model, rumen peripheral parameter, subacute ruminal acidosis detection, dairy cow

INTRODUCTION

Subacute ruminal acidosis (SARA) is a well-known nutritional disease widespread in the dairy cow industry that results in large economic losses. SARA often originates from a diet composition that induces a drop in rumen pH (Plaizier et al., 2008). Nevertheless, a single rumen pH measurement appears insufficient to diagnose SARA on-farm (Trevisi et al., 2014) and the lack of scientific consensus of its risk thresholds is leading to an unclear definition of SARA. We recently demonstrated that normalized and filtered rumen pH indicators obtained with high-resolution kinetics measured with reticulo-rumen pH sensors are highly accurate in characterizing SARA (Villot et al., 2017b). However, this technique cannot be widely deployed on farms because the high cost of the sensors and their short lifetime mean that it is not economically viable. SARA can lead to major negative effects on production and health in dairy cows, such as loss of milk yield, milk fat depression, laminitis and liver abscesses (Martin et al., 2006). Therefore, a multiplicity of nonspecific and late clinical signs can emerge, such as altered locomotion (Garrett et al., 1997), erratic feed consumption (Li et al., 2011), and alterations in animal behavior (Soriani et al., 2012). Variations in indicators of stress and inflammation (Gozho et al., 2007, Trevisi et al., 2014) have been observed in different biological matrices when SARA was detected (Mohan et al., 2015), such as blood, feces (Plaizier et al., 2017), urine (Vagnoni and Oetzel, 1998), and recently saliva (Tapio et al., 2016). Milk fatty acids have already been related to changes in rumen pH as well as in the microbial population, therefore they have the potential to be biomarkers of SARA in dairy cows (Colman et al., 2010, Fievez et al., 2012). Nevertheless, no study has examined the potential interest to combine mathematically several parameters to detect SARA more accurately than looking at individual parameters. In this pilot study, our aim was to propose an original approach to better detect SARA by developing multi-parametric models based on rumen peripheral parameters. We analyzed parameters obtained from a previous study (Villot et al., 2017b) using animals experiencing SARA for 4 weeks. The first step was to screen for a large number of parameters known or suspected to be modified by SARA. Then, the most relevant parameters were classified according to multivariate analyses before being used to highlight potential combinations able to discriminate animals under SARA or control situations when induced in experimental conditions. Finally, the abilities for SARA detection were compared among the different established models.

MATERIALS AND METHODS

The trial was conducted at the dairy cow research facilities of the French National Institute for Agricultural Research in France (INRA, Herbipôle, UE 1414, Theix) and was approved by a French ethics committee (approval #8803- 2017020115479420).

Animals, Diets and Experimental Procedures

Eleven primiparous Holstein dairy cows, including 6 rumen-fistulated animals, were in individual stalls on concrete floors with rubber mats and had *ad libitum* access to water. At the start of the experiment, dairy cows had on average a body weight of 658 ± 37 kg (mean \pm SD), 135 ± 7 days in milk, and a milk yield of 27.5 ± 2.3 kg/day. Two different total mixed diets (**TMD**) were distributed over 12 wk of the longitudinal experiment as described precisely by Villot et al. (2017b). Briefly, cows received a low-starch diet (**LSD**) as control containing 13% starch (on a DM basis) for a 4-wk period (**P1**). The amount of starch was then increased gradually every 2 d, from 13% to 35% during a 6-d transition period to induce SARA. A high-starch diet (**HSD**) containing 35% starch was distributed for a 4-wk period in order to maintain a long-term SARA challenge (**P2**). Finally, cows received the initial diet (LSD), without transition for a 3-wk recovery period (**P3**). All diets were formulated to cover at least 105% of energy ($NE_L = 1.59$ Mcal/kg DM for LSD and 1.73 Mcal/kg DM for HSD) and protein (Metabolizable Protein = 95 g of Protein Digestible in the Intestine (PDI)/kg DM for LSD and 101 gPDI/kg DM for HSD) requirements for lactating dairy cows based on a milk production of 27 kg/d (INRA, 2010). Portions of 60% and 40% of the daily amount of the TMD were offered twice daily at 09:00 h and 16:30 h, respectively. The desired quantity of TMD was obtained by daily adjustment of the amounts offered, depending on the refusals of the previous day. Feed intake was measured and recorded twice daily throughout the experiment by individually weighing the feed offered and subtracting the refusal weight of the TMD. Throughout the experiment, cows were milked twice daily at 07:00 h and 16:00 h.

Sampling and Analyses

Eight weeks of measurements were spread throughout the experiment on wk 3 and 4 in P1, wk 6, 7, 8 and 9 in P2 and wk 10 and 12 in P3. A large number of parameters were screened

in different matrices during this experiment (Supplemental Table S 1), but only the detailed analysis of the final parameters selected is described in this section.

Milk. Samples were collected over d 2 and d 3 (4 consecutive milkings) of each measurement week. Individual samples (10 mL) of each milk were stored at 4°C with potassium dichromate (Merck Chimie SAS, Fontenay-sous-Bois, France) before analysis of urea, fat and protein content by mid-infrared analysis (AOAC International, 1997) using a 3-channel spectrophotometer [MilkoScan 4000 (Foss Electric A/S, Hillerod, Denmark); Laiterie Interprofessionnelle Auvergne Limousin, Aurillac, France]. A second sample was freeze-dried and then composited per day based on AM and PM milk yields before fatty acid (FA) analysis as described in Ferlay et al. (2010). Briefly, the FAs were transmethylated to FA methyl esters (FAME) and then FAME peaks were routinely identified by a comparison of the retention times with authentic FAME standards (GLC 463, Nu-Chek Prep Inc., Elysian, MN; reference mixture 47 885, Supelco Inc., Bellefonte PA) and a mixture of C18:1, C18:2, and CLA isomers (Loor et al., 2005a). Isomers of CLA were identified using authentic CLA methyl ester standards (O5632; Sigma-Aldrich Chimie S.a.r.l.) and the elution order of the isomers reported in the literature (Shingfield et al., 2008). A reference standard butter (CRM 164; Commission of the European Communities, Community Bureau of Reference, Brussels, Belgium) was used to estimate the correction factors for the short-chain FAs (4:0 to 10:0).

Blood. Samples were individually collected before the morning feed distribution on d 2 of each wk of measurement. Blood was collected from the jugular vein into a lithium heparinized 10-mL tube (Elvetec Services, Meyzieu, France). Each capped tube was placed on ice and analysis of bicarbonate concentration and pH was performed within 30 min of collection with a blood gas analyzer (ABL5, Radiometer, Copenhagen, Denmark). Another 10-mL blood sample was collected at the same time using EDTA-collecting tubes (Elvetec Services, Meyzieu, France) and plasma was separated immediately after sampling by centrifugation at $3,500 \times g$ for 15 min at 4°C. Plasma samples were frozen at -20°C until urea, cholesterol, β -hydroxybutyrate (BHB), and glucose determinations on an Arena 20XT (Thermo Scientific, Vaanta, Finland) automated analyzer. Spectrophotometric enzymatic kits were specific: 981820 kit for urea, 981379 kit for glucose, 984325 kit for BHB, from Thermo Scientific. Cholesterol was analyzed at 37°C by means of a clinical auto-analyzer (ILAB 650, Wefen, Instrumentation Laboratory, Lexington, MA), using IL Test kit (0018255740).

Feces. Sampling (1 500 mL) was synchronized with blood tests and was performed via grab sampling from the rectum. Fecal pH was measured immediately after the collection with a digital pH-meter (VWR pH100) with a precision of 0.1 unit, calibrated with standard solutions (pH = 4, 7, and 10). Fecal sieving was performed on a 425 mL fecal sample to establish the total and relative proportions of different particle sizes.

First, fecal density was calculated by weighing each sample. Then, the particle size distribution of feces was determined by commercial wet sieving (Lallemand SAS, France) using sieve apertures of 5 and 2 mm. Fecal samples were washed for 5 min using the same water nozzle and pressure. After sieving, fecal residuals from each sieve were back-weighed and the proportions of different sized particles were calculated based on the total material retained.

Urine. Urine was collected during spontaneous urination before the morning feed distribution on d 2 of each week of measurement. A sample of urine was collected in a 300 mL container in which pH was immediately recorded (pH parameter as described previously).

Saliva. Buccal samples (effectively saliva mixed with feed particles) were collected before the morning feed distribution on d 2 of each week of measurement. Saliva samples were obtained by allowing cows to chew on 2 sterile gauze pads for 1 min. The pads were then centrifuged (2 min x 2500 g, at 21°C) to extract at least 2 mL of saliva the pH of which was immediately recorded, and a sample was stored at -20°C until urea analysis (Bertoni et al., 2008). Briefly, urea concentration was determined at 37°C in a clinical auto-analyzer (ILAB 650, Werfen, Instrumentation Laboratory, Lexington, MA, USA) using a commercial kit (Instrumentation Laboratory, ILTest kit 0018255440).

Behavior. Rumination time (**RTime**) was measured continuously using the HR-Tag (SCR Engineers Ltd., Netanya, Israel) previously validated on dairy cattle (Schirmann et al., 2009). This system is held on a nylon collar positioned on the left side of the cow's neck. The logger contained a microphone and microprocessor that recorded the distinctive sounds of rumination in 2-h blocks. Daily RTime was calculated individually for the 11 cows by adding the 2-h blocks values over 24 h. The time budget of all dairy cows was estimated from 24-h video recordings. The behavior of each cow was scanned every 15 min to describe the pattern of daily activities during d 7 of each week of measurement. Times spent in behavior categories (eating, immobile standing, and lying) were isolated and calculated as previously described by Mialon et al. (2008). Drinking acts were calculated daily based

on a drop in rumen temperature of at least -0.2°C (Gasteiner et al., 2015) in a local minimum within a 30-min interval. Rumen temperature was measured by a commercial reticular sensor (eCow, Exeter, UK). One sensor per cow was placed in the reticulum through the esophagus. Each sensor was set up to record temperature over 15 min (96 data points/day) with an accuracy of ± 0.1 . Data were downloaded every 15 days using the eCow handset (smartphone + antenna) with the eCow Android application.

Statistical Analysis

A total of 136 parameters was obtained from 5 different matrices (feces, blood, milk, urine, saliva) and behavior, then were screened throughout the experiment to establish the models. Milk data were averaged per day based on AM and PM milk yields. Repeated data over a day or several days were averaged over their respective week of measurement. All data were analyzed using R 3.2.3 software, 2016. When necessary, data were log-transformed before analysis. Four data analyses were performed to highlight confident combinations of parameters able to discriminate SARA from control period (*Table 3*):

1) The parameters significantly impacted by SARA during the experiment were determined. A linear mixed model highlighted parameters that changed between week measurements. The model was implemented with the lme4 and lmerTest packages (lmer function) as follows: $Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + \varepsilon_{ijk}$, where Y_{ijk} = dependent parameters ($k= 136$), μ = general mean, A_i = fixed effect of the Week considered as the within-subject factor (mean of wk 3 and 4 in P1, wk 6, 7, 8 and 9 in P2, and wk 10 and 12 in P3), B_j = random animal effect ($j \in [1, n]$) and ε_{ijk} = residual error term (DDFM = Kenward-Roger) taking into account the repeated measures. When a parameter had missing values, the degrees of freedom were calculated by the Kenward-Roger's approximation. The results of the linear mixed models and the least square means with the standard error (**SE**) of the models are reported in Supplemental Table S1. Since no statistical difference was observed between wk 3 and wk 4 of control P1, the average value from these 2 wk of P1 was calculated as the control value for cows fed LSD for each parameter. The Dunnett post-hoc test comparing control vs each other measurement wk was then applied in order to observe changes in each parameter during the experiment. A first selection was performed by keeping parameters for which the P-value of the mixed model was lower than 0.1 between control and each other individual wk.

Table 3 : Four steps in statistical analyses of data to elaborate models for SARA detection

Steps	Statistical analysis	Dataset used	Parameters analyzed	Objective
1	a) Linear mixed model	Mean of P1, wk 6,7,8,9 -P2,	50 in blood 46 in milk	a) Identification of parameters significantly modified during the experiment
	b) Dunnett's post-hoc test	wk 10,12 -P3 (w=77)	23 in saliva 9 for behavior 7 in feces 1 in urine	b) Comparison between means of 3, 4-wk -P1 vs wk 6,7,8, 9 -P2, wk 10, 12 -P3
2	Multivariate analysis: PCA and PLS-DA	Mean of P1 and mean of P2 (w=22)	25 in blood 35 in milk 13 in saliva 5 for behavior 6 in feces 1 in urine	Selection of best discriminating parameters (control (P1) vs SARA (P2)) with the lowest multicollinearity
		Mean of P1 and mean of P2 (w=22)	6 in milk 4 in blood 3 for behavior 2 in saliva 2 in feces 1 in urine	Looking for the best predictive binary models of SARA with 2 or 3 parameters
3	Model development : Generalized linear mixed model	Mean of P1 and mean of P2 (w=22)	6 in milk 4 in blood 3 for behavior 2 in saliva 2 in feces 1 in urine	Looking for the best predictive binary models of SARA with 2 or 3 parameters
		Mean of P1 and mean of P2 (w=22)	6 in milk 4 in blood 3 for behavior 2 in saliva 2 in feces 1 in urine	Looking for the best predictive binary models of SARA with 2 or 3 parameters
4	Validation of each model : Confusion matrix	Dataset #1 (w=66): wk 3,4 -P1, wk 6,7,8,9 -P2	20 models with 2 or 3 parameters	Comparison of control, recovery and SARA predictive capacities of the established models with week data
		Dataset #2 (w=88): Dataset #1 + wk 10,12 -P3 Dataset #3 (w=77): Dataset #1 + wk 12 -P3	20 models with 2 or 3 parameters	Comparison of control, recovery and SARA predictive capacities of the established models with week data

PCA: principal component analysis, PLS-DA: partial least squares regression- discriminant analysis

2) A second selection of the most discriminant parameters was made by combining 2 multivariate approaches: (i) a principal component analysis (**PCA**) to establish the correlations between the rumen peripheral parameters and to illustrate the ability of these parameters to discriminate control and SARA, (ii) a partial least squares discriminant analysis (**PLS-DA**) to rank the importance of the parameters in the discrimination of control and SARA. The PCA and PLS-DA were performed on the mean data of control and SARA periods for the 11 cows (number of data : w=22). We implemented an individual normalization cow by cow in order to take into account the repeated measures without being impacted by the high inter-animal variability. Variable importance in projection (**VIP**) scores of the PLS-DA estimates the importance of each parameter (among each other) in the projection to the latent structure. Parameters with the highest VIP scores can be considered as the most important to discriminate control and SARA periods. Finally, a PCA was then performed on the averaged data by period with only the most important parameters (highest VIP) selected to illustrate the results.

3) From the previous selected parameters, statistical models were built in order to calculate the probability that a cow was under SARA or not from the combination of 2 or 3 parameters. Since a linear regression model has no limit boundaries, the use of a logistic function (sigmoid curve) was required as link function between the probability to be under SARA and the explanatory parameters. The classical logit function was chosen, and the models can be written as follow:

$$\ln\left(\frac{P(SARA | X_i)}{1 - P(SARA | X_i)}\right) = a_1X_1 + a_2X_2 + \dots + a_pX_p + b,$$

equivalent to:

$$P(SARA | X_i) = \frac{\exp(a_1X_1 + a_2X_2 + \dots + a_pX_p + b)}{1 + \exp(a_1X_1 + a_2X_2 + \dots + a_pX_p + b)}$$

with b = constant; a₁, 2, ..., p = coefficients; X₁, 2, ..., p = explanatory parameters.

To take into account the repeated measurements, a generalized linear mixed model (**GLMM**) was performed with lme4 and lmerTest packages (glmer function). The models were calculated with averaged values of parameters for control and SARA periods for each cow (w=22). A model selection was performed according to their Bayesian Information Criterion (**BIC**) and to maximize their likelihood function. Model by model, the *P*-value of each selected parameters was lower than 0.05.

4) Finally individual probability that a cow was under SARA or not was calculated for each model individually. Whereas the models were developed based on mean data of each period (mean of 2 samplings for P1 and 4 for P2), the ability of each model to detect SARA accurately was finally tested on individual week data (dataset #1):

- dataset #1 (w=66): wk 3, and 4-P1 for control and wk 6, 7, 8, and 9-P2 for SARA

Then, the ability of each model to identify accurately when animals had totally recovered from a SARA challenge was tested by comparing 2 different week datasets including recovery data as control: #2 and #3:

- dataset #2 (w=88): wk 3, and 4-P1, and wk 10, and 12-P3 for control and wk 6, 7, 8, and 9-P2 for SARA

- dataset #3 (w=77): wk 3, and 4-P1, and wk 12-P3 for control and wk 6, 7, 8, and 9-P2 for SARA

The first week of recovery P3 was not taken into account in the dataset #3, whereas it was included in dataset #2.

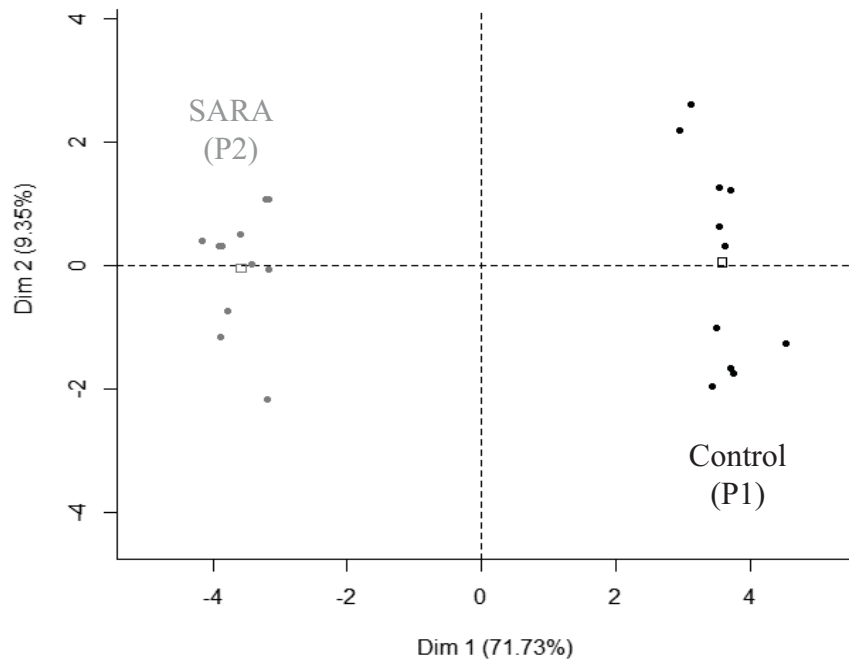
A value (or score) was a true positive (**TP**) when the probability calculated by the model was strictly above 0.50 during SARA period and a true negative (**TN**) when the probability calculated by the model was below 0.50 during control period. In contrast, a false-negative (**FN**) value was noted when the model calculated a probability strictly below 0.50 during SARA challenge and a false-positive (**FP**) value was attributed when the model calculated a probability strictly above 0.50 during control period. The true positive rate (**TPR**=sensitivity) and true negative rate (**TNR**=specificity) were then calculated as follows: $TPR = TP / (TP + FN)$, $TNR = TN / (FP + TN)$.

RESULTS

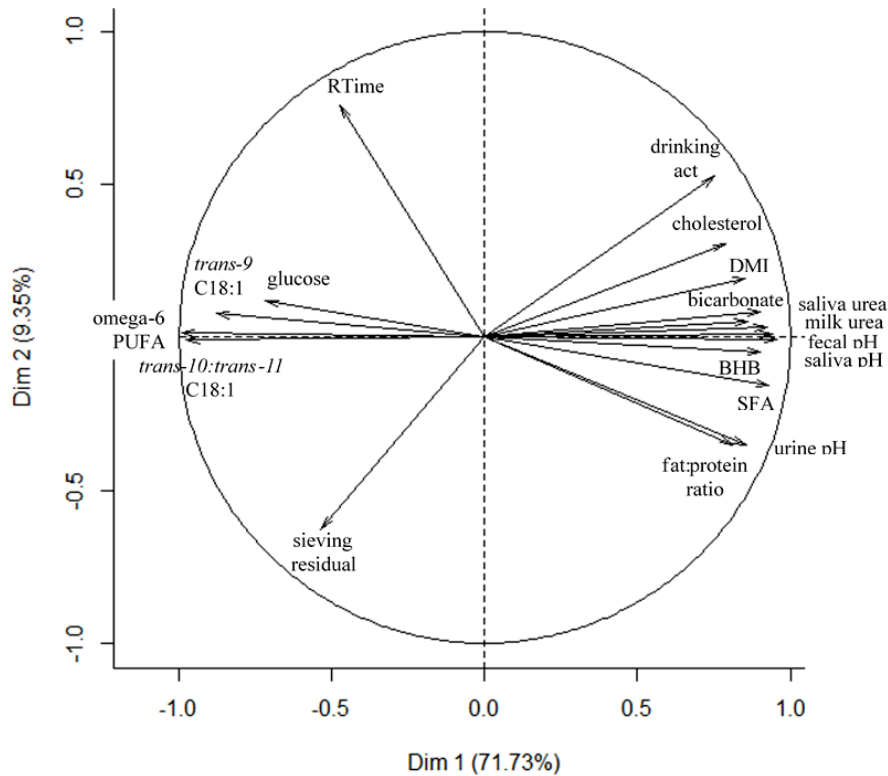
Screening of Non-Invasive Parameters

A total of 85 of 136 parameters was significantly modified between week measures throughout the experiment ($P < 0.1$) (Supplemental Table S 1). A large majority of changed parameters were measured in milk (41% of total modified parameters), blood (30%) and saliva (15%), whereas parameters related to feces (7% of total modified parameters), behavior (5%), and urine (<5%) were lower. The selection of 85 parameters was then refined using a multivariate analysis to identify which ones were the most appropriate to discriminate SARA from control. Hence, PLS-DA discriminated fewer parameters and a classification was performed with their individual VIP. Collinearity parameters were deleted to identify finally 18 parameters (i.e. for milk composition, fat:protein ratio was more discriminant in comparison to individual fat or protein concentrations).

As shown in Figure 14, the principal coordinate analysis revealed that PCA axes 1 and 2 accounted for 71.7% and 9.4% of the total dispersion, respectively. As expected, the PCA also showed that 2 groups were clearly separated on the first axis on the score plot (a): cows in the control period and cows in the SARA period. Selected parameters were mostly well represented on the first axis of the loading plot (b) except for sieving residual and RTime, which contributed less than the others on the axis 1. Parameters were able to characterize both control and SARA periods, indicating that the variability in the data is first explained by the 2 different periods. The loading plot (b) showed that lower values in several parameters, such as blood bicarbonate concentration, fat:protein milk ratio, milk urea and fecal pH, were closely related to SARA, while other parameters, such as percentage of omega-6 PUFA, and milk trans-10:trans-11 C18:1 ratio, had higher values.



(a) Mean score plots of 11 dairy cows



(b) Loading plots of the different parameters

Figure 14 : Principal component analysis (PCA) of selected rumen parameters discriminating cows with SARA from cows in the control period (P1)

Results of PCA presented as (a) mean score plots of 11 dairy cows, (b) loading plots of the different parameters (mean of wk 3 and 4 with 2 observations/cow for control (P1), mean of 4 observations/cow for SARA (P2)). The PCA was designed to illustrate mixed model results. RTime : rumination time, SFA : saturated fatty acid, DMI : dry matter intake

Table 4 summarizes the 18 selected parameters and their weekly mean values. Most of the parameters were modified for several weeks when cows were in the SARA period and recovered rapidly as soon as they were in the recovery period (wk 10-P3). Fecal pH, blood bicarbonate, BHB and cholesterol concentrations, milk fat:protein ratio and urea concentration were significantly lower during SARA in comparison to the control and recovery periods ($P < 0.001$). The milk omega-6 PUFA and *trans*-9 C18:1 concentrations and the *trans*-10:*trans*-11 C18:1 ratio were significantly increased, whereas saturated FA (SFA) decreased ($P < 0.001$) in cows with SARA in comparison to controls. The initial values of those parameters were only reached again in the last week of the recovery period (wk 13-P3). urea concentrations measured in milk and saliva both decreased ($P < 0.001$) in cows with SARA in comparison to controls, whereas blood urea concentration only decreased in wk 8 in SARA cows.

Combination of Rumen Peripheral Parameters for SARA Detection

Finally, in these particular experimental conditions, 20 different models able to detect SARA among all possible equations built from the 18 explanatory parameters were selected (Table 5): 15 models with 2 parameters and 5 models with 3 parameters.

The models were classified according to their sensitivity and specificity in detecting SARA. One model (no. 1) including dry matter intake (DMI), blood bicarbonate and milk urea concentrations perfectly identify (TPR =100%) when cows had SARA. In this study, 15 of the developed models correctly identified animals undergoing SARA with a sensitivity higher than 85% and a specificity higher than 90%.

Except for model no. 8 (blood BHB and milk urea concentrations) and model no. 12 (number of drinking acts, fecal pH), specificity increased when the data of the last week (wk 12-P3) of the recovery period (dataset #3) were used, in comparison to dataset #2 that also included the first week (wk 10-P3) of the recovery period.

Table 4 (part 1/2): Dairy cow parameters affected by experimental SARA challenge

Parameters	Periods			SARA ² (P2)			Recovery ¹ (P3)			SARA (P2)			Recovery (P3)				
	Week	Control ¹ (P1)		wk 6	wk 7	wk 8	wk 9	wk 10	wk 12	P-value ³ rsd		P-value of Dunnett's post-hoc test					
		Mean of 3,4 wk								Week	Model	wk 6	wk 7	wk 8	wk 9	wk 10	wk 12
Behavior																	
Drinking act, no./d		8.0 ± 0.7		6.8 ± 0.6	6.6 ± 0.6	7.5 ± 0.6	7.1 ± 0.6	8.2 ± 0.6	7.8 ± 0.6	<0,001	0.5	***	***	NS	**	NS	NS
Rtime, min/d		485 ± 47		500 ± 25	542 ± 31	519 ± 47	507 ± 53	521 ± 31	506 ± 52	0.016	41	NS	**	NS	NS	NS	NS
DMI, kg/d		19.0 ± 1.2		16.9 ± 1.2	16.0 ± 1.0	17.2 ± 0.5	16.1 ± 1.1	16.1 ± 0.9	19.2 ± 0.9	<0,001	0.9	***	***	***	***	***	NS
Feces																	
pH		6.71 ± 0.27		6.38 ± 0.39	6.13 ± 0.30	6.17 ± 0.17	5.89 ± 0.18	6.41 ± 0.18	6.46 ± 0.20	<0,001	0.24	**	***	***	***	NS	NS
Sieving residual (5+2 mm), %		13.7 ± 3.0		18.8 ± 6.1	17.5 ± 3.4	15.1 ± 4.0	15.2 ± 2.7	9.3 ± 2.6	11.9 ± 2.6	<0,001	3.7	**	NS	NS	NS	NS	NS
Blood																	
Bicarbonate, mmol/L		33.3 ± 2.6		26.6 ± 2.8	ND	25.6 ± 4.7	29.2 ± 2.8	30.6 ± 4.6	31.2 ± 2.7	<0,001	3.6	***	ND	***	*	NS	NS
BHB, mmol/L		0.429 ± 0.085		0.239 ± 0.037	0.231 ± 0.055	0.306 ± 0.082	0.332 ± 0.077	0.398 ± 0.083	0.420 ± 0.052	<0,001	0.066	***	***	***	***	NS	NS
Cholesterol, mmol/L		5.08 ± 0.67		3.93 ± 0.39	3.95 ± 0.33	4.31 ± 0.40	4.14 ± 0.55	4.67 ± 0.70	4.81 ± 0.60	<0,001	0.51	***	***	**	***	NS	NS
Glucose, mmol/L		4.17 ± 0.27		4.19 ± 0.25	4.48 ± 0.23	4.61 ± 0.22	4.50 ± 0.19	4.35 ± 0.24	4.26 ± 0.19	<0,001	0.20	NS	**	***	***	NS	NS

¹ Cows were fed with a low-starch diet (LSD) during control and recovery periods: 32% concentrate + 68% forage, containing 13% starch.

² Cows were fed with a high-starch diet (HSD) during the SARA period: 54% concentrate + 46% forage, containing 35% starch.

8 week measurements were performed: 2 weeks in period 1 (P1): wk 3 -P1, wk 4 -P1 which were averaged (3,4 wk-P1), 4 weeks in period 2 (P2): wk 6 -P2, wk7 -P2, wk 8 -P2, wk 9 -P2 and 2 weeks in period 3 (P3): wk 10 -P3, wk 12 -P3.

³ A linear mixed model was used to compare weeks of measurements during the experiment.

⁴ Dunnett's post-hoc test was performed to compare mean control vs each other individual weeks during the experiment.

NS $P > 0.10$, * $P < 0.1$, ** $P < 0.05$, *** $P < 0.01$

ND = not determined.

Table 4 (part 2/2): Dairy cow parameters affected by experimental SARA challenge

Parameters	Periods Control ¹ (P1)			SARA ² (P2)			Recovery ¹ (P3)			SARA (P2)			Recovery (P3)		
	Week	Mean of 3,4 wk		wk 7	wk 8	wk 9	wk 10	wk 12	P-value ³		Model	P-value of Dunnett's post-hoc test			
		rsd	Week						rsd	wk 6		wk 7	wk 8	wk 9	wk 10
Milk															
Fat:protein ratio		1.21 ± 0.16	1.02 ± 0.12	0.92 ± 0.16	0.94 ± 0.10	0.99 ± 0.10	1.10 ± 0.14	1.16 ± 0.07	<0,001	0.12		***	***	***	NS
Urea, mmol/L		4.43 ± 0.42	3.52 ± 0.33	3.22 ± 0.36	3.15 ± 0.37	3.39 ± 0.19	4.89 ± 0.46	4.71 ± 0.30	<0,001	0.35		***	***	***	NS
FA, g/100g of total FA															
SFA		69.5 ± 2.3	61.6 ± 1.9	64.0 ± 3.4	66.9 ± 1.9	65.0 ± 3.8	63.9 ± 2.1	67.9 ± 2.4	<0,001	2.5		***	***	*	NS
Omega 6 PUFA		2.00 ± 0.14	2.69 ± 0.17	2.65 ± 0.30	2.78 ± 0.21	2.75 ± 0.32	2.53 ± 0.23	2.15 ± 0.12	<0,001	0.21		***	***	***	NS
<i>trans-10:trans-11</i> C18:1		0.30 ± 0.10	1.57 ± 1.10	2.66 ± 1.70	2.25 ± 1.05	2.28 ± 1.10	0.71 ± 0.48	0.66 ± 0.96	<0,001	1.050		***	***	***	NS
<i>trans-9</i> C18:1		0.21 ± 0.04	0.33 ± 0.04	0.31 ± 0.07	0.30 ± 0.06	0.35 ± 0.10	0.27 ± 0.05	0.22 ± 0.04	<0,001	0.060		***	***	***	NS
Urine															
pH		8.19 ± 0.09	7.72 ± 0.18	7.93 ± 0.11	8.11 ± 0.17	8.02 ± 0.22	8.02 ± 0.13	7.99 ± 0.05	<0,001	0.15		***	***	NS	*
Saliva															
pH		9.04 ± 0.14	8.59 ± 0.12	8.64 ± 0.12	8.60 ± 0.11	8.59 ± 0.13	8.52 ± 0.18	8.45 ± 0.13	<0,001	0.14		***	***	***	***
Urea, mmol/L		4.04 ± 0.88	2.69 ± 0.57	2.52 ± 0.74	2.95 ± 0.69	3.26 ± 0.46	3.90 ± 0.82	3.06 ± 0.47	<0,001	0.65		***	***	***	**

¹ Cows were fed with a low-starch diet (LSD) during control and recovery periods: 32% concentrate + 68% forage, containing 13% starch.

² Cows were fed with a high-starch diet (HSD) during the SARA period: 54% concentrate + 46% forage, containing 35% starch.

8 week measurements were performed: 2 weeks in period 1 (P1): wk 3 -P1, wk 4 -P1 which were averaged (3,4 wk-P1), 4 weeks in period 2 (P2): wk 6 -P2, wk7 -P2, wk 8 -P2, wk 9 -P2 and 2 weeks in period 3 (P3): wk 10 -P3, wk 12 -P3.

³ A linear mixed model was used to compare weeks of measurements during the experiment.

⁴ Dunnett's post-hoc test was performed to compare mean control vs each other individual weeks during the experiment.

NS $P > 0.10$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

ND = not determined.

Table 5 (part 1/2) : Generalization of multiple linear regression model of selected parameters and their ability to classify animals in control, SARA and recovery periods

No.	Parameters and matrices of the models										Classification's abilities of the models					
	Parameter 1, X1		Parameter 2, X2		Parameter 3, X3		Model coefficients				Dataset #1		Dataset #2		Dataset #3	
	Matrix	DMI, kg/d	Matrix	Blood	Bicarbonate, mmol/L	Matrix	Milk	Urea, mmol/L	Constant, b	a1	a2	a3	TPR = Se	TNR = Sp	TNR = Sp	TNR = Sp
1	Behavior	DMI, kg/d	Blood	Blood	Bicarbonate, mmol/L	Milk	Urea, mmol/L	635	-8.91	-8.06	-56.3	100.0	100.0	87.1	100.0	100.0
2	Milk	Urea, mmol/L	Saliva	Saliva	pH			2725	-153	-238		97.7	95.2	79.1	84.4	84.4
3	Blood	Cholesterol, mmol/L	Milk	Milk	Omega 6 g/100g FA	Omega 6 PUFA, g/100g FA		-920	-292	1005		95.5	90.9	70.5	90.9	90.9
4	Behavior	DMI, kg/d	Milk	Milk	Omega 6 g/100g FA	Omega 6 PUFA, g/100g FA		-431	-22.5	366		95.5	90.9	70.5	87.9	87.9
5	Blood	Bicarbonate, mmol/L	Milk	Milk	Urea, mmol/L			591	-12.6	-51.8		93.9	100.0	87.1	90.0	90.0
6	Blood	Bicarbonate, mmol/L	Milk	Milk	Fat:protein ratio			2318	-46.8	-736		93.9	90.0	75.0	81.0	81.0
7	Behavior	RTime, min/d	Behavior	Behavior	DMI, kg/d	Milk	Omega 6 PUFA, g/100g FA	-211	0.29	-13.6	134	93.2	100.0	75.0	97.0	97.0
8	Blood	BHB, mmol/L	Milk	Milk	Urea, mmol/L			816	-580	-158		93.2	95.2	97.7	96.9	96.9
9	Behavior	DMI, kg/d	Milk	Milk	Urea, mmol/L			1187	-31.5	-155		93.2	95.2	90.7	96.9	96.9
10	Blood	BHB, mmol/L	Blood	Blood	Glucose, g/L	Urine	pH	3153	-903	795	-423	93.2	90.9	70.5	84.8	84.8

Equation of the models: Probability (SARA | Xi) = $\exp(b + a1 X1 + a2 X2 + a3 X3) / (1 + \exp(b + a1 X1 + a2 X2 + a3 X3))$

Dataset #1: wk 3 -P1, wk 4 -P1 (control) and wk 6 -P2, wk 7 -P2, wk 8 -P2, wk 9 -P2 (SARA)

Dataset #2: wk 3 -P1, wk 4 -P1 (control) and wk 6 -P2, wk 7 -P2, wk 8 -P2, wk 9 -P2 (SARA) and wk 10 -P3, wk 12 -P3 (recovery)

Dataset #3: wk 3 -P1, wk 4 -P1 (control) and wk 6 -P2, wk 7 -P2, wk 8 -P2, wk 9 -P2 (SARA) and wk 12 -P3 (recovery)

True positive (TP) value (or score) was when the model identifies a cow with SARA with a probability strictly above 50% during SARA challenge.

True negative (TN) value was when the model identifies a cow with SARA with a probability strictly below 50% during the control period.

False negative (FN) value was noted when the model identifies a cow with SARA with a probability strictly below 50% during SARA challenge.

False positive (FP) value was attributed when the model identifies a cow with SARA with a probability strictly above 50% during the control period.

Se: sensitivity, Sp: specificity, no.: number

True positive rate (TPR=Se), and true negative rate (TNR=Sp) were then calculated as follow:

$TPR = TP / (TP + FN)$, $TNR = TN / (FP + TN)$.

Table 5 (part 2/2) : Generalization of multiple linear regression model of selected parameters and their ability to predict control and SARA periods in this experimentally induced SARA challenge

No.	Parameters and matrices of the models										Classification's abilities of the models					
	Parameter 1, X1		Parameter 2, X2		Parameter 3, X3		Model coefficients				Dataset #1		Dataset #2		Dataset #3	
	Matrix	Urea, mmol/L	Matrix	pH	Matrix	Urea, mmol/L	Matrix	SFA, g/100g FA	Constant, b	a1	a2	a3	TPR = Se	TNR = Sp	TNR = Sp	TNR = Sp
11	Milk	Urea, mmol/L	Urine	pH				5968	-413	-538			93.0	100.0	94.7	100.0
12	Behavior	Drinking act, no./d	Feces	pH	Milk	Urea, mmol/L		1314	-13.0	-149	-72.2		91.4	100.0	97.1	96.2
13	Milk	<i>trans-10:trans-11</i> C18:1, g/100g FA	Saliva	Urea, mmol/L				385	493	-68.6			90.9	100.0	79.5	87.9
14	Behavior	Drinking act, no./d	Feces	pH	Milk	SFA, g/100g FA		1456	-12.3	-146	-6.26		88.6	94.4	76.5	88.5
15	Feces	pH	Blood	BHB, mmol/L				2913	-400	-916			88.4	90.9	81.8	87.9
16	Feces	pH	Milk	Urea, mmol/L				2005	-253	-103			86.0	100.0	93.0	96.9
17	Feces	pH	Milk	<i>trans-10:trans-11</i> C18:1, g/100g FA				1569	-243	89.0			86.0	95.5	79.5	84.8
18	Feces	pH	Milk	Fat:protein ratio				2093	-294	-195			86.0	90.9	81.8	84.8
19	Feces	pH	Behavior	DMI, kg/d				6502	-533	-179			83.7	90.9	75.0	93.9
20	Feces	Sieving residual (5+2mm), %	Urine	pH				14065	21.6	-1778			79.1	94.4	61.5	64.3

Equation of the models: Probability (SARA | Xi) = exp(b + a1 X1 + a2 X2 + a3 X3) / (1 + exp(b + a1 X1 + a2 X2 + a3 X3))

Dataset #1: wk 3 -P1, wk 4 -P1 (control) and wk 6 -P2, wk 7 -P2, wk 8 -P2, wk 9 -P2 (SARA)

Dataset #2: wk 3 -P1, wk 4 -P1 (control) and wk 6 -P2, wk 7 -P2, wk 8 -P2, wk 9 -P2 (SARA) and wk 10 -P3, wk 12 -P3 (recovery)

Dataset #3: wk 3 -P1, wk 4 -P1 (control) and wk 6 -P2, wk 7 -P2, wk 8 -P2, wk 9 -P2 (SARA) and wk 12 -P3 (recovery)

True positive (TP) value (or score) was when the model identifies a cow with SARA with a probability strictly above 50% during SARA challenge.

True negative (TN) value was when the model identifies a cow with SARA with a probability strictly below 50% during the control period.

False negative (FN) value was noted when the model identifies a cow with SARA with a probability strictly below 50% during SARA challenge.

False positive (FP) value was attributed when the model identifies a cow with SARA with a probability strictly above 50% during the control period.

Se: sensitivity, Sp: specificity, no.: number

True positive rate (TPR=Se), and true negative rate (TNR=Sp) were then calculated as follow:

TPR=TP/(TP+FN) , TNR=TN/(FP+TN).

DISCUSSION

The HSD distributed to dairy cows in P2 successfully induced SARA during the 4 wk of P2, as already demonstrated by Villot et al. (2017b). Briefly, DMI and milk fat:protein ratio decreased during SARA in comparison to control period when cows were fed an LSD. In the rumen, we noted a decrease in total protozoa number, ruminal butyrate concentration, and acetate:propionate ratio, whereas LPS and valerate concentrations increased during SARA challenge. New relative rumen pH indicators also confirmed rumen disorders when cows were fed with an HSD (SARA period) in comparison to the control period when cows were fed an LSD. As the experimental design and the SARA inducing diets were previously validated, we propose here an original approach to better detect SARA by developing multi-parametric models combining rumen peripheral parameters established by comparison between the control and SARA periods. A large panel of non-invasive parameters ($k=136$) was screened when dairy cows were undergoing SARA challenge. Eighty-five parameters were modified during this SARA challenge in comparison with cows in the control period. Based on a multivariate analysis, 18 specific and non-redundant parameters from milk, blood, urine, saliva and fecal matrices as well as behavior were selected.

Rumen Peripheral Indicators of SARA

More than 65% of these 136 parameters were significantly modified in the experiment during SARA.

Blood. Seven metabolic parameters were relevant in building the models of SARA detection. Lower plasma concentrations of bicarbonate, BHB and cholesterol were consistent with a previous study in which SARA challenge was induced by a high-grain diet (Guo et al., 2013). Change in systemic blood acid-base status (decrease in blood bicarbonate concentration in SARA vs control periods) can be indicative to some extent of physiological compensation for increased absorption of ruminal VFA during SARA (Burrin and Britton, 1986). In our study, the screened blood inflammatory indicators like acute phase proteins (haptoglobin or ceruloplasmin) were not affected by SARA challenge, but there was a high level of endotoxin in the rumen during SARA in comparison to control (Villot et al., 2017b). The acute inflammatory process was then not observed during our challenge (Bertoni and Trevisi, 2013). However, this does not mean the lack of an inflammatory response. Indeed, in agreement with Khafipour et al. (2009a), low plasma cholesterol can be related to the systemic inflammatory response and it can be associated with

the severity of the acute phase response (Bertoni et al., 2008), since there is an inverse relationship between LPS level in the rumen and plasma cholesterol concentration (Zebeli et al., 2011). Blood glucose concentration was increased during SARA, as already reported in a study on buffaloes (Mohan et al., 2015). High liver glycogenolysis, and high concentrations of rumen propionate converted into glucose or cortisol consequent to inflammation could be responsible for this hyperglycemia. The synthesis of blood BHB is mainly dependent on rumen butyrate metabolism via ketogenesis (Rémond et al., 1995) or NEFA oxidation in hepatic tissue (Roche et al., 2008). Here, NEFA concentration does not reflect a negative energy balance of the animals (Nydam et al., 2013), so the lower concentration of plasma BHB could be due to the decrease in butyrate in the rumen. In contrast to several authors (Hou et al., 2008, Guo et al., 2013), we found no effect on oxidative stress parameters.

Milk. Urea nitrogen was decreased in milk matrix during SARA challenge. A high level of fermentable carbohydrates in the diet favors microbial protein synthesis, which reduces rumen NH_3 concentration. Therefore, the formation of hepatic urea is reduced and less urea is excreted in blood and milk (Enemark et al., 2002). These results have been confirmed by Gao and Oba (2015), who were able to separate (or distinguish) cows with low or high risk of SARA according to milk urea nitrogen (**MUN**) and milk fat content. In addition, more MUN recycling back to the rumen may decrease the amount of urea excreted in milk. The decrease in MUN can also be linked to a lower ingestion (Bertoni et al., 2008) and therefore a lower protein intake during SARA challenge. In our study, milk urea concentration was correlated with saliva and blood concentrations, as reported previously (Broderick and Clayton, 1997). Milk fat:protein ratio appeared to be a parameter relevant to SARA in our study, but was insufficient on its own to be a specific indicator of this nutritional disease, since other metabolic disorders can affect this ratio (Vlcek et al., 2016). Omega-6 PUFA, SFA, *trans-10:trans-11* C18:1 and *trans-9* C18:1 were selected to build the models of SARA. Many authors report that specific FA are good predictors of rumen function and therefore could be informative about rumen disorders induced in SARA challenge (Vlaeminck et al., 2006, Colman et al., 2010, Fievez et al., 2012).

Saliva. Even though the literature has few references to indicators of SARA in saliva, this matrix is promising and really easy to sample. Of 23 parameters analyzed in saliva during our trial, only urea concentration and pH discriminate SARA and no-SARA periods. Saliva is closely related to blood and can thus reflect blood variations in metabolites, hormones or inflammatory markers (Lamy and Mau, 2012). We noted no inflammatory parameters in blood during SARA challenge. Consequently, we cannot judge whether or not saliva samples can reveal an inflammatory process or if no inflammatory process was induced in our study. Proteome and

microbiota compositions in saliva samples have been used as non-invasive approaches to study animal diseases (Lamy and Mau, 2012, Gutierrez et al., 2013). However, the changes in saliva composition in response to ingestion, rumination (Kittelman et al., 2015) or to the animal physiological status might lead also to important variations. Therefore, it is necessary to pay particular attention on the standardization of saliva collection in order to compare parameters between animals and studies.

Behavior. The daily DMI and drinking acts of the animals were decreased with SARA challenge compared to the control period. Reduced and erratic feed intake have been seen as important signs of SARA (Kleen et al., 2003). In several studies, RTime appeared to be decreased during SARA, due principally to particle size reduction of the diet (Grant et al., 1990). However, in our study, RTime was increased. Our cows seemed to spend more time buffering their rumen by stimulating salivation production to offset an acidotic diet (Beauchemin et al., 2003b). The decrease in drinking acts and water consumption during SARA challenge could be an indicator of sickness for animals, as suggested by authors. Therefore, for the future, we could improve the monitoring of drinking behavior by estimating daily water consumption based on rumen temperature measured with bolus, as it has already been initiated by Gasteiner et al. (2009).

SARA Detection with the Combinations of Rumen Peripheral Parameters

The statistical approach developed in this study was designed to describe in all analyzed matrices which parameters were affected by SARA challenge (step 1, Table 3). The multivariate analysis allowed the choice of non-redundant parameters that were the most important in discriminating controls from SARA (step 2). At this step, 18 parameters from different matrices explained much of the variability induced by SARA challenge. The originality of our approach was to combine the selected parameters in order to build relevant multi-parametric models (step 3). Their ability to properly classify animals undergoing SARA or not in our experimental conditions was then evaluated (step 4).

Twenty models were established using the averaged data of the control and SARA periods of the 18 parameters previously highlighted in different rumen peripheral matrices. Models were selected according to the best combination of both sensitivity and specificity in detection of SARA, with data at the week scale: dataset #1 (average data by period was used to build the models). Then, the abilities of the established models to properly classify animals during the recovery period were calculated with wk data using 2 different datasets (dataset #2 & #3). Sensitivity was the same for the 3 tested datasets since only 1 period of SARA challenge was performed during our study but specificities of the models were mainly higher when only week data from the

control period (dataset #1) were used. These results are consistent with the fact that models were established with mean values over the periods of the same dataset. Specificity was then higher with week data of the recovery period without the first week (wk 10-P3) (dataset #3), compared to dataset #2 containing this previous wk 10-P3 and wk 12-P3 of the recovery period. This result shows that animals need time to recover their initial healthy status after a SARA challenge. Krause and Oetzel (2005) also demonstrated that cows need several days to recover from a SARA challenge. Our models reflect the physiological status of the animals that have not fully recovered from the previous challenge and discriminate animals experiencing SARA and not only the diet changes.

In this pilot study, we developed an original approach, where the established models seem promising in terms of sensitivity and specificity for SARA detection. However, the proposed models were calculated based on a single experimental SARA challenge involving 11 animals, where only one specific acidotic diet was used to induce SARA. Therefore, it seems evident that those models need to be faced to other conditions of SARA induction with a higher number of animals. The variability provided by other SARA-inducing diets may impair the ability of the models to correctly classify the animals, then models adjustments or improvements will be required.

Combinations of Rumen Peripheral Parameters to Detect SARA On-Farm

Of the 18 parameters selected, several can be measured on-farm following easy sample collection. For instance, milk FA composition was measured by gas chromatography in our study. However, recent studies have yielded good results in prediction using mid-infrared spectroscopy (Coppa et al., 2010). Calamari et al. (2016) have also proposed using spectrophotometry to determine some common plasma parameters. Even though further improvements in mid-infrared spectroscopy are still required to obtain high standard predictive equations, it is nevertheless a promising technique for on-farm measurement of parameters. In comparison with other standard methods, it can be faster and cheaper. Moreover, for some matrices (saliva, urine and feces), it may be necessary to contain animals to sample with non-invasive techniques and so this manipulation can induce stressful situations and increase bias in the parameters analyzed. The pH measurements in these matrices are heterogeneously affected during SARA challenge (Luan et al., 2016), but this measurement can easily be performed on-farm and combination with other data may improve detection of SARA.

With a sensitivity higher than 85% for more than three-quarters of the established models in our study, we propose to evaluate their usefulness in the on-farm detection of SARA. Nevertheless,

the models also need to be specific enough to be able to identify when cows do not have SARA. Model no. 1, which includes the parameters daily DMI, blood bicarbonate and milk urea concentration, showed 100% sensitivity and 100% specificity and is thus promising. Feed consumption is not yet measured individually and routinely on farms. With the implementation of sensors and precision livestock technologies, we can expect that measurement of the daily feed intake of individual cows will be available at an affordable price for farmers in the very near future. Use of this model also requires blood and milk samples. MUN can be measured during routine checks on milk performance, but blood sampling remains a veterinarian practice. Although this simple model is promising, it may not be applicable now to all farms. Another model (no. 2) requires only 2 parameters that are already easy to measure on farms: saliva pH and urea in milk. This model only misclassified 2.3% of the data during the SARA challenge, which seems acceptable since SARA is a chronic disorder.

The detection abilities of the established models were tested with only 1 specific condition of SARA challenge. To evaluate the robustness of our results, it is essential to expand validation by testing the detection abilities of models with other data, including a larger number of SARA conditions involving different diets and herd characteristics. Models also need to be specific to SARA and therefore they could be tested with other diseases to evaluate their specificity for SARA. Finally, it will be useful to keep all the models established in this study in order to test a large panel of combinations on a larger number of animals.

CONCLUSION

A large screening of parameters (k=136) measured simultaneously on the same dairy cows and known to be affected by SARA challenge gave us the opportunity to propose multi-parametric models of 2 or 3 parameters for SARA detection in our experimental conditions. Twenty models were proposed with specificity and sensitivity above 90% and 75%, respectively to detect SARA. In particular, 1 model involving DMI, blood bicarbonate and milk urea concentrations seems able to detect when cows are undergoing SARA challenge and when they totally recovered from this challenge. Nevertheless, all the models of our study have been developed using a single SARA induction diet; they must be evaluated under different SARA conditions with more animals and tested with other diseases to confirm their specificity. Finally, it should be remembered that rumen pH is still considered as the gold standard in SARA detection and is beginning to be widespread in dairy production systems. Therefore, it may be pertinent to combine rumen pH monitoring and rumen peripheral parameters to enhance the ability of future models to detect SARA in ruminants.

ACKNOWLEDGMENTS

The present PhD research of Clothilde Villot was financially supported by Valorex, Terrena and Lallemand. The authors thank the personnel of the INRA experimental unit (Herbipôle) for cow welfare, feeding, and sampling. We also thank Annarita Ferrari, Emilie Tixier, Sophie Laverroux, Anne-Sophie Bage, Eric Delval and Aurélie Ameilbonne for their laboratory technical assistance. The authors are grateful to Isabelle Veissier and Pierre Nozière for thoroughly reviewing this manuscript.

REFERENCES

- Beauchemin, K., W. Yang, and L. Rode. 2003. Effects of particle size of alfalfa-based dairy cow diets on chewing activity, ruminal fermentation, and milk production. *Journal of Dairy Science* 86(2):630-643.
- Bertoni, G. and E. Trevisi. 2013. Use of the liver activity index and other metabolic variables in the assessment of metabolic health in dairy herds. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice* 29(2):413-431.
- Bertoni, G., E. Trevisi, X. Han, and M. Bionaz. 2008. Effects of inflammatory conditions on liver activity in puerperium period and consequences for performance in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 91(9):3300-3310.
- Burrin, D. and R. Britton. 1986. Response to monensin in cattle during subacute acidosis. *Journal of Animal Science* 63(3):888-893.
- Calamari, L., A. Ferrari, A. Minuti, and E. Trevisi. 2016. Assessment of the main plasma parameters included in a metabolic profile of dairy cow based on Fourier Transform mid-infrared spectroscopy: preliminary results. *BMC veterinary research* 12(1):4.
- Colman, E., W. Fokkink, M. Craninx, J. Newbold, B. De Baets, and V. Fievez. 2010. Effect of induction of subacute ruminal acidosis on milk fat profile and rumen parameters. *Journal of Dairy Science* 93(10):4759-4773.
- Coppa, M., A. Ferlay, C. Leroux, M. Jestin, Y. Chilliard, B. Martin, and D. Andueza. 2010. Prediction of milk fatty acid composition by near infrared reflectance spectroscopy. *Internal Dairy Journal* 20(3):182-189.
- Enemark, J. M. D., R. Jorgensen, and P. S. Enemark. 2002. Rumen acidosis with special emphasis on diagnostic aspects of subclinical rumen acidosis: a review. *Veterinarija ir zootechnika* 20(42):16-29.
- Ferlay, A., B. Martin, S. Lerch, M. Gobert, P. Pradel, and Y. Chilliard. 2010. Effects of supplementation of maize silage diets with extruded linseed, vitamin E and plant extracts rich in polyphenols, and morning v. evening milking on milk fatty acid profiles in Holstein and Montbéliarde cows. *Animal* 4(04):627-640.
- Fievez, V., E. Colman, J. Castro-Montoya, I. Stefanov, and B. Vlaeminck. 2012. Milk odd- and branched-chain fatty acids as biomarkers of rumen function—An update. *Animal Feed Science Technology* 172(1):51-65.
- Gao, X. and M. Oba. 2015. Short communication: Noninvasive indicators to identify lactating dairy cows with a greater risk of subacute rumen acidosis. *Journal of Dairy Science* 98(8):5735-5739.
- Garrett, E., K. Nordlund, W. Goodger, and G. Oetzel. 1997. A cross-sectional field study investigating the effect of periparturient dietary management on ruminal pH in early lactation dairy cows. *Journal of Dairy Science* 80(Suppl 1):169.
- Gasteiner, J., M. Fallast, S. Rosenkranz, J. Häusler, K. Schneider, and T. Guggenberger. 2009. Zum Einsatz einer intraruminalen pH-Datenmesseinheit mit kabelloser Datenübertragung bei Rindern unter verschiedenen Fütterungsbedingungen. na.
- Gasteiner, J., M. Horn, and A. Steinwidder. 2015. Continuous measurement of reticuloruminal pH values in dairy cows during the transition period from barn to pasture feeding using an indwelling wireless data transmitting unit. *Journal of Animal Physiology and Nutrition*. 99(2):273-280.
- Gozho, G., D. O. Krause, and J. C. Plaizier. 2007. Ruminal lipopolysaccharide concentration and inflammatory response during grain-induced subacute ruminal acidosis in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 90(2):856-866.

- Grant, R., V. Colenbrander, and D. Mertens. 1990. Milk Fat Depression in Dairy Cows: Role of Silage Particle Size. *Journal of Dairy Science* 73(7):1834-1842.
- Guo, Y., X. Xu, Y. Zou, Z. Yang, S. Li, and Z. Cao. 2013. Changes in feed intake, nutrient digestion, plasma metabolites, and oxidative stress parameters in dairy cows with subacute ruminal acidosis and its regulation with pelleted beet pulp. *Journal of Animal Science Biotechnology* 4(1):31.
- Gutierrez, A. M., K. Nobauer, L. Soler, E. Razzazi-Fazeli, M. Gemeiner, J. J. Ceron, and I. Miller. 2013. Detection of potential markers for systemic disease in saliva of pigs by proteomics: a pilot study. *Veterinary immunology and immunopathology* 151(1-2):73-82.
- Hou, Z.-g., Z.-y. Wang, T.-j. Chai, Y.-d. Jia, Q.-l. Gong, J. Ma, and Y.-t. Wang. 2008. Effects of forage to concentrate ratio on homeostasis of rumen and oxidative stress in cows. *Acta veterinaria et zootechnica sinica* 39(4):455.
- INRA. 2010. Valeur alimentaire des fourrages et des matières premières: tables et prévisions. in *Alimentation des bovins, ovins et caprins. Besoins des animaux.* . Institut National de la Recherche Agronomique ed. Quae. Institut National de la Recherche Agronomique, Paris, France.
- Khafipour, E., D. O. Krause, and J. C. Plaizier. 2009. Alfalfa pellet-induced subacute ruminal acidosis in dairy cows increases bacterial endotoxin in the rumen without causing inflammation. *Journal of Dairy Science* 92(4):1712-1724.
- Kittelmann, S., M. R. Kirk, A. Jonker, A. McCulloch, and P. H. Janssen. 2015. Buccal swabbing as a non-invasive method to determine bacterial, archaeal, and eukaryotic microbial community structure in the rumen. *Applied and environmental microbiology* 81(21):7470-7483.
- Kleen, J., G. A. Hooijer, J. Rehage, and J. P. Noordhuizen. 2003. Subacute ruminal acidosis (SARA): a review. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 50(8):406-414.
- Krause, K. and G. Oetzel. 2005. Inducing subacute ruminal acidosis in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 88(10):3633-3639.
- Lamy, E. and M. Mau. 2012. Saliva proteomics as an emerging, non-invasive tool to study livestock physiology, nutrition and diseases. *Journal of Proteomics* 75(14):4251-4258.
- Li, S., E. Khafipour, D. Krause, L. González, and J. Plaizier. 2011. Effects of grain-pellet and alfalfa-pellet subacute ruminal acidosis (SARA) challenges on feeding behaviour of lactating dairy cows. *Can J Anim Sci* 91(2):323-330.
- Luan, S., K. Cowles, M. Murphy, and F. Cardoso. 2016. Effect of a grain challenge on ruminal, urine, and fecal pH, apparent total-tract starch digestibility, and milk composition of Holstein and Jersey cows. *Journal of Dairy Science* 99(3):2190-2200.
- Martin, C., L. Brossard, and M. Doreau. 2006. Mécanismes d'apparition de l'acidose latente et conséquences physiopathologiques et zootechniques. *INRA Productions Animales* 19(2):93-108.
- Mialon, M., C. Martin, F. Garcia, J. Menassol, H. Dubroeuq, I. Veissier, and D. Micol. 2008. Effects of the forage-to-concentrate ratio of the diet on feeding behaviour in young Blond d'Aquitaine bulls. *Animal* 2(11):1682-1691.
- Mohan, G., A. Kumar, and B. Naik. 2015. Effect of rumen fermentative disorders on physiological parameters in buffaloes. *Int J Vet Sci* 4(1):10-14.
- Nydam, D. V., P. A. Ospina, J. A. McArt, G. Oetzel, and T. R. Overton. 2013. Monitoring Negative Energy Balance in Transition Dairy Cows for Herd Results. Pages 9-22 in *Proc. Proceedings of the 22nd Tri-State Dairy Nutrition Conference, Fort Wayne, Indiana, USA, 23-24 April 2013.* Michigan State University.
- Plaizier, J., D. O. Krause, G. N. Gozho, and B. W. McBride. 2008. Subacute ruminal acidosis in dairy cows: The physiological causes, incidence and consequences. *The Veterinary Journal* 176(1):21-31.

- Plaizier, J. C., S. Li, A. M. Danscher, H. Derakshani, P. H. Andersen, and E. Khafipour. 2017. Changes in Microbiota in Rumen Digesta and Feces Due to a Grain-Based Subacute Ruminal Acidosis (SARA) Challenge. *Microbiology Ecology*:1-11.
- Rémond, D., I. Ortigues, and J.-P. Jouany. 1995. Energy substrates for the rumen epithelium. *Proceedings of the Nutrition Society* 54(1):95-105.
- Roche, J., A. Sheahan, L. Chagas, and R. Boston. 2008. Change in plasma ghrelin in dairy cows following an intravenous glucose challenge. *Journal of Dairy Science* 91(3):1005-1010.
- Schirmann, K., M. A. von Keyserlingk, D. Weary, D. Veira, and W. Heuwieser. 2009. Technical note: Validation of a system for monitoring rumination in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 92(12):6052-6055.
- Soriani, N., E. Trevisi, and L. Calamari. 2012. Relationships between rumination time, metabolic conditions, and health status in dairy cows during the transition period. *Journal of Animal Science* 90(12):4544-4554.
- Tapio, I., K. J. Shingfield, N. McKain, A. Bonin, D. Fischer, A. R. Bayat, J. Vilkki, P. Taberlet, T. J. Snelling, and R. J. Wallace. 2016. Oral Samples as Non-Invasive Proxies for Assessing the Composition of the Rumen Microbial Community. *Plos One* 11(3):e0151220.
- Trevisi, E., A. Minuti, S. Cogrossi, P. Grossi, S. Ahmed, and P. Bani. 2014. Can a single rumen sample really diagnose SARA in commercial farms? *Anim. Prod. Sci.* 54(9):1268-1272.
- Vagnoni, D. and G. Oetzel. 1998. Effects of dietary cation-anion difference on the acid-base status of dry cows. *Journal of Dairy Science* 81(6):1643-1652.
- Villot, C., B. Meunier, J. Bodin, C. Martin, and M. Silberberg. 2017. Relative reticulo-rumen pH indicators for subacute ruminal acidosis detection in dairy cows. *Animal*:1-10.
- Vlaeminck, B., V. Fievez, S. Tamminga, R. Dewhurst, A. Van Vuuren, D. De Brabander, and D. Demeyer. 2006. Milk odd-and branched-chain fatty acids in relation to the rumen fermentation pattern. *Journal of Dairy Science* 89(10):3954-3964.
- Vlcek, M., J. Candrak, and R. Kasarda. 2016. Fat-to-protein ratio: Evaluation of metabolic disorders and milk yield. *Acta Agric. Slov.* 5:77.
- Zebeli, Q., S. Dunn, and B. Ametaj. 2011. Perturbations of plasma metabolites correlated with the rise of rumen endotoxin in dairy cows fed diets rich in easily degradable carbohydrates. *Journal of Dairy Science* 94(5):2374-2382.

APPENDIX

Supplemental Table S 1 (part 1/7). Exhaustive list of parameters analyzed during SARA challenge

Matrix	Parameters analyzed	Control ¹ (P1)			SARA ² (P2)			Recovery ¹ (P3)			P-value		rsd
		Mean of wk 3,4	wk 6	wk 7	wk 8	wk 9	wk 10	wk 12	wk	Model			
Feces	pH	6.71	6.38	6.13	6.17	5.89	6.41	6.41	6.41	< 0.001	< 0.001	0.24	
	Histamine, ng/mL*	58.2	72.3	ND	ND	ND	ND	127.3	ND	< 0.001	< 0.001	38.8	
	Dry matter, %	12.0	11.4	11.6	12.9	13.3	13.3	12.4	13.3	NS	NS	1.4	
	Sieving residual (5 mm), %	5.4	11.6	5.6	4.7	3.9	2.8	4.4	2.8	< 0.001	< 0.001	2.0	
	Sieving residual (2 mm), %	8.3	7.2	12.0	10.4	11.3	6.5	7.6	6.5	< 0.001	< 0.001	3.0	
	Sieving residual (5+2 mm), %	13.7	18.8	17.5	15.1	15.2	9.3	11.9	9.3	< 0.001	< 0.001	3.7	
	Density	0.99	1.06	1.04	1.01	1.02	1.01	1.01	1.01	0.024	0.024	0.05	
Behavior	RTime, min/d	485	500	542	519	507	521	506	521	0.016	0.016	41	
	Drinking act, no./d	8.0	6.8	6.6	7.5	7.1	8.2	7.8	8.2	< 0.001	< 0.001	0.5	
	Activity, index/d	483	465	473	482	470	459	498	459	NS	NS	29	
	Body weight, kg	657	ND	ND	ND	655	ND	667	ND	NS	NS	15	
	DMI, kg/d	19.0	16.9	16.0	17.2	16.1	16.1	19.2	16.1	< 0.001	< 0.001	0.9	
	Eating, min/d	22.5	28.8	23.0	29.3	ND	ND	26.4	ND	NS	NS	13.4	
	Drinking, min/d	252	162	160	150	ND	ND	177	ND	0.001	0.001	48	
	Immobile standing, min/d	576	542	534	551	ND	ND	492	ND	NS	NS	102	
	Lying, min/d	438	576	586	586	ND	ND	517	ND	0.007	0.007	94	

Supplemental Table S1 (part 2/7). Exhaustive list of parameters analyzed during SARA challenge

Matrix	Parameters analyzed	Control ¹ (P1)					SARA ² (P2)				Recovery ¹ (P3)			P-value		Model	rsd
		Mean of wk 3,4					wk 6	wk 7	wk 8	wk 9	wk 10	wk 12	wk				
Blood	pH	7.40	7.34	ND	7.39	7.40	7.43	7.43	7.43	7.43	7.43	7.43	<0.001		0.02		
	pCO ₂ , mm Hg	54.8	50.6	ND	43.6	48.0	47.0	48.4	48.4	48.4	48.4	48.4	0.004		6.1		
	pO ₂ , mmHg	36.2	34.6	ND	45.9	37.3	39.3	36.2	36.2	36.2	36.2	36.2	<0.001		5.2		
	Bicarbonate, mmol/L	33.3	26.6	ND	25.6	29.2	30.6	31.2	31.2	31.2	31.2	31.2	<0.001		3.6		
	White blood cell, 10 ³ /mm ³	9.41	9.32	8.87	9.75	8.12	8.82	8.19	8.19	8.19	8.19	8.19	NS		1.39		
	Red blood cells 10 ⁶ /mm ³	6.35	6.44	6.31	5.90	6.07	6.33	6.46	6.46	6.46	6.46	6.46	<0.001		0.27		
	Platelet, /mL	324	336	335	324	276	319	308	308	308	308	308	NS		51		
	Hemoglobin, g/dL	10.3	10.1	10.3	9.6	10.1	10.3	10.3	10.3	10.3	10.3	10.3	0.001		0.4		
	Hematocrit, %	28.0	29.1	28.7	26.9	29.3	30.7	31.2	31.2	31.2	31.2	31.2	<0.001		1.3		
	Lymphocytes, 10 ³ /mm ³	1.73	1.55	1.83	1.61	1.34	1.52	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50	0.050		0.36		
	Monocytes, 10 ³ /mm ³	0.78	0.83	0.87	0.90	0.75	0.85	0.83	0.83	0.83	0.83	0.83	NS		0.12		
	Granulocytes, 10 ³ /mm ³	6.90	6.95	6.17	7.24	6.02	6.45	5.86	5.86	5.86	5.86	5.86	0.029		1.09		
	Eosinophils, 10 ³ /mm ³	0.87	0.82	0.58	0.93	0.62	0.54	0.62	0.62	0.62	0.62	0.62	0.001		0.25		
	Riboflavin, mg/L	6.55	8.16	7.91	8.44	7.38	7.64	6.85	6.85	6.85	6.85	6.85	0.05		1.5		
	Flavin-adenine-dinucleotide, mg/L	135	110	110	118	111	140.4	135.1	135.1	135.1	135.1	135.1	NS		26.3		
	Pyridoxal, mg/L	5.50	5.04	5.11	5.40	5.59	4.97	4.43	4.43	4.43	4.43	4.43	NS		1.35		
	Pyridoxal-5 phosphate, mg/L	78.4	75.1	75.4	75.2	79.6	77.4	65.4	65.4	65.4	65.4	65.4	NS		20.1		
	ALAT, IU/L	27.6	23.4	24.0	25.6	23.5	24.4	26.1	26.1	26.1	26.1	26.1	0.001		2.4		
	ASAT, IU/L	75	95	103	109	112	109	122	122	122	122	122	<0.001		19		
	GGT, IU/L*	27.8	28.7	29.6	32.7	32.7	36.2	35.5	35.5	35.5	35.5	35.5	<0.001		4.1		
ALP, IU/L*	138	145	169	185	181	180	155	155	155	155	155	<0.001		19			
NEFA, mmol/L*	0.21	0.33	0.21	0.19	0.20	0.36	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	NS		0.09			
BHB, mmol/L	0.43	0.24	0.23	0.31	0.33	0.40	0.42	0.42	0.42	0.42	0.42	<0.001		0.07			
Glucose, mmol/L	4.18	4.18	4.51	4.62	4.51	4.34	4.23	4.23	4.23	4.23	4.23	<0.001		0.22			
Urea, mmol/L	3.33	3.16	2.83	2.49	3.66	5.16	3.83	3.83	3.83	3.83	3.83	<0.001		0.66			
SAA, ng/mL*	1.26E+05	9.76E+04	3.62E+04	ND	ND	9.98E+04	1.03E+05	1.03E+05	1.03E+05	1.03E+05	1.03E+05	NS		3.53E+04			

Supplemental Table S1 (part 3/7). Exhaustive list of parameters analyzed during SARA challenge

Matrix	Parameters analyzed	Control ¹ (P1)			SARA ² (P2)			Recovery ¹ (P3)			P-value		Model
		Mean of wk 3,4	wk 6	wk 7	wk 8	wk 9	wk 10	wk 12	wk	rsd			
Blood	LBP, ng/mL*	1.08E+04	9.83E+03	5.16E+03	ND	ND	ND	ND	ND	6.55E+03	NS	NS	2.39E+03
	IL1b, µmol/mL*	247	196	ND	ND	224	229	2164	1893	220	NS	NS	82.6
	IL6, pmol/mL*	1572	1441	ND	ND	2097	2164	4.67	4.81	4.81	NS	<0.001	631
	Cholesterol, mmol/L	5.08	3.93	3.95	4.31	2.51	2.72	2.64	1.89	1.89	NS	NS	0.51
	Ca, mmol/mL	2.56	2.43	2.51	2.54	1.62	1.92	1.92	1.02	1.02	NS	NS	0.15
	P, mmol/mL	1.83	1.86	1.86	1.62	1.07	1.43	3.99	4.06	4.19	NS	NS	0.41
	Mg, mmol/mL	1.04	0.98	0.96	1.07	1.00	1.43	104.9	104.0	103.9	NS	NS	0.09
	Na, mmol/mL	142	142	142	142	143	143	3.75	3.40	3.40	NS	NS	1.29
	K, mmol/mL	4.13	4.09	4.05	3.97	3.99	4.06	86.0	91.1	89.1	NS	NS	0.310
	Cl, mmol/mL	103.0	104.8	102.9	106.2	104.9	104.0	3.54	3.40	3.40	<0.001	<0.001	2.3
	Ceruloplasmin, µmol/mL	3.35	3.55	3.45	3.60	86.0	36.0	35.4	35.4	35.4	NS	NS	0.34
	Total protein, g/L	86.9	85.8	85.4	88.6	86.0	86.0	55.1	53.7	53.7	<0.001	<0.001	2.7
	Albumin, g/L	36.0	34.1	34.3	35.4	34.4	36.0	1.62	1.62	1.62	0.0	0.0	1.4
	Globulin, g/L	50.9	51.7	51.2	53.2	51.6	55.1	1.99	1.99	1.62	NS	NS	3.0
	Bilirubin, g/L	1.99	2.31	1.56	1.63	1.62	0.41	0.41	0.25	0.25	NS	NS	0.64
	Hp, g/L*	0.35	0.40	0.18	0.38	0.59	0.41	36.4	37.0	37.0	NS	NS	0.35
	AOPP, µmol/L*	42.0	41.5	39.3	43.4	36.7	36.4	17.5	17.2	17.2	NS	NS	9.4
	ROMt, mg H ₂ O ₂ /100 mL	16.8	17.0	16.7	17.6	17.5	18.8	132	132	132	NS	NS	1.5
	FRAP, µmol/L	136	136	131	139	128	135	117.5	104.2	104.2	NS	NS	15
	Paraoxonase, IU/mL*	116.1	107.4	110.0	116.4	112.9	117.5	367	381	381	<0.001	<0.001	11.9
	GSH, nmol/mL	232	329	311	310	362	367	171	192	192	<0.001	<0.001	30
	GSSG, nmol/mL*	215	156	171	220	194	171	2.36	2.07	2.07	0.001	0.001	31.4
	GSH:GSSG, ratio	1.27	2.21	1.86	1.48	1.92	2.36	0.18	0.20	0.20	<0.001	<0.001	0.44
	MDA, µg/mL	0.21	0.16	0.17	0.17	0.16	0.18	0.20	0.20	0.20	0.02	0.02	0.04

Supplemental Table S1 (part 4/7). Exhaustive list of parameters analyzed during SARA challenge

Matrix	Parameters analyzed	Control ¹ (P1)				SARA ² (P2)				Recovery ¹ (P3)			P-value		rsd
		Mean of wk 3,4	wk 6	wk 7	wk 8	wk 9	wk 10	wk 12	wk	Model					
Milk	Yield, kg/d	27.18	25.84	25.68	25.86	25.36	24.90	24.58	0.001	1.28					
	Daily yield ratio (am:pm), %	0.70	0.73	0.72	0.71	0.74	0.74	0.74	<0.001	0.02					
	Lactoferrin, µg/mL*	122	188	141	166	166	176	160	<0.001	42.6					
	Fat, g/L	39.47	35.51	31.54	32.08	34.87	38.36	38.88	<0.001	4.19					
	Protein, g/L	32.77	34.47	33.88	33.93	34.98	34.87	33.45	<0.001	1.17					
	Fat:Protein ratio	1.21	1.02	0.92	0.94	0.99	1.10	1.16	<0.001	0.12					
	Lactose, g/L	52.7	52.3	52.8	52.8	52.3	51.9	51.9	NS	1.0					
	Somatic cell count, /mL*	8.15E+04	6.74E+05	1.49E+05	1.34E+05	4.43E+05	1.33E+05	2.52E+05	<0.001	4.80E+05					
	Urea, mmol/L	4.43	3.52	3.22	3.15	3.39	4.89	4.71	<0.001	0.35					
	Pyridoxal, mg/L	0.28	0.30	0.30	0.29	0.28	0.27	0.26	NS	0.02					
	Pyridoxamine, µg/L*	28.44	28.84	26.31	23.95	24.49	26.20	21.01	0.02	5.32					
	Riboflavin, mg/L	1.82	2.10	2.00	1.92	1.95	2.04	1.82	<0.001	0.18					
	Individual FA, g/100 g of total FA														
	<i>iso</i> 13,*	0.03	0.03	0.04	0.02	0.03	0.03	0.03	NS	0.02					
	C13*	0.90	0.84	0.97	0.98	0.90	0.72	0.84	NS	0.24					
	<i>iso</i> 14	0.10	0.08	0.07	0.06	0.07	0.08	0.09	<0.001	0.01					
	<i>iso</i> 15	0.24	0.19	0.17	0.16	0.17	0.25	0.24	<0.001	0.02					
	<i>anteiso</i> 15	15.1	17.3	39.5	41.7	35.0	10.3	12.2	<0.001	31.5					
	C15*	0.86	0.73	0.96	0.97	0.88	0.68	0.67	NS	0.28					
	C17	0.81	0.85	0.89	0.88	0.85	0.84	0.82	NS	0.09					
	<i>cis</i> -9 C17:1	0.27	0.40	0.37	0.34	0.35	0.35	0.29	<0.001	0.05					
	C18:1 Isomers*														
	<i>trans</i> -9	0.21	0.33	0.31	0.30	0.35	0.27	0.22	<0.001	0.06					
	<i>trans</i> -10	0.28	2.24	3.13	2.38	2.57	0.81	0.36	<0.001	1.33					
	<i>trans</i> -11	0.96	1.33	1.11	0.98	1.05	1.13	0.83	NS	0.26					
	<i>trans</i> -10: <i>trans</i> -11	0.30	1.57	2.66	2.25	2.28	0.71	0.66	<0.001	1.05					

Supplemental Table S1 (part 5/7). Exhaustive list of parameters analyzed during SARA challenge

Matrix	Parameters analyzed	Control ¹ (P1)				SARA ² (P2)				Recovery ¹ (P3)			P-value		Model	rsd
		Mean of wk 3,4				wk 6	wk 7	wk 8	wk 9	wk 10	wk 12	wk	NS			
Milk	<i>trans</i> -13	0.56	0.70	0.71	0.68	0.70	0.64	0.60	0.050	0.12						
	<i>trans</i> -(4,5,6,8,9,10,11,13,16) + <i>cis</i> -14	2.54	5.33	6.03	5.04	5.45	3.51	2.43	<0.001	1.63						
	<i>cis</i> -10	0.55	0.71	0.61	0.59	0.62	0.69	0.62	<0.001	0.08						
	<i>cis</i> -11	0.70	1.04	1.03	0.93	1.01	0.85	0.72	<0.001	0.13						
	<i>cis</i> -12	0.22	0.28	0.26	0.27	0.26	0.28	0.24	NS	0.05						
	<i>cis</i> -13	0.10	0.18	0.14	0.14	0.14	0.13	0.10	<0.001	0.02						
	<i>trans</i> -16 + <i>cis</i> -14	0.30	0.33	0.30	0.30	0.29	0.36	0.30	NS	0.05						
	<i>cis</i> -16 C18:1 + <i>cis</i> -9, <i>trans</i> -12 C18:2*	0.07	0.07	0.09	0.08	0.09	0.09	0.08	0.001	0.01						
	<i>trans</i> -11, <i>cis</i> -15 C18:2*	0.15	0.19	0.17	0.15	0.15	0.18	0.12	NS	0.04						
	<i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11 + <i>trans</i> -7, <i>cis</i> -9 + <i>trans</i> -8, <i>cis</i> -10 CLA*	0.44	0.65	0.61	0.52	0.59	0.55	0.43	<0.001	0.11						
	<i>trans</i> , <i>trans</i> mixture-10,12 and 9,11 and 8,10 CLA*	0.03	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.03	<0.001	0.01						
	SFA	69.5	61.6	64.0	66.9	65.0	63.9	67.9	<0.001	2.5						
	Paired SFA	65.4	57.6	59.6	62.5	60.9	60.0	64.0	<0.001	2.6						
	Odd SFA*	2.42	2.42	2.92	3.02	2.73	2.29	2.38	0.001	0.40						
	<i>Iso</i> SFA	0.69	0.58	0.49	0.36	0.36	0.51	0.47	<0.001	0.08						
	<i>anteiso</i> SFA	1.06	1.01	1.02	1.03	1.05	1.18	1.13	NS	0.14						
	MUFA	25.0	31.5	29.0	26.2	28.0	29.2	26.0	<0.001	2.1						
	<i>cis</i> MUFA	22.1	25.8	22.5	20.7	22.1	25.3	23.1	<0.001	1.8						
	<i>trans</i> MUFA*	2.58	5.38	6.08	5.09	5.50	3.56	2.62	<0.001	0.13						
	PUFA	3.87	4.88	4.81	4.76	4.82	4.70	4.05	<0.001	0.41						
	Omega-3 PUFA	0.84	0.79	0.72	0.73	0.71	0.87	0.84	<0.001	0.07						
	Omega-6 PUFA	2.00	2.69	2.65	2.78	2.75	2.53	2.15	<0.001	0.21						

Supplemental Table S1 (part 6/7). Exhaustive list of parameters analyzed during SARA challenge

Matrix	Parameters analyzed	Control ¹ (P1)					SARA ² (P2)				Recovery ¹ (P3)		P-value		Model	rsd	
		Mean of wk 3,4	wk 6	wk 7	wk 8	wk 9	wk 10	wk 12	wk	Model							
Urine	pH	8.19	7.72	7.93	8.11	8.02	8.02	7.99	< 0.001								0.15
Saliva	pH	9.04	8.59	8.64	8.60	8.59	8.52	8.45	< 0.001								0.14
	Glucose, mmol/L	0.16	0.01	0.03	0.13	0.03	0.01	0.09	NS								0.16
	Urea, mmol/L	4.04	2.69	2.52	2.95	3.26	3.90	3.06	< 0.001								0.65
	Ca, mmol/L*	0.91	0.42	ND	ND	0.46	ND	0.53	0.001								0.24
	P, mmol/L	5.07	10.18	ND	ND	7.66	ND	9.44	< 0.001								2.06
	Mg, mmol/L*	1.81	0.58	ND	ND	0.55	ND	0.70	< 0.001								0.30
	Na, mmol/L	101.4	136.3	ND	ND	123.2	ND	137.9	< 0.001								14.1
	K, mmol/L	21.9	12.4	ND	ND	17.2	ND	12.8	< 0.001								5.1
	Cl, mmol/L	31.5	33.9	ND	ND	33.8	ND	32.8	NS								2.9
	Zn, μmol/L*	1.74	1.12	ND	ND	2.46	ND	2.61	NS								2.2
	Ceruloplasmin, μmol/L	0.24	0.17	ND	ND	0.28	ND	0.32	NS								0.16
	Total protein, g/L	1.80	0.85	ND	ND	1.30	ND	1.18	0.024								0.69

Supplemental Table S1 (part 7/7). Exhaustive list of parameters analyzed during SARA challenge

Matrix	Parameters analyzed	Control ¹ (P1)			SARA ² (P2)			Recovery ¹ (P3)			P-value		Model
		Mean of wk 3,4	wk 6	wk 7	wk 8	wk 9	wk 10	wk 12	wk	Model			
Saliva	Albumin, g/L	0.26	0.32	ND	ND	0.33	ND	ND	0.39	0.009	0.08		
	Globulin, g/L	1.54	0.53	ND	ND	0.96	ND	ND	0.79	0.007	0.64		
	GGT, IU/L*	53.4	21.7	34.4	49.9	42.2	39.2	23.4	0.011	NS	25.9		
	Bilirubin, µmol/L	1.32	1.19	ND	ND	1.42	ND	2.29	NS	1.30			
	ALP, IU/L	15.3	7.4	21.0	13.1	14.0	11.3	6.1	NS	13.5			
	Hp, g/L*	0.30	0.17	ND	ND	0.39	ND	0.22	NS	0.18			
	NEFA, µmol/L*	0.03	0.07	0.08	0.04	0.06	0.06	0.09	NS	0.06			
	BHB, µmol/L	0.02	0.01	0.00	0.01	0.01	0.01	0.01	0.003	0.01			
	TG, µmol/L	0.16	0.03	ND	ND	0.12	ND	0.10	NS	0.15			
	Creatinine, µmol/L	35.38	31.51	ND	ND	36.37	ND	29.43	NS	9.91			
	FRAP, µmol/L	171	104	ND	ND	128	ND	176	0.033	63			

¹ Cows were fed with a low-starch diet (LSD) during the control and recovery periods: 32% concentrate + 68% forage, containing 13% starch.

² Cows were fed with a high-starch diet (HSD) during the SARA period: 54% concentrate + 46% forage, containing 35% starch.

8-week measurements were performed: 2 weeks in the control period (P1): wk3-P1, wk4-P1 which were averaged (3,4wk-P1), 4 weeks in SARA period (P2): wk6-P2, wk7 P2, wk8-P2, wk9-P2 and 2 weeks in the recovery period (P3): wk10-P3, wk12-P3.

* Statistical analysis was performed on transformed log data

ND = not determined.

RTime = rumination time, SAA = serum amyloid A, LBP = lipid-binding protein, IL = interleukin, GSH = glutathione reduced, GSSG = glutathione oxidized acid, MDA = malondialdehyde, ALAT = alanine aminotransferase, ASAT = aspartate aminotransferase, ALP = alkaline phosphatase, GGT = gamma-glutamyltransferase, FA= fatty acid, Hp = haptoglobin, NEFA = non-esterified fatty acids, TG = triglyceride, FRAP = ferric reducing ability of plasma, AOPP = advanced oxidation protein products, ROMt = reactive oxygen metabolites

136 parameters were analyzed and calculated from 5 different matrices: feces, blood, milk, urine and saliva and behavior analysis. 47 parameters were not significantly different among the weeks ($P > 0.1$) of measurement in comparison to P1.

Week data significantly different from P1 for each parameters are in bold characters.

2. Évaluation terrain des modèles multiparamétriques prédictifs de l'ARSA chez la vache laitière

PREDICTIVE CAPACITIES OF MULTI-PARAMETRIC MODELS TO DIAGNOSE

SUBACUTE RUMINAL ACIDOSIS IN DAIRY COWS ON FARM

C. Villot,^{*} †, ‡, § C. Martin,^{*} J. Bodin,[#] M. Silberberg^{*1}

^{*}Université Clermont Auvergne, INRA, VetAgro Sup, UMR Herbivores, F-63122 Saint-Genès-Champanelle, France

[†]Lallemand SAS, F-31702 Blagnac, France

[‡]Valorex, La Messayais, F-35210 Combourtille, France

[§]Terrena, La Noëlle, F-44150 Ancenis, France

[#]BR3 Consultants, F-69007 Lyon, France

¹Corresponding author: mathieu.silberberg@inra.fr

Current address: INRA, UMR1213 Herbivores, F-63122 Saint-Genès-Champanelle, France

En préparation pour Journal of Dairy Science

ÉVALUATION TERRAIN DES MODÈLES MULTIPARAMÉTRIQUES PRÉDICTIFS DE L'ARSA CHEZ LA VACHE LAITIÈRE

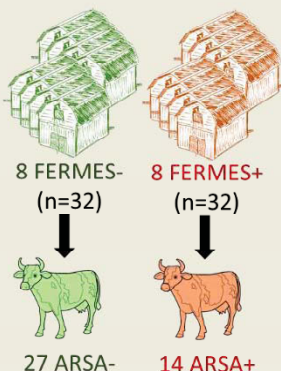
Objectifs :

- Évaluer la capacité de modèles de paramètres périphériques au rumen pour la prédiction de l'ARSA chez les vaches laitières primipares en ferme (étude 3)

Matériel & Méthodes :

Indicateurs de sélection

- Fermes :
- Ration
- Lait



	27 ARSA-		14 ARSA+		P-value
	Moyenne	SEM	Moyenne	SEM	
pH					
Amplitude, unité pH	0,66	0,02	0,92	0,03	< 0,001
Ecart type, unité pH	0,13	0,01	0,21	0,01	< 0,001
Temps passé sous NpH -0,3, min/j	13	3	131	15	< 0,001
Lait					
TB/TP	1,35	0,05	1,14	0,05	0,013
Urée, mmol/L	5,18	0,22	4,01	0,36	0,014
PL, kg/j	30,1	1,1	31,6	1,44	0,750
Jours de lactation	70	6	109	7	0,051

- Echantillonnage de 64 primipares équitablement réparties en 16 fermes dont 8 présentaient un faible risque d'ARSA (FERME-) et 8 autres un fort risque (FERME+)
- Evaluation au sein de chaque groupe des individus en ARSA (ARSA+) ou non (ARSA-) en fonction de leurs indicateurs NpH calculés à partir de cinétique pH (bolus intra-ruminal)
- Evaluation de 15 modèles prédictifs de l'ARSA à l'échelle individuelle

Résultats :

Modèle	Matrices et paramètres constituant les modèles						Capacité prédictives	
	Matrice	Paramètre	Matrice	Paramètre	Matrice	Paramètre	Se	Sp
12	Comportement	Nb de buvées	Feces	pH	Lait	Urée	57.1	86.4
16	Feces	pH	Lait	Urée			64.3	77.3
8	Sang	β -OH	Lait	Urée			69.2	66.7
5	Sang	HCO_3^-	Lait	Urée			78.6	42.9
18	Feces	pH	Lait	TB/TP			57.1	64.0
11	Lait	Urée,	Urine	pH			61.5	55.0
13	Lait	<i>trans-10:11</i> C18:1	Salive	Urée			71.4	44.4

- Difficultés d'échantillonner des animaux en ARSA (44% des animaux dans FERME+).
- Tous les modèles de l'étude 1 n'ont pas pu être évalués du fait de paramètres non mesurables en ferme (MSI et rumination)
- Sp et Se plus faibles que dans l'étude expérimentale (étude 1)
- Le modèle 5 (**concentration en HCO_3^- dans le sang et en urée dans le lait**) est le plus sensible même s'il implique une détection abusive de l'ARSA chez les animaux sains puisque présentant une faible spécificité (Sp = 42.9)

Conclusion :

- Certains modèles présentent une bonne sensibilité pour prédire l'ARSA sur le terrain mais avec l'inconvénient de détecter de nombreux faux positifs.
- Nécessité d'**améliorer la spécificité** des modèles en intégrant plus de paramètres à l'échelle individuelle ou de la ferme

CONTEXTE ET OBJECTIFS

Les études expérimentales (1 et 2) mises en place durant les 2 premières années de ma thèse ont permis i) d'améliorer les indicateurs de pH ruminiaux permettant d'objectiver l'ARSA, ainsi que ii) de développer des modèles multiparamétriques de paramètres périphériques au rumen permettant de prédire des situations d'ARSA induites. L'objectif de la présente étude (étude 3) est d'évaluer la qualité prédictive de ces modèles multiparamétriques pour diagnostiquer l'ARSA chez la vache laitière en production sur le terrain.

Afin d'identifier à la fois des animaux atteints ou non d'ARSA, des critères de risque ont été initialement utilisés à l'échelle de la ferme. Seize exploitations agricoles appartenant aux réseaux de fermes Valorex et Terrena (financeurs du projet) ont été identifiées pour réaliser l'étude de validation. Parmi elles, 8 fermes avaient un risque élevé de contenir des animaux en ARSA au sein du troupeau et 8 autres fermes ont été pressenties comme ayant de faibles risques de rencontrer des animaux en ARSA. Quatre primipares de chaque élevage ont ensuite été systématiquement utilisées pour participer à cet essai. Au total des analyses ont été effectuées sur 32 vaches (**FERME+**) issues de 8 élevages à fort risque d'ARSA et 32 vaches (**FERME-**) issues de 8 élevages à faible risque d'ARSA. Par la suite, les nouveaux indicateurs du pH ruminal identifiés dans l'étude 1 (Villot et al., 2017b) ont été évalués individuellement sur les animaux échantillonnés afin d'identifier uniquement les animaux présentant des instabilités au niveau de leur pH ruminal (**ARSA+**) dans les FERME+ et ceux n'en présentant pas (**ARSA-**) dans les FERME-. Les modèles développés dans l'étude 1 ont alors été testés sur les animaux confirmés comme appartenant aux groupes ARSA+ et ARSA-. Ce travail expérimental a été conduit de Février à Mars 2017 et l'analyse des résultats n'est pas finalisée. Seuls les principaux résultats disponibles à ce jour sont rapportés ici.

MATERIEL & METHODES

Echantillonnage des animaux participant à l'essai

Critères de risques utilisés pour identifier les FERME+ et les FERME-

Des fermes ont été pré identifiées par les techniciens d'élevage de Terrena et Valorex selon des critères de risque laitier et alimentaire couramment évalués lors d'ARSA (Figure 15). Les données des contrôles laitiers réalisés au maximum 1 mois en amont de l'essai ont permis d'obtenir des valeurs de TB /TP et de concentration en urée dans le lait à l'échelle du troupeau et individuelle. Des critères de rationnement tels que les pourcentages en concentrés, fourrages, NDF, NDF fourrages et en amidon ont également été évalués par les techniciens d'élevage. Le classement d'une ferme dans le groupe à risque élevé d'ARSA (FERME+) ou dans celui à risque faible (FERME-) a été effectué en fonction de seuils limites établis pour ces critères à l'échelle de la ferme. Les seuils limites transmis aux techniciens sont issus d'une part des données fournies par Sauvant et Peyraud (2010) pour les caractéristiques des rations. D'autre part, ceux utilisés pour le ratio TB/TP et concentration d'urée dans le lait sont issus des résultats de l'étude 1. Ces seuils limites sont présentés dans le Figure 15.

Echantillonnage des animaux

Quatre primipares dont le stade physiologique était au plus proche du pic de lactation (entre 20 à 60 jours de lactation) ont été sélectionnées dans chaque élevage. Finalement, l'échantillon pour cette étude était constitué de 64 animaux équitablement répartis entre les 2 groupes FERME+ et FERME-.

Enquête auprès des éleveurs, prélèvements et analyses.

Enquêtes auprès des éleveurs

Lors de notre venue dans les 16 élevages sélectionnés, nous avons enquêté auprès des éleveurs afin de caractériser précisément les élevages inclus dans l'étude. Ainsi, le questionnaire que nous avons élaboré a permis de recueillir de nombreuses informations sur le système et la conduite de l'alimentation des fermes sélectionnées, sur les heures de distribution, le mode de distribution des aliments, le type de rations ou encore sur le nombre de repas ou le nombre de repousses par jour de la ration. L'atelier végétal a également été décrit avec la segmentation du parcellaire, la proportion en maïs et en herbe ou encore le type de céréales produites sur l'exploitation.

Niveau de risque d'ARSA évalué à l'échelle de la ferme

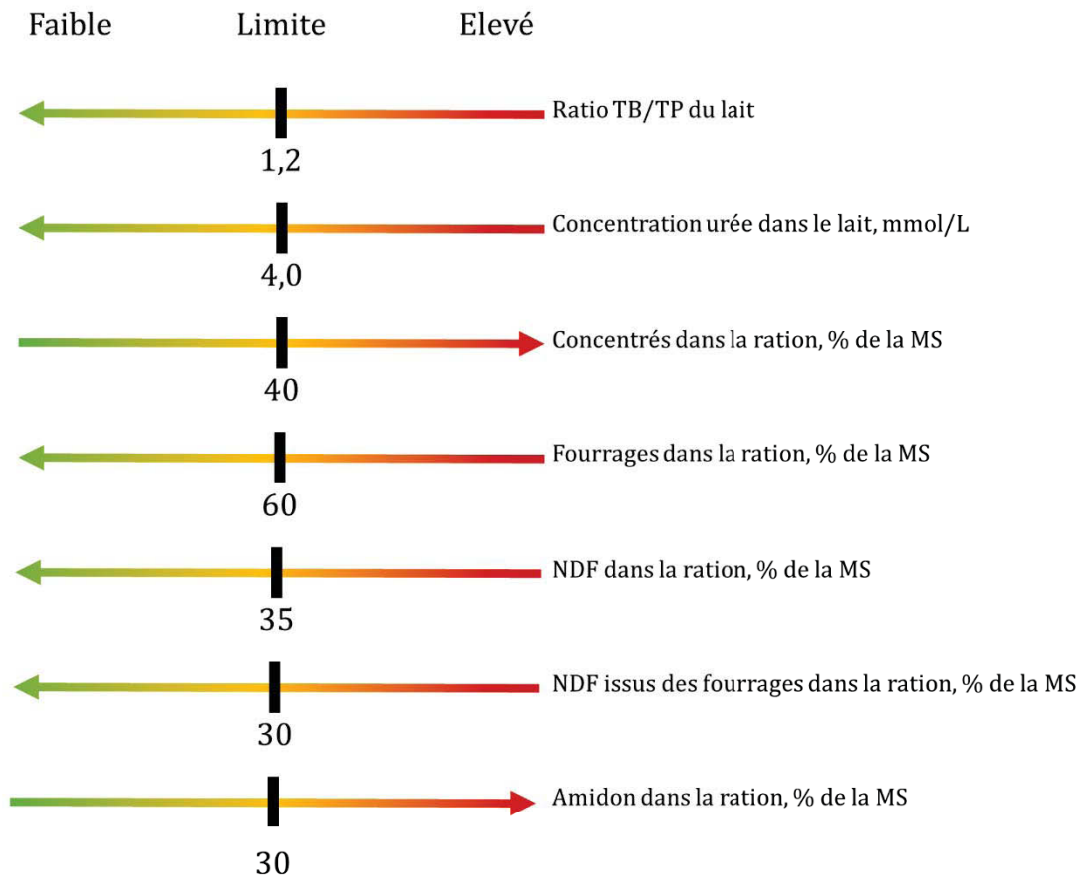


Figure 15 : Seuils de risque des critères laitiers et alimentaires (Sauvant et Peyraud 2010) utilisés pour catégoriser les fermes à risque (FERME+) ou non d'ARSA (FERME-)

TB : Taux Butyreux, TP : Taux Protéique, MS : Matière Sèche, NDF : Neutral Detergent Fiber

La santé des animaux à l'échelle du troupeau a été appréhendée et un recueil sanitaire des 6 derniers mois sur les 4 vaches de l'étude a été effectué. Par ailleurs, et pour appuyer les résultats collectés en amont par les techniciens sur les caractéristiques alimentaires, une vérification de la composition des rations a été effectuée dans chaque ferme. Les valeurs alimentaires théoriques des rations ont été calculées selon les tables INRA (INRA, 2010) en se basant sur les informations collectées via les étiquettes des produits commerciaux distribués et les résultats d'analyses chimiques disponibles de certains aliments. Un échantillon homogène de chaque ration mélangée a également été collecté et est actuellement en cours d'analyse chimique.

Prélèvements et Analyses

Soixante-quatre animaux issus des 16 fermes ont été échantillonnés sur une période de 15 jours à raison de 2 fermes par jour avec chacune 4 animaux utilisés pour notre étude. Des échantillons des différents compartiments ont tous été prélevés entre 2 et 4 heures après la distribution de la ration du matin excepté pour le lait.

Lait. Un échantillon de lait homogène au cours de la traite a été récupéré pour chaque animal. Un flacon de 10mL a été préparé en prévision des dosages des AG individuel suivant la méthode décrite par Ferlay et al. (2010). Un autre échantillon de 10mL a, quant à lui, été conditionné avec du potassium dichromate et conservé à 4°C jusqu'à analyse par le contrôle laitier dans les 48h suivant le prélèvement. Les dosages de protéines, matières grasses, urée et des cellules somatiques ont été effectués en spectrophotométrie infra-rouge par le laboratoire MyLab (Chateaugiron, France). Enfin, la production laitière journalière des animaux nous a été communiquée par l'éleveur.

Fèces. Les échantillons de fèces ont été obtenus par défécation volontaire ou par fouille rectale. Les fèces étaient récoltées, avant qu'elles ne touchent le sol, dans des pots de 500 ml. Le pH a été mesuré, immédiatement après le prélèvement à l'aide d'un pH-mètre portatif. Issu du contenant initial, 400 ml, soit 450 g, ont été prélevés pour effectuer un tamisage des fèces selon 2 grilles de 5 et 2 mm de diamètres comme décrit par (Villot et al., 2017b) et ainsi obtenir le poids de chaque fraction du tamis.

Urine. Les échantillons d'urine ont été obtenus par miction volontaire dans des pots de 500 ml. Le pH a été mesuré, immédiatement après le prélèvement.

Sang. Quatre tubes de sang ont été prélevés par ponction à la veine jugulaire. Des analyses de gaz du sang ont été effectuées dans la demi-heure suivant le prélèvement selon la méthode décrite dans Villot et al. (2017b) et un tube contenant de l'acide éthylène diamine tétra-acétique (**EDTA**) a été envoyé au laboratoire (Labocea, Fougères) afin de réaliser les numérations de formules sanguines. Deux tubes EDTA et lithium héparine (**LH**) ont été centrifugés à 3 400 g pendant 15min, avant d'aliqoter les surnageants puis de les congeler à -20°C. Par la suite le cholestérol, glucose, β -OH ont été analysés selon Villot et al. (2017b).

Salive. Les échantillons de salive ont été prélevés grâce à une pince à clamer munie de compresses. Cette pince a été introduite dans la cavité buccale, entre les gencives et la joue de l'animal, pour récolter de la salive. Ces compresses ont été centrifugées à 2 500 tours pendant 2 min dans des cônes de pipettes de 5 ml posés sur des tubes en plastique de 10 ml assurant une configuration entonnoir pour recueillir de la salive. Le pH salivaire a été mesuré, immédiatement après la centrifugation.

Bolus ruminiaux. Le jour des prélèvements, chaque animal a été équipé d'un bolus reticulo-ruminal (eCow, Exeter, UK) selon la méthodologie et les caractéristiques décrites par le fabricant. Des données ont été téléchargées sur une durée de 90 jours à raison de 4 fois par animal, soit tous les 20 jours environ. Les cinétiques de pH récoltées ont ensuite été analysées sur une période de 20 jours consécutifs à la pose du bolus et commune à chaque ferme. Les indicateurs journaliers NpH et absolus ont alors été calculés sur cette période (Villot et al., 2017b). Finalement, l'amplitude, l'écart type journalier ainsi que le temps passé sous pH relatif de -0,3 unités pH ont été les indicateurs retenus pour évaluer le risque d'ARSA chez les 64 animaux.

Traitement statistiques

1) La première étape du traitement statistique a été de caractériser les niveaux de risque des élevages sélectionnés pour le groupe FERME+ et FERME- en utilisant les critères de risque récoltés en amont de l'étude. D'autres paramètres mesurés à l'échelle de la ferme, lors de la visite sur le terrain, ont également été intégrés à l'analyse. Un test de Wilcoxon Mann Whitney (test non paramétrique) a été mis en œuvre afin de détecter les différences significatives ($P < 0,05$) pour chaque paramètre étudié entre les 2 groupes de fermes.

2) Une validation des animaux de chaque ferme atteint ou non d'ARSA (ARSA+ et ARSA-), a ensuite été réalisée en fonction de 3 indicateurs NpH établis par Villot et al. (2017a). Ils ont été calculés individuellement et quotidiennement puis moyennés sur une période de 20 jours d'analyse. Le classement d'un animal en ARSA+ était confirmé lorsque son indicateur « temps passé sous NpH -0.3 » était supérieur à la valeur seuil de 50 min/jour et quand au moins un des deux indicateurs (amplitude et/ou écart type) était supérieur à sa valeur seuil (valeur seuil de l'amplitude journalière du pH : 0,8 ; valeur seuil pour l'écart type journalier : 0,20) (Villot et al., 2017a). A l'inverse, le classement d'un animal en ARSA- était confirmé dans ce groupe lorsque son indicateur « temps passé sous NpH -0.3 » était inférieur à la valeur seuil et quand au moins un des deux indicateurs (amplitude et/ou écart type) était inférieur à sa valeur seuil.

3) A l'issue de cette sélection des individus, deux groupes comportant respectivement 14 animaux (ARSA+) et 27 animaux (ARSA-) ont été utilisés pour poursuivre l'analyse statistique. Un modèle mixte à 2 facteurs a été utilisé en incluant l'ARSA en effet fixe et la FERME en effet aléatoire afin de comparer les valeurs entre les 2 groupes de chaque paramètre mesuré. Son équation se présente sous la forme : $Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + B_{j(i)} + \varepsilon_{ijk}$

avec α_i = effet du facteur ARSA, $i = 1$ ou 2 (ARSA+ ou ARSA-), $B_{j(i)}$ = effet aléatoire du facteur FERME imbriqué dans le facteur ARSA, il représente un échantillon j fermes prélevées dans la population totale des fermes. Les effets des $B_{j(i)}$ suivent une loi normale centrée de même variance $B_{j(i)} \hookrightarrow N(0, \sigma_B^2)$. k = indice de la vache et ε_{ijk} = résidus (individuels) du modèle.

4) Enfin les modèles établis à l'issue de l'étude 1 ont été testés sur les animaux ARSA+ et ARSA-. La probabilité pour un animal d'être en ARSA a été calculée de façon individuelle, puis la capacité prédictive de l'ARSA a ensuite été évaluée en calculant la sensibilité (Se) et la spécificité (Sp) de chaque modèle comme décrit dans Villot et al. (2017b). Au total, 15 modèles (Tableau 11) ont pu être testés sur les 20 disponibles en raison du manque d'informations sur certains paramètres. La MSI n'a par exemple pas pu être mesurée dans cette étude terrain. Les coefficients normalisés des modèles créés ont été utilisés afin de les appliquer à nos nouveaux jeux de données. L'équation des modèles est du type :

$$\text{Prob}(\text{ARSA+} \mid X_i) = \exp(\text{cste} + a_i X_i) / (1 + \exp(\text{cste} + a_i X_i))$$

Tableau 11: 15/20 modèles de prédiction de l'ARSA calculés avec des coefficients normalisés

N°	Compartment	Paramètre a1	Variables des modèles			Coefficients normalisés					
			Matrice	Paramètre a2	Matrice	Paramètre a3	Constante	X1	X2	X3	
2	Lait	Urée, mmol/L	Salive	pH				28.52	-107	-59.7	
3	Sang	Cholestérol, mmol/L	Lait	AGPI w6, % AG				111.64	-292	445.4	
5	Sang	HCO ₃ ⁻ , mmol/L	Lait	Urée, mmol/L				10.86	-53.3	-36.5	
6	Sang	HCO ₃ ⁻ , mmol/L	Lait	TB/TP				-106.06	-198	-146	
8	Sang	β-OH, mmol/L	Lait	Urée, mmol/L				-2.96	-63.9	-111	
10	Sang	β-OH, mmol/L	Sang	Glucose, mmol/L	Urine	pH		37.61	-99.5	44.2	-63.2
11	Lait	Urée, mmol/L	Urine	pH				18.63	-291	-80.2	
12	Comportement	Nb de buvées, /j	Fèces	pH	Lait	Urée, mmol/L		-24.46	-16.9	-52.1	-50.8
13	Lait	trans-10:11 C18:1, %AG	Salive	Urée, mmol/L				52.23	224.1	-59.1	
14	Comportement	Nombre de buvées, /j	Fèces	pH	Lait	AGS, %AG		2.51	-16	-51	-28.4
15	Fèces	pH	Sang	β-OH, mmol/L				18.06	-139	-101	
16	Fèces	pH	Lait	Urée, mmol/L				-25.87	-88.3	-72.7	
17	Fèces	pH	Lait	trans-10:11 C18:1, %AG				-9.27	-84.6	40.49	
18	Fèces	pH	Lait	TB/TP				-8.08	-102	-38.7	
20	Fèces	Tamis fèces (5+2 mm), % résidus total	Urine	pH				53.18	66.31	-265	

AGS : Acide Gras Saturé, β-OH : Béta HydrOxybutyrate, HCO₃⁻ : Bicarbonate, TB : Taux Butyreux, TP : Taux Protéique

Prob(ARSA+ | Xi) = exp(cste + ai Xi) / (1 + exp(cste + ai Xi))

D'après (Villot *et al.*, 2017b)

Tableau 12 : Critères de risques de l'ARSA évalués en amont de l'étude selon les caractéristiques des rations et des paramètres laitiers des 16 fermes étudiées et répartis en 2 groupes FERME+ et FERME-

Critères	FERME-		FERME+		P-value*
	Moyenne	SEM	Moyenne	SEM	
Ration, %MS					
Concentrés	23,9	1,3	30,0	1,2	0,001
Fourrages	74,5	1,2	69,2	1,5	0,001
NDF Totaux	37,7	1,0	37,5	0,5	0,536
NDF Fourrages	32,6	1,0	30,6	0,7	0,189
Amidon	21,7	1,1	23,8	1,07	0,779
Sucres	6,10	0,21	7,10	0,24	0,076
GRF	28,8	1,1	30,6	1,2	0,694
Nombre de repas, /jour	1,3	0,3	1,3	0,2	0,999
Nombre de repousse de repas,/jour	5,3	0,5	2,4	0,4	< 0,001
Lait (ferme) ¹					
TB/TP	1,30	0,05	1,04	0,06	< 0,001
Urée, mmol/L	5,01	0,23	3,92	0,24	0,001
Lait (animaux échantillonnés) ²					
TB/TP	1,35	0,05	1,17	0,03	< 0,001
Urée, mmol/L	5,11	1,12	4,30	1,01	0,001

SEM : Somme des Ecart Moyen, GRF : Glucide Rapidement Fermentescible, TB : Taux Butyreux, TP : Taux Protéique, NDF : Neutral Detergent Fiber

*Test de Wilcoxon Mann Whitney (test non paramétrique) mis en œuvre afin de détecter les différences significatives entre le groupe FERME+ et FERME-.

¹ Données calculées à partir du lait tank des 16 fermes qui sont issues des mesures effectuées par le contrôle laitier au maximum 1 mois avant l'essai.

² Données calculées uniquement sur le lait individuel des 64 animaux échantillonnés pendant l'essai mais issues des mesures effectuées par le contrôle laitier au maximum 1 mois avant l'essai.

RESULTATS

Description générale des fermes réparties dans les 2 groupes FERME+ et FERME-

Les données concernant les critères alimentaires et les critères laitiers des 16 fermes sont recensées dans le Tableau 12. Aucune valeur de critère alimentaire ne dépasse le seuil de risque élevé d'ARSA proposé sur la Figure 15. Néanmoins ces valeurs présentent un risque plus élevé d'induire de l'ARSA au sein des FERME+. Le pourcentage en concentrés dans la ration était significativement ($P < 0,05$) plus important dans le groupe FERME+ par rapport au groupe FERME-. Une tendance est observée pour le pourcentage de sucres qui semble plus élevé dans le groupe FERME+ comparé au groupe FERME- ($P < 0,1$). Les autres critères alimentaires ne varient pas significativement entre les 2 groupes. Concernant les modalités de distribution des rations, il a été montré que le nombre de repousses du fourrage par jour, discrimine significativement le groupe FERME+ du groupe FERME- ($2,4 \pm 0,4$ vs $5,3 \pm 0,5$ respectivement) alors que le nombre de repas par jour n'est pas différent entre les 2 groupes ($1,3 \pm 0,3$ vs $1,3 \pm 0,2$ respectivement). Concernant les critères laitiers obtenus sur du lait de tank le mois précédant l'étude, le ratio TB/TP était significativement plus faible dans les FERME+ par rapport aux FERME- (respectivement $1,04 \pm 0,06$ vs $1,30 \pm 0,05$). La concentration en urée dans le lait était elle aussi significativement plus faible dans le groupe FERME+ par rapport au groupe FERME- (respectivement $3,92 \pm 0,24$ vs $5,01 \pm 0,23$ mmol/L). Ce classement des fermes a été confirmé par l'analyse des laits individuels ($n=64$) des animaux échantillonnés en amont de l'essai (Tableau 12).

Animaux sélectionnés en ARSA+ et ARSA-

Le Tableau 13 recense les 3 indicateurs NpH qui ont permis de confirmer l'appartenance ou non à leur groupe ARSA+ ou ARSA-. Sur les 64 bolus placés dans les animaux, un seul bolus placé dans une vache ARSA- n'a pas pu être détecté durant toute la durée de l'étude. Au total 27/32 animaux initialement choisis dans des FERME- ont été classés dans le groupe ARSA- à l'échelle individuelle et 14/32 animaux initialement choisis dans des FERME+ ont été classés dans le groupe ARSA+ à l'échelle individuelle (Tableau 13). Les vaches différemment classées avec le NpH ruminal et le niveau de risque d'ARSA de la ferme ont été supprimées du jeu de données pour tester le potentiel prédictif des modèles multiparamétriques ($n = 23$ dont 19 en FERME+ et 4 en FERME- dont 1 donnée manquante sur 1 animal).

Tableau 13 : Classements des animaux dans les groupes ARSA+ ou ARSA- en fonction du niveau de risque de leur ferme et de leurs indicateurs NpH journaliers individuels

			Indicateurs NpH ruminal journalier			Classement			Indicateurs NpH ruminal journalier		
Vache	FERME ¹	ARSA ²	Amplitude	Ecart type	Temps passé sous NpH-0,3 (min/j)	Vache	FERME ¹	ARSA ²	Amplitude	Ecart type	Temps passé sous NpH-0,3 (min/j)
A1	-	-	0,76	0,14	3	C1	+	+	0,85	0,21	62
A2	-	-	0,66	0,14	0	C2	+	+	0,84	0,22	90
A3	-	-	0,60	0,11	0	C3	+	NV	0,63	0,16	0
A4	-	-	0,78	0,16	33	C4	+	NV	0,70	0,15	157
B1	-	-	0,57	0,11	0	D1	+	+	0,87	0,18	104
B2	-	-	0,66	0,12	0	D2	+	NV	0,72	0,16	61
B3	-	-	0,60	0,11	0	D3	+	NV	0,81	0,15	27
B4	-	-	0,67	0,16	32	D4	+	NV	0,79	0,16	52
F1	-	-	0,78	0,17	61	E1	+	+	0,95	0,24	234
F2	-	-	0,56	0,11	3	E2	+	+	0,96	0,22	180
F3	-	-	0,60	0,11	37	E3	+	+	0,82	0,20	108
F4	-	-	0,61	0,11	10	E4	+	+	1,04	0,26	209
G1	-	-	0,77	0,16	0	H1	+	+	1,09	0,24	189
G2	-	-	0,62	0,13	0	H2	+	+	0,80	0,18	88
G3	-	-	0,79	0,17	48	H3	+	NV	0,86	0,16	39
G4	-	-	0,65	0,12	0	H4	+	NV	0,78	0,19	90
I1	-	-	0,66	0,10	9	J1	+	NV	0,60	0,14	7
I2	-	NV	0,96	0,17	110	J2	+	+	0,84	0,21	79
I3	-	-	0,58	0,08	0	J3	+	NV	0,76	0,19	79
I4	-	NV	0,90	0,19	250	J4	+	NV	0,57	0,12	5
L1	-	-	0,57	0,12	0	K1	+	NV	0,80	0,17	33
L2	-	-	0,72	0,16	53	K2	+	NV	0,86	0,16	39
L3	-	ND	ND	ND	ND	K3	+	+	0,95	0,21	169
L4	-	-	0,57	0,12	0	K4	+	NV	0,77	0,17	59
O1	-	-	0,73	0,15	21	M1	+	+	1,11	0,22	150
O2	-	-	0,68	0,17	8	M2	+	NV	0,84	0,16	21
O3	-	NV	0,88	0,25	147	M3	+	NV	0,63	0,13	3
O4	-	-	0,81	0,16	13	M4	+	+	0,88	0,18	60
P1	-	-	0,55	0,10	0	N1	+	NV	0,62	0,14	11
P2	-	-	0,50	0,10	4	N2	+	NV	0,64	0,12	32
P3	-	NV	0,91	0,18	170	N3	+	NV	0,81	0,15	33
P4	-	-	0,66	0,13	7	N4	+	+	0,89	0,19	114

ND : Non Déterminé, NV : Animaux Non Validés

¹ Classement des animaux dans les groupes FERME+ et FERME- selon le niveau de risque pré-identifiés dans chaque ferme avec les critères de risque évalués en amont de l'essai.

² Animaux retenus pour l'étude. Un animal était conservé pour l'étude si et seulement si ses valeurs pour les indicateurs temps passé sous pH relatif de -0,3 et amplitude journalière ou écart type journalier du pH confirmaient sa condition initiale d'appartenance à un fort ou faible risque d'ARSA à l'échelle de la ferme. Les seuils de risque ARSA+ utilisés sont : amplitude journalière du pH > 0,8, écart type journalier > 0,20 et temps passé > 50 min/j sous pH relatif de -0,3 (Villot *et al.*, 2017a). Au final, 27 animaux en ARSA- et 14 en ARSA+ ont été utilisés pour évaluer les capacités prédictives des modèles multiparamétriques développés pour la détection de l'ARSA.

Finalement, les 2 groupes ARSA+ (n=14) et ARSA- (n=27) présentaient respectivement des critères laitiers évalués pendant l'essai avec des niveaux de risques élevés et faibles face à l'ARSA. La production laitière moyenne et le nombre de jours de lactation entre les 2 lots n'étaient pas statistiquement différents ($P > 0,05$) (Tableau 14).

Evaluation des modèles prédictifs sur les animaux ARSA+ et ARSA-

Le Tableau 15 recense les capacités prédictives de chaque modèle multiparamétrique pour la détection de l'ARSA qui ont été testées avec les données issues de l'étude en ferme commerciale. Dans ce tableau, les modèles ont été classés par ordre décroissant de leurs valeurs combinées de sensibilité et spécificité. Dans nos conditions expérimentales, le modèle n°12 combinant le nombre de buvées par jour, la concentration en urée dans le lait et le pH fécal, présente la meilleure combinaison pour prédire l'ARSA (Se = 57,1% et Sp = 86,4%) chez la vache laitière. Ce dernier obtient également la meilleure valeur de spécificité pour le diagnostic de l'ARSA. Le modèle ayant quant à lui la meilleure capacité à prédire des animaux atteints d'ARSA (Se = 78,6%) au détriment d'une spécificité plus faible (Sp = 42,9%) est le modèle n°5 qui combine les concentrations en HCO_3^- dans le sang et en urée dans le lait.

DISCUSSION

Le but de cet essai était d'évaluer sur le terrain les modèles multiparamétriques développés dans l'étude 1 sur des vaches laitières en situation d'acidose provoquée. Un prérequis au bon déroulement de cette évaluation réside dans l'identification objective d'animaux atteints ou non d'ARSA. Une première sélection, basée sur des facteurs de risques d'ARSA à l'échelle de la ferme, nous a conduits à sélectionner 8 fermes à fort risque d'ARSA (FERME+) et 8 fermes à faible risque (FERME-). Les indicateurs individuels de pH ruminal, mesurés en cinétique sur les 4 animaux échantillonnés au sein de chaque ferme ont permis de confirmer l'état individuel de chaque animal face à l'ARSA. Les capacités prédictives des modèles ont alors été testées sur des animaux d'élevages présentant ou non des conditions d'ARSA (27 animaux en ARSA- et 14 animaux en ARSA+).

Tableau 14: Critères des animaux en ARSA+ et ARSA- mesurés individuellement sur les 41 animaux utilisés pour tester les modèles multiparamétriques de prédiction de l'ARSA

Critères	Animaux	ARSA-		ARSA+		P-value*
		Moyenne	SEM	Moyenne	SEM	
Nombre d'animaux		27		14		
pH						
Amplitude, unité pH		0,66	0,02	0,92	0,03	< 0,01
Ecart type, unité pH		0,13	0,01	0,21	0,01	< 0,01
Temps passé sous NpH -0,3, min/j		13	3	131	15	< 0,01
Lait						
TB/TP		1,35	0,05	1,14	0,05	0,013
Urée, mmol/L		5,18	0,22	4,01	0,36	0,014
PL, kg/j		30,1	1,1	31,6	1,44	0,750
Jours de lactation		70	6	109	7	0,051

TB : Taux Butyreux, TP : Taux Protéique, PL : Production Laitière, ARSA : Acidose Ruminale SubAiguë

*Modèle mixte à 2 facteurs : ARSA et ferme en aléatoires

Tableau 15 : Capacités prédictives des différents modèles estimés par leur probabilité à prédire l'ARSA sur le terrain

N°	Variables des modèles						Capacité prédictive des modèles	
	Matrice	Paramètre a1	Matrice	Paramètre a2	Matrice	Paramètre a3	Sensibilité	Spécificité
12	Comportement	Nombre de buvées, /j	Fèces	pH	Lait	Urée, mmol/L	57.1	86.4
16	Fèces	pH	Lait	Urée, mmol/L			64.3	77.3
8	Sang	β -OH	Lait	Urée, mmol/L			69.2	66.7
5	Sang	Bicarbonate	Lait	Urée, mmol/L			78.6	42.9
18	Fèces	pH	Lait	TB/TP			57.1	64
11	Lait	Urée, mmol/L	Urine	pH			61.5	55
13	Lait	<i>trans-10:11</i> C18:1, g/100g AG	Salive	Urée, mmol/L			71.4	44.4
15	Fèces	pH	Sang	β -OH, mmol/L			61.5	52.2
2	Lait	Urée, mmol/L	Salive	pH			78.6	35
6	Sang	HCO ₃ ⁻ , mmol/L	Lait	TB/TP			50	62.5
10	Sang	β -OH, mmol/L	Sang	Glucose, mmol/L	Urine	pH	75	36.4
17	Fèces	pH	Lait	<i>trans-10:11</i> C18:1, g/100g AG			50	59.3
3	Sang	Cholestérol, mmol/L	Lait	AGPI w6, g/100g AG			60	44
14	Comportement	Nombre de buvées, /j	Fèces	pH	Lait	AG saturés, g/100g AG	57.1	44.4
20	Fèces	Tamis bouse (5+2 mm), % résidus total	Urine	pH			50	47.8

Évaluation des modèles effectuée sur 42 animaux : groupes ARSA+ (n=14) et groupe ARSA- (n=27), 1 donnée manquante.

AGS : Acide Gras Saturé, β -OH : Béta HydrOxybutyrate, HCO₃⁻ : Bicarbonate, TB : Taux Butyreux, TP : Taux Protéique

Sélection des fermes

Des critères de risques concernant la ration et le lait à l'échelle du troupeau ont été utilisés pour identifier les fermes dans lesquelles des animaux ont été échantillonnés. Le ratio TB/TP et la concentration en urée évaluée dans le lait de tank présentaient un risque d'ARSA significativement plus élevé dans les FERME+ par rapport aux FERME-. La même conclusion a été obtenue à partir des laits individuels des 64 animaux collectés en amont de l'essai. Ainsi, les indicateurs laitiers évalués à l'échelle du troupeau reflétaient ceux des animaux échantillonnés en individuel et s'avèrent donc être de bons critères à considérer, soit à l'échelle de l'individu, soit à l'échelle du troupeau pour évaluer ce critère de risque. Concernant la ration, le groupe FERME- s'inscrivait bien dans des seuils de risques faibles vis-à-vis des recommandations précédemment instaurées (Sauvant et Peyraud, 2010). En revanche, les rations des FERME+ présentaient peu de risques à l'ARSA selon ces mêmes recommandations. Ces résultats mettent en évidence nos difficultés à trouver des fermes avec de forts risques d'ARSA dans les élevages laitiers mis à notre disposition pour cette étude. Les systèmes d'unités d'alimentation rénovés (Systali) (Nozière et al., 2016) permettent d'ajuster de façon très précise les besoins des animaux. Ajouté au fait que les éleveurs de cet essai étaient techniquement bien accompagnés et donc sensibilisés à l'importance d'une bonne gestion du poste alimentation dans leur élevage, il semblerait alors que des pratiques alimentaires à risques soient de plus en plus difficiles à trouver dans les élevages affiliés aux réseaux de nos financeurs. Malgré tout et de manière générale, le niveau de risque d'ARSA lié aux caractéristiques de la ration était toujours plus élevé pour le groupe FERME+ par rapport au groupe FERME-. Les pourcentages de concentrés et des sucres dans la ration étaient significativement plus élevés dans le groupe FERME+. D'autres caractéristiques non chimiques de la ration sembleraient importantes à prendre en compte comme par exemple la répartition des repas sur la journée ou encore la taille des particules alimentaires. En effet, lorsqu'on intègre à posteriori ces paramètres dans l'évaluation du risque d'ARSA sur le terrain, nos 2 groupes FERME+ et FERME- sont bien discriminés. A l'avenir, nous proposons donc que ces paramètres de rationnement (taille particules, fréquence d'alimentation) soient investigués dans le diagnostic des fermes à risque d'ARSA.

Si certains paramètres alimentaires et laitiers ont permis de discriminer nos élevages à fort et faible risques d'ARSA, il apparaît néanmoins nécessaire de confirmer à l'échelle individuelle l'état d'ARSA chez les animaux sélectionnés afin d'évaluer la capacité prédictive de nos modèles multiparamétriques.

Sélection des animaux dans les groupes ARSA+ et ARSA -

Un point fort de ce travail de thèse a été de proposer des seuils de risque de l'ARSA basés sur nouveaux indicateurs de pH ruminiaux (études 1 et 2). Ainsi il est possible d'évaluer le niveau de risque individuel des animaux de la présente étude en fonction des indicateurs relatifs NpH préétablis. Trois indicateurs journaliers informatifs des variations (amplitude et écart type) et des chutes du pH ruminal (temps passé sous NpH -0,3) ont permis de caractériser objectivement l'état d'ARSA des animaux de cet essai terrain. Dans ce contexte, nous nous sommes appuyés sur ces indicateurs pour identifier les animaux ARSA+ et ARSA- respectivement dans les FERME+ et FERME-. Pour ce faire, nous avons confirmé le classement d'un animal en ARSA+ lorsque son indicateur « temps passé sous NpH -0.3 » était supérieur à la valeur seuil de 50 min/jour et quand au moins un des deux indicateurs (amplitude et / ou écart type) traduisant les variations de pH journalier était supérieur à sa valeur seuil (0,8 et 0,2 unité pH respectivement). Ainsi, l'analyse des indicateurs NpH montre qu'un nombre plus important d'animaux en ARSA- a été détecté dans le groupe FERME- par rapport au nombre d'animaux détecté en ARSA+ dans le groupe FERME+. En effet les indicateurs NpH permettent de confirmer 84% des animaux en ARSA- contre 44% des animaux en ARSA+. Comme pressenti avec les faibles niveaux de risques d'ARSA recensés sur les caractéristiques des rations dans les FERME+ de cet essai terrain, il est confirmé avec les données pH que certains animaux provenant de ces fermes ne présentaient pas d'altérations de leur pH ruminal durant les 20 jours d'analyse. Le niveau de risque d'ARSA était alors certainement trop faible au sein des FERME+ pour garantir l'étude de 100% d'animaux atteints de la maladie même en sélectionnant les plus à risque (primipares pic de lactation). Toutefois il s'est également avéré compliqué de sélectionner uniquement des primipares autour du pic de lactation (période où le risque d'ARSA est maximal) du fait du nombre restreint d'animaux primipares à ce stade physiologique dans les fermes. Ainsi les primipares sélectionnées dans les 2 groupes étaient en moyenne à 20 jours après le pic de lactation soit dans une période où le risque n'est pas maximal mais toujours très présent (Martin et al., 2006).

Les facteurs de risque évalués à l'échelle de la ferme n'ont pas suffi à garantir l'identification de 32 animaux en ARSA. L'analyse individuelle des indicateurs NpH nous a permis d'objectiver les conditions du pH ruminal de chaque animal. Ainsi la qualité prédictive des modèles a été évaluée sur des individus dont le classement dans les groupes à risque ou non d'acidose était conforté par les indicateurs NpH.

Des combinaisons de paramètres périphériques au rumen pour objectiver l'ARSA

Une de nos hypothèses de travail résidait dans le fait qu'une combinaison de paramètres périphériques au rumen pourrait contribuer à améliorer le diagnostic de l'ARSA sur le terrain. Les modèles développés ont montré de meilleures capacités prédictives de l'ARSA en condition expérimentale contrôlée (étude 1) que sur le terrain (étude 3). Ceci peut s'expliquer par le fait que les modèles ont été développés et testés (validation interne) avec des données en partie confondues puisque toutes issues de l'étude longitudinale où l'ARSA a été induite sur les mêmes animaux. Même si des données répétées ont été moyennées à l'échelle des 2 premières périodes de l'étude 1 (contrôle, ARSA) pour construire les modèles, l'évaluation de leur capacité prédictive a ensuite été effectuée sur des données à l'échelle de la semaine sur les 3 périodes de l'étude 1 (contrôle, ARSA, récupération). De plus, de la variabilité a pu être apportée par les animaux eux-mêmes ou par les méthodes de mesures employées pour mesurer les différents paramètres entre les 2 études. En effet, malgré notre souhait de standardiser au maximum les méthodes, certains paramètres ont été analysés dans d'autres conditions ou avec d'autres appareils au cours des études 1 et 3. Par exemple, le β -OH dans le sang a été dosé avec le même appareil mais avec des lots de réactifs provenant de fournisseurs différents. Les résultats entre les 2 études ne semblent pas du même ordre de grandeur (en moyenne $0,43 \pm 0,09$ vs $0,91 \pm 0,21$ mmol/L pour l'étude 1 (période contrôle) et l'étude 3 (groupe ARSA-), respectivement. Aussi, pour s'affranchir d'une partie du biais potentiel lié à la méthode d'analyse, tous les modèles ont été calculés à l'aide de coefficients normalisés utilisant le poids relatif de chaque variable indépendamment de sa valeur absolue. Par ailleurs, dans l'étude 3 nous avons éprouvé la fiabilité des modèles développés sur des animaux en ARSA ou non, conduits néanmoins dans différentes fermes avec des environnements différents. Ainsi la variabilité apportée au sein de l'étude 3 est bien plus grande que celle apportée par l'étude 1, premièrement du fait du grand nombre d'animaux impliqués ($n=47$) et deuxièmement du fait de la diversité des fermes recrutées ($n=16$).

Les capacités prédictives de l'ARSA par les modèles multiparamétriques développés sont moins bonnes en condition terrain comparativement à une situation expérimentale contrôlée. La plus grande variabilité présente sur le terrain pourrait, en partie, expliquer cette baisse de qualité de prédiction des modèles pour l'ARSA.

Les meilleurs modèles prédictifs de l'ARSA

Un diagnostic précis d'une maladie se caractérise par des indicateurs ayant des sensibilités et des spécificités élevées pour sa détection. Une sensibilité élevée est recherchée lorsque l'on souhaite détecter une maladie grave mais qui est facilement traitable alors qu'une spécificité élevée est recherchée lorsque la maladie que l'on souhaite diagnostiquer est moins grave mais que le traitement est plus lourd à mettre en place (Zou et al., 2007). Dans notre étude, un diagnostic de l'ARSA avec une grande sensibilité et une faible spécificité va détecter la majorité des animaux malades lorsqu'ils sont en ARSA mais il va aussi détecter des animaux malades alors qu'ils ne le sont pas (faux positifs). Dans ce cas, le diagnostic permet de détecter de façon très exhaustive tous les malades mais d'autres éléments devront être apportés pour confirmer la maladie chez les vrais positifs et l'invalider chez les faux positifs. Le modèle (n°12) combinant 3 variables, le nombre de buvées par jour, le pH fécal et la concentration en urée dans le lait, semble être celui présentant la meilleure combinaison prédictive (combinaison de sensibilité et spécificité) des animaux identifiés en ARSA puisque 57,1% des animaux ARSA+ ont été détectés avec ce modèle (Se) et 86,4% des animaux ARSA- ont été confirmés sains (Sp). Ce même modèle a également la plus haute valeur de spécificité sur les 15 retenus. Les 5 meilleurs modèles (basés sur la combinaison Se+Sp : modèle n°12, 16, 8, 5, et 18) utilisent des paramètres parfois redondants. Ces paramètres ont également de bonnes capacités à discriminer des situations d'ARSA sur le terrain, il serait envisageable de tous les combiner pour construire de meilleurs modèles prédictifs pour le terrain. Par exemple, les concentrations en urée dans le lait, β -OH et HCO_3^- dans le sang, le pH fécal, le ratio TB/TP dans le lait et le nombre de buvées par jour pourraient être utilisés pour construire un modèle à 6 variables afin de maximiser le potentiel prédictif. La construction des modèles avec le jeu de données de l'étude 1 s'est limitée à intégrer 2 ou 3 variables car des effets de colinéarité apparaissaient si le nombre de variables était augmenté. Il sera donc nécessaire de vérifier que ce phénomène ne se présente pas avec ces données terrain avant de pouvoir construire des modèles plus riches en variables. Un modèle très sensible (ex : modèle n°5 : concentrations en HCO_3^- dans le sang et urée dans le lait) pourra quant à lui être utilisé pour diagnostiquer 78,6% des animaux ARSA- mais au détriment de la spécificité et donc avec un risque accru de détecter un plus grand nombre de faux positifs (57,1% de faux positifs). Les conséquences seraient alors une bonne détection des animaux malades mais additionnée à une détection abusive de l'ARSA chez les animaux sains qui pourrait inciter à des actions préventives non justifiées dans ce dernier cas.

Toutefois, le traitement de cette maladie chronique est souvent effectué par un réajustement des apports alimentaires des individus, ce qui ne nécessite pas de médication particulière des animaux et n'entraîne alors que très peu de surcoût financier pour les élevages si son diagnostic est abusif. En revanche, une situation d'ARSA installée induit des baisses de production et par voie de conséquence, aura un impact non négligeable pour la rentabilité économique des élevages (Stone, 2004). Auquel cas, nous pensons qu'il est plus judicieux d'utiliser les modèles les plus sensibles possible (Se élevée) au risque de déboucher sur un diagnostic abusif. Le modèle (modèle 5) présentant ces caractéristiques comporte deux paramètres facilement mesurables sur le terrain : les concentrations en HCO_3^- dans le sang et en urée dans le lait. Même si le dosage des HCO_3^- sanguins nécessite une prise de sang, elle peut généralement être effectuée par l'éleveur s'il le souhaite. La limite de ce modèle réside plutôt dans la capacité de mesure des gaz du sang rapidement après l'échantillonnage. L'éleveur devra alors soit se munir d'un appareil soit être en mesure de transmettre ses échantillons rapidement à un laboratoire ou une clinique vétérinaire. Si des solutions peu contraignantes sont trouvées pour mesurer ce paramètre, ce modèle pourra alors être utilisé pour faciliter le diagnostic de l'ARSA sur le terrain.

Aucun modèle prédictif développé dans ce travail ne permet d'obtenir une très bonne sensibilité assortie d'une très bonne spécificité pour prédire l'ARSA sur le terrain. Toutefois, nous proposons de privilégier les modèles assurant une bonne sensibilité au risque d'augmenter la proportion de faux positifs.

CONCLUSION

Afin d'évaluer sur le terrain la qualité prédictive des modèles développés dans l'étude 1, nous avons validé les animaux qui étaient en ARSA ou non par le biais d'indicateurs de niveau de risque à l'échelle de la ferme et d'indicateurs individuels (NpH ruminal). Sur les 64 vaches primipares recrutées au début de l'étude, les modèles prédictifs de l'ARSA ont été évalués sur 27 vaches en ARSA- et 14 vaches en ARSA+. Le modèle combinant les concentrations en HCO_3^- dans le sang et l'urée dans le lait permet de prédire presque 80% des animaux atteints d'ARSA, mais ce modèle présente une faible spécificité impliquant une détection abusive d'animaux en ARSA. Malgré tout, à l'heure actuelle il semble prioritaire d'avoir des modèles de prédiction sensibles pour assurer une bonne détection de la maladie afin de permettre à l'éleveur d'intervenir le plus précocement possible, et ce pour limiter les coûts de frais vétérinaires ou liés à des baisses de production. Toutefois, il est envisageable d'améliorer la spécificité de la prédiction en combinant à ce modèle d'autres variables mesurées à l'échelle individuelle ou de la ferme.

BIBLIOGRAPHIE

- Ferlay, A., B. Martin, S. Lerch, M. Gobert, P. Pradel, et Y. Chilliard. 2010. Effects of supplementation of maize silage diets with extruded linseed, vitamin E and plant extracts rich in polyphenols, and morning v. evening milking on milk fatty acid profiles in Holstein and Montbéliarde cows. *Animal* 4(04):627-640.
- INRA. 2010. Valeur alimentaire des fourrages et des matières premières: tables et prévisions. in *Alimentation des bovins, ovins et caprins. Besoins des animaux.* . Institut National de la Recherche Agronomique ed. Quae. Institut National de la Recherche Agronomique, Paris, France.
- Martin, C., L. Brossard, et M. Doreau. 2006. Mécanismes d'apparition de l'acidose latente et conséquences physiopathologiques et zootechniques. *INRA Productions Animales* 19(2):93-108.
- Nozière, P., D. Sauvant, J.-L. Peyraud, J. Agabriel, R. Baumont, G. C. Hjar, P. Champciaux, M. Eugène, A. Ferlay, et A. Lamadon. 2016. Rénovation des systèmes d'unités d'alimentation pour les ruminants: Systali. Page 115 p. in *Proc. Journées d'Animation des Crédits Incitatifs du Département de Physiologie Animale et Systèmes d'Élevage (JACI Phase 2016)*.
- Sauvant, D. et J. Peyraud. 2010. Calculs de ration et évaluation du risque d'acidose. *INRA Productions Animales* 23(4):333.
- Stone, W. 2004. Nutritional approaches to minimize subacute ruminal acidosis and laminitis in dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 87:E13-E26.
- Villot, C., C. Martin, B. Meunier, M. Richard, et M. Silberberg. 2017a. Relative rumen pH thresholds to predict subacute ruminal acidosis (SARA) in dairy cows. in *Proc. European Conference on Precision Livestock Farming (ECPLF)*, Nantes.
- Villot, C., B. Meunier, J. Bodin, C. Martin, et M. Silberberg. 2017b. Relative reticulo-rumen pH indicators for subacute ruminal acidosis detection in dairy cows. *Animal* :1-10.
- Zou, K. H., A. J. O'Malley, et L. Mauri. 2007. Receiver-operating characteristic analysis for evaluating diagnostic tests and predictive models. *Circulation* 115(5):654-657.

DISCUSSION GÉNÉRALE

L'acidose ruminale subaiguë chez la vache laitière en production est considérée comme une maladie sub-clinique par les vétérinaires. Ce statut lui confère alors intuitivement un diagnostic difficile dans les élevages. Le projet PeriRapa a pour ambition d'améliorer la caractérisation et la détection de l'ARSA en investiguant de façon synchronisée différents paramètres mesurés de façon non-invasive chez l'animal et pouvant être affectés par cette maladie nutritionnelle. Les indicateurs pH classiquement utilisés pour objectiver l'ARSA ont été enrichis et précisés via l'utilisation de bolus intra-ruminaux et d'un traitement mathématique appliqué aux cinétiques pH de haute résolution obtenues dans notre travail expérimental (études 1 et 2). Des modèles composés de paramètres périphériques au rumen ont été développés à partir d'animaux en situation d'acidose provoquée (étude 1). L'étude 3 a eu pour objectif d'évaluer la capacité prédictive de ces modèles sur des vaches laitières en fermes commerciales. Enfin, une stratégie de diagnostic de l'ARSA est proposée à l'échelle individuelle afin d'enrichir le diagnostic de la maladie sur le terrain.

CHAPITRE V : EST-IL POSSIBLE DE DÉFINIR UN "GOLD STANDARD" BASÉ SUR LE pH RUMINAL POUR DIAGNOSTIQUER UN ANIMAL EN ARSA ?

L'ARSA est défini par la communauté scientifique comme un phénomène de malabsorption au niveau du rumen. Un déséquilibre entre la production d'AGV et les phénomènes compensant leur accumulation conduit à une chute du pH ruminal sur le long terme. L'écosystème microbien ruminal est alors directement impacté et cette perturbation, élargie à l'ensemble du système digestif entraînerait plus tardivement des troubles de production ou de santé chez les animaux (Martin et al., 2006). Néanmoins, aucun signe clinique spécifique n'est pour l'instant envisageable pour caractériser cet état d'inconfort digestif qu'est l'ARSA.

Au début de ce travail, nous avons émis l'hypothèse que le pH ruminal comportait des limites pour diagnostiquer précisément l'ARSA mais que les bolus intra-ruminaux pourraient nous aider à les lever.

En effet, la fiabilité de cet indicateur pour caractériser l'ARSA est à l'heure actuelle contestée pour des raisons méthodologiques propres aux mesures et calculs d'indicateurs. De même, la forte variabilité individuelle du pH ruminal est souvent mise en évidence à travers les études.

1. Mesure non-invasive d'une cinétique de haute résolution du pH ruminal

Les bolus intra-ruminaux que nous avons utilisés dans ce travail mesurent, sans recours à des techniques invasives, le pH toutes les 15 min, sur une période de 90 jours, à un emplacement spécifique du rumen : le réticulum. Cet outil mesure le pH ruminal en continu reflétant précisément sa cinétique journalière. Un suivi en temps réel du pH ruminal avec un signal de haute résolution permet d'obtenir des informations précises sur le fonctionnement dynamique du rumen. Depuis quelques années maintenant, de nombreuses études ont recours à ces bolus pour caractériser un état d'acidose. Afin d'améliorer la qualité des indicateurs pH et pour espérer obtenir plus de consensus entre ceux calculés dans différentes études et avec différents animaux, il nous paraissait indispensable d'étudier de façon détaillée la cinétique du signal pH. Le protocole expérimental de l'étude 1 conduite sur 11 vaches laitières nous a alors permis de répondre à ces exigences. Chaque animal était utilisé comme son propre témoin dans cette étude longitudinale ce qui nous a permis d'observer l'impact de 2 rations alimentaires sur l'évolution du pH de chaque animal. L'induction spécifique de l'ARSA lors de la distribution d'une ration acidogène, a pu être vérifiée en combinant les analyses de paramètres biotiques et abiotiques du rumen avec des données zootechniques. Ainsi l'évaluation des indicateurs pH a pu être réalisée dans des conditions contrôlées et déclarées d'ARSA comme l'ont confirmé d'autres paramètres que le pH ruminal (Villot et al., 2017b). Comme mis en évidence dans la littérature, le pH ruminal mesuré au niveau du réticulum est plus élevé que celui mesuré dans le sac ventral du rumen du fait du gradient de pH présent dans ce compartiment (Lane et al., 1968). Dans ce contexte un seuil de pH de 5,8 fréquemment retrouvé dans la littérature (Tableau 1, p.4) quand le pH est mesuré au niveau du sac ventral ne semble pas être le plus adapté dans le cas où un bolus est utilisé pour mesurer le pH au niveau du réticulum. Dans notre étude le temps passé sous pH 6 (pH réévalué pour correspondre au seuil de 5,8 (Falk et al., 2016) était significativement allongé pendant le challenge ARSA, (étude 1 : 120 min/jour en ARSA vs 33 min/jour en période contrôle), mais nous avons aussi démontré que ces indicateurs absolus étaient malgré tout moins précis pour diagnostiquer l'ARSA à l'échelle journalière que les indicateurs relatifs développés dans cette thèse (Villot et al., 2017b). Nous avons montré dans cette 1^{ère} étude que le calcul des indicateurs pH devait se faire sur des cinétiques quotidiennes de pH filtrées et normalisées sur 0.

Ainsi, des cinétiques pH relatives (NpH) sont utilisées pour calculer des indicateurs transposables entre essais et entre animaux. Des temps passés sous des seuils établis à -0,3 ou -0,5 unité pH sous un pH relatif, et normalisés à 0 ainsi que des aires sous la courbe calculées pour ces mêmes seuils ont des sensibilités et spécificités plus élevées que les indicateurs calculés à partir des cinétiques de pH absolu. L'écart type et l'amplitude journalière du pH apportent également des informations précises sur la dynamique des fermentations ruminales.

En effet, lors d'un challenge d'ARSA, les conditions acido-basiques du rumen sont déstabilisées et des phénomènes de compensation se mettent en place pouvant se traduire par des variations journalières du pH plus importantes (Neubauer et al., 2017). Les indicateurs d'amplitude et d'écart type journaliers des valeurs pH caractérisent parfaitement ces fluctuations importantes du pH ruminal en situation d'acidose. Une évaluation et une détermination de valeurs seuils pour l'ensemble des indicateurs NpH a été conduite sur des données issues d'une expérimentation indépendante (étude 2) dans laquelle 14 vaches en production, avaient également subi un challenge ARSA.

Une amplitude > à 0,80, un écart type > 0,20 unité pH ainsi qu'un temps passé sous NpH -0,3 > 50 min sont les seuils limites qui ont été déterminés pour classer un animal en ARSA. Ces nouveaux seuils de risque NpH ont confirmé l'état d'ARSA chez des animaux enquêtés lors de l'essai terrain (étude 3).

2. Limites et perspectives d'utilisation des indicateurs relatifs du pH ruminal (NpH)

2.1. Détermination des seuils de risque d'ARSA selon un seul type de ration acidogène

La principale limite de nos résultats originaux sur les indicateurs pH (étude 1 et 2) réside dans le fait que ces indicateurs ont été calculés avec des protocoles ayant utilisé un seul type de régime à risque acidogène (ensilage de maïs et concentrés à base de blé et orge concassés). Ces régimes sont les plus couramment rencontrés en France mais il serait également intéressant d'évaluer les qualités prédictives de nos indicateurs sur d'autres rations à risque d'ARSA comme par exemple des rations à base d'herbe riche en glucides solubles ou utilisant différents concentrés de production ou encore riches en foin de luzerne.... En effet, ces régimes induisent des cinétiques de pH différentes (Xiaoxiao, 2009), et donc les seuils de risque devront être éprouvés dans diverses conditions alimentaires d'ARSA pour valider leur robustesse.

2.2. Coût et utilisation sur le terrain

Nous estimons que la mesure du pH ruminal reste une référence indispensable dans le diagnostic de l'ARSA. Même si des techniques utilisées sur le terrain telles que le sondage gastro-œsophagien ou la ruminocentèse permettent de mesurer ponctuellement le pH ruminal, elles sont néanmoins invasives pour l'animal et ne renferment que trop peu d'information pour espérer en tirer un diagnostic fiable de l'ARSA. Même si nous privilégions alors l'utilisation des bolus pH, nous sommes conscients qu'ils sont encore difficilement utilisables dans les élevages à cause de leur coût élevé, de la dérive des capteurs, et de la courte durée de vie des batteries. Néanmoins à l'ère du monitoring et de l'élevage de précision, nous sommes assez confiants sur le fait que ces problèmes pourront très vite être dépassés. A noter, qu'une société propose dès à présent des bolus avec une durée de vie garantie de plus de 3 ans sans dérive du capteur de nature électro-optique (Schanzenbach et al., 2017). Une autre option serait de fabriquer des bolus mesurant le pH ruminal à moindre coût comme cela est actuellement fait pour des bolus mesurant la température ruminale.

2.3. Nécessité d'élaborer des seuils adaptatifs

Les seuils de risques présentés dans ce manuscrit ont été déterminés à l'échelle des réponses moyennes des individus. Même si notre traitement mathématique permet de s'affranchir de la variabilité initiale du pH entre animaux puisque le pH est normalisé sur 0, nous avons pu remarquer que les variations des cinétiques journalières de pH étaient également différentes entre animaux. Sur les 11 animaux conduits expérimentalement dans les mêmes conditions avec une ration contrôle, les amplitudes journalières du pH oscillaient entre 0,60 et 0,77 unité pH en fonction des animaux (Figure 16) et les écarts types journaliers de 0,12 et 0,19 unité pH en fonction des animaux. Or les seuils de risque relatifs proposés ne tiennent pas compte de cette forte variabilité inter-animale. Concernant l'amplitude pH par exemple, l'utilisation d'un seuil fixé à 0,80 unité pH pour diagnostiquer l'ARSA, ne conduira certainement pas à la même interprétation pour un animal ayant une amplitude journalière de pH initiale à 0,77 comparativement à un animal ayant une amplitude de pH initiale à 0,60 unité pH. Il semble donc nécessaire de développer à l'avenir des seuils adaptatifs, spécifiques à chaque individu. Ils prendraient toute leur dimension dans le suivi sécurisé des transitions alimentaires chez les vaches laitières en production.

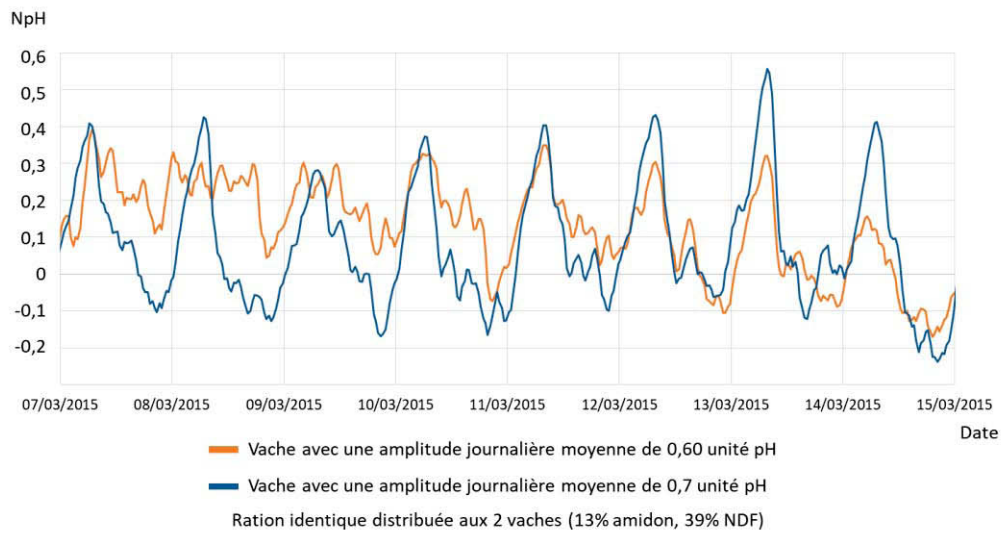


Figure 16 : Variabilités des cinétiques de NpH ruminal de 2 vaches laitières alimentées avec un régime non acidogène

Données personnelles issues de l'étude 1

En introduisant un bolus dans l'animal en amont de la période à surveiller, ces seuils, prenant en compte la cinétique de pH initiale pour l'individu, pourraient induire des alertes plus spécifiques. **Le dépassement des seuils adaptatifs dépendant des cinétiques individuelles du pH ruminal des animaux déclencherait des alertes plus spécifiques pour l'éleveur.**

En conclusion, la mesure du pH ruminal en continu apporte une image dynamique des conditions acido-basiques du milieu et permet le calcul d'indicateurs journaliers reflétant précisément le fonctionnement ruminal. L'absence de consensus entre les études sur les indicateurs de pH absolus provient à la fois de la variabilité issue des méthodologies de mesure du paramètre pH ainsi que du calcul des indicateurs. A cela s'ajoute la variabilité du pH ruminal non négligeable entre animaux. Nous proposons des indicateurs plus universels qui nécessitent de travailler avec des cinétiques filtrées et normalisées sur 0. Une amplitude du pH journalier $> 0,80$ unité pH, un écart type $> 0,20$ unité pH ainsi qu'un temps passé sous $NpH - 0,3 > 50$ min sont les seuils limites qui ont été déterminés dans ce travail pour identifier une vache laitière en production en ARSA. A l'avenir, la création de seuils adaptatifs permettrait une personnalisation à chaque individu.

CHAPITRE VI: INTÉRÊTS DES MODÈLES MULTIPARAMÉTRIQUES DANS LE DIAGNOSTIC DE L'ARSA SUR LE TERRAIN

Sans amélioration méthodologique majeure permettant d'évaluer le pH ruminal sur le terrain de façon pertinente et économique, il semble compliqué de pouvoir observer en ferme des modifications du pH ruminal en continu et de pouvoir les assimiler à une altération de la santé et du niveau de production des animaux. De plus, des études ont suggéré que le pH ruminal à lui seul ne serait pas suffisant pour entraîner des signes cliniques liés à l'ARSA (Khafipour et al., 2009a) et qu'il ne serait que très peu corrélé avec les symptômes de la maladie (Bramley et al., 2008). Ainsi au départ de ce travail nous avons émis l'hypothèse que d'autres paramètres périphériques au rumen pourraient venir conforter le diagnostic de l'ARSA sur le terrain.

1. Construction de modèles de prédiction de l'ARSA

L'étude quantitative de la bibliographie conduite dans le cadre de ce travail de thèse a permis de mettre en évidence que de nombreux paramètres périphériques au rumen pouvaient indiquer des variations de pH ruminal moyen ou minimum. Néanmoins, aucune étude à notre connaissance n'a recherché à développer des modèles mettant en évidence, de façon quantitative, la modification simultanée de plusieurs paramètres périphériques au rumen lors d'ARSA. Un des objectifs de ce projet était alors d'étudier si la combinaison de plusieurs paramètres périphériques au rumen pouvait indiquer l'ARSA chez la vache laitière en production. Ainsi dans l'étude 1, sur les 137 paramètres mesurés dans des échantillons provenant de 5 compartiments périphériques au rumen (sang, urine, salive, fèces, lait) et sur le comportement général des animaux, 18 ont été identifiées comme étant les plus discriminantes de l'ARSA. Au final 6 paramètres laitiers, 4 sanguins, 3 comportementaux, 2 fécaux et salivaires, et seulement 1 urinaire ont été retenus pour construire des modèles. Si certains paramètres ont déjà été observés comme ayant été modifiés par l'ARSA dans la littérature (ratio TB/TP, profils en AG, concentrations en urée dans le lait ; en HCO_3^- , β -OH, glucose, cholestérol dans le sang ou encore la MSI et la rumination...), d'autres se sont avérés novateurs (pH salivaire, taille des résidus dans les bouses, nombre de buvées par jour...) et ont contribué à l'obtention de bonnes capacités prédictives des modèles. Au total 20 modèles de prédiction de l'ARSA composés de 2 ou 3 paramètres mesurés chez les animaux en condition expérimentale ont été développés et retenus lors de l'étude 1.

Le modèle présentant les meilleures capacités prédictives de l'ARSA était composé de la MSI, et des concentrations en HCO_3^- et en urée dans respectivement le sang et le lait. La MSI et la rumination n'ayant pas pu être évaluées à l'échelle individuelle dans l'essai terrain, 15 de ces modèles excluant ces 2 paramètres ont été éprouvés sur le terrain. Le modèle n° 5, basé sur la concentration en HCO_3^- dans le sang et l'urée dans le lait (2 paramètres composant le meilleur modèle de l'étude 1), a présenté la meilleure capacité à prédire les animaux atteints d'ARSA (sensibilité la plus élevée des 15 modèles testés) lors de son évaluation sur le terrain. Toutefois, si ce modèle peut détecter presque 80% des animaux malades en ferme, sa spécificité à la fois pour l'ARSA et à la fois pour sa capacité à détecter les animaux non atteints d'ARSA est à l'heure actuelle bien trop faible pour ne pas révéler un nombre trop important de faux positifs.

2. Limites et perspectives d'amélioration des modèles développés

2.1. Praticité des modèles à être déployés sur le terrain

Même si certains modèles sont très simples à investiguer en élevage (concentration en urée dans le lait et pH urinaire par exemple), d'autres requièrent des analyses plus complexes à mettre en place. Les AG du lait composant certains modèles ont été quantifiés par des techniques de chromatographie en phase gazeuse qui sont très précises pour déterminer le profil en acides gras mais lourdes à mettre en place. Néanmoins les méthodes infra-rouge déjà existantes pour quantifier les matières grasses et protéiques dans le lait, tendent à se développer et se perfectionner pour la prédiction de la composition globale en AG. Nous pouvons donc espérer qu'à l'avenir, ces mesures soient plus accessibles sur le terrain. Les paramètres mesurés dans le sang restent controversés quant à leur utilisation en tant que paramètres « non-invasifs ». En effet, une prise de sang chez les bovins est un acte vétérinaire. Pour autant, il est souvent observé que des éleveurs réalisent des prélèvements à la veine coccygienne pour collecter eux-mêmes du sang sur leurs animaux. Outre le caractère non-invasif des mesures à réaliser sur les animaux pour diagnostiquer l'ARSA avec les modèles, leur automatisation ainsi que celle des analyses à conduire pour obtenir les valeurs des paramètres, doivent également être améliorées. En effet, l'ARSA étant une maladie chronique, l'idéal serait de pouvoir suivre en continu les paramètres des modèles afin de prédire le plus précocement possible des situations d'ARSA. Ainsi, si des modèles peuvent être évalués à l'échelle journalière de façon automatisée et peu coûteuse, cet outil diagnostique pourrait trouver sa place en élevage. Parmi les paramètres utilisés dans les modèles développés ici, ceux provenant des échantillons de lait semblent être les plus pratiques à automatiser dans les troupeaux laitiers.

Les traites quotidiennes permettent effectivement d'analyser individuellement des paramètres laitiers. Dans des élevages équipés de robot, et au même titre que le TB/TP, ou la concentration en urée dans le lait, des outils sont en cours d'optimisation pour estimer en temps réel certains acides gras. Par ailleurs, des capteurs sont de plus en plus utilisés pour quantifier de façon automatique des paramètres comportementaux chez les individus (Silberberg et al., 2017). Ces nouvelles technologies pourraient alors à l'avenir contribuer à une analyse en temps réel de l'inconfort des animaux et ainsi anticiper des situations d'ARSA.

Les modèles construits dans ce projet sont plus ou moins pratiques à utiliser sur le terrain à l'heure actuelle mais nous sommes optimistes sur le fait que les analyses des paramètres proposés seront de plus en plus abordables dans un avenir proche en termes de coût mais aussi de techniques de mesure avec la mise en place d'automatisation dans les élevages.

2.2. Enrichissement et précision des modèles

Les modèles évalués jusqu'à présent étaient composés de 2 ou 3 paramètres car ils ont été initialement développés dans l'étude 1 où 2 situations très contrastées entre animaux atteints d'ARSA ou non étaient induites. Ainsi un faible nombre de paramètres suffisait pour que les modèles soient assez pertinents pour prédire de façon précise l'ARSA. Néanmoins, lorsque ces mêmes modèles ont été éprouvés sur le terrain, il a été mis en évidence que leur capacité prédictive était diminuée. La forte variabilité apportée dans l'essai en ferme semble impacter négativement la sensibilité et/ou la spécificité des modèles. Ainsi, il pourrait être proposé d'enrichir les modèles déjà développés avec d'autres paramètres issus des données terrain, et/ou de construire entièrement de nouveaux modèles comportant plus de paramètres pour améliorer la sensibilité et la spécificité des équations développées. Outre le développement d'autres modèles utilisant à la fois les données des études 1 et 3, nous pensons que d'autres études doivent également être conduites. En effet, à ce stade du projet, aucune expérimentation n'a été mise en place pour évaluer la spécificité de nos modèles à détecter l'ARSA lorsque d'autres maladies affectent les animaux. Il est effectivement connu que certains paramètres utilisés dans ces modèles peuvent être modifiés dans d'autres situations pathologiques chez la vache laitière. Il est donc important de vérifier que la présence d'autres maladies n'entraîne pas l'augmentation de faux positifs de l'ARSA lorsque les modèles sont testés.

Ainsi à l'heure actuelle, nous pensons que les modèles développés au cours ce projet ne peuvent pas se suffire à eux-mêmes pour poser un diagnostic spécifique de l'ARSA.

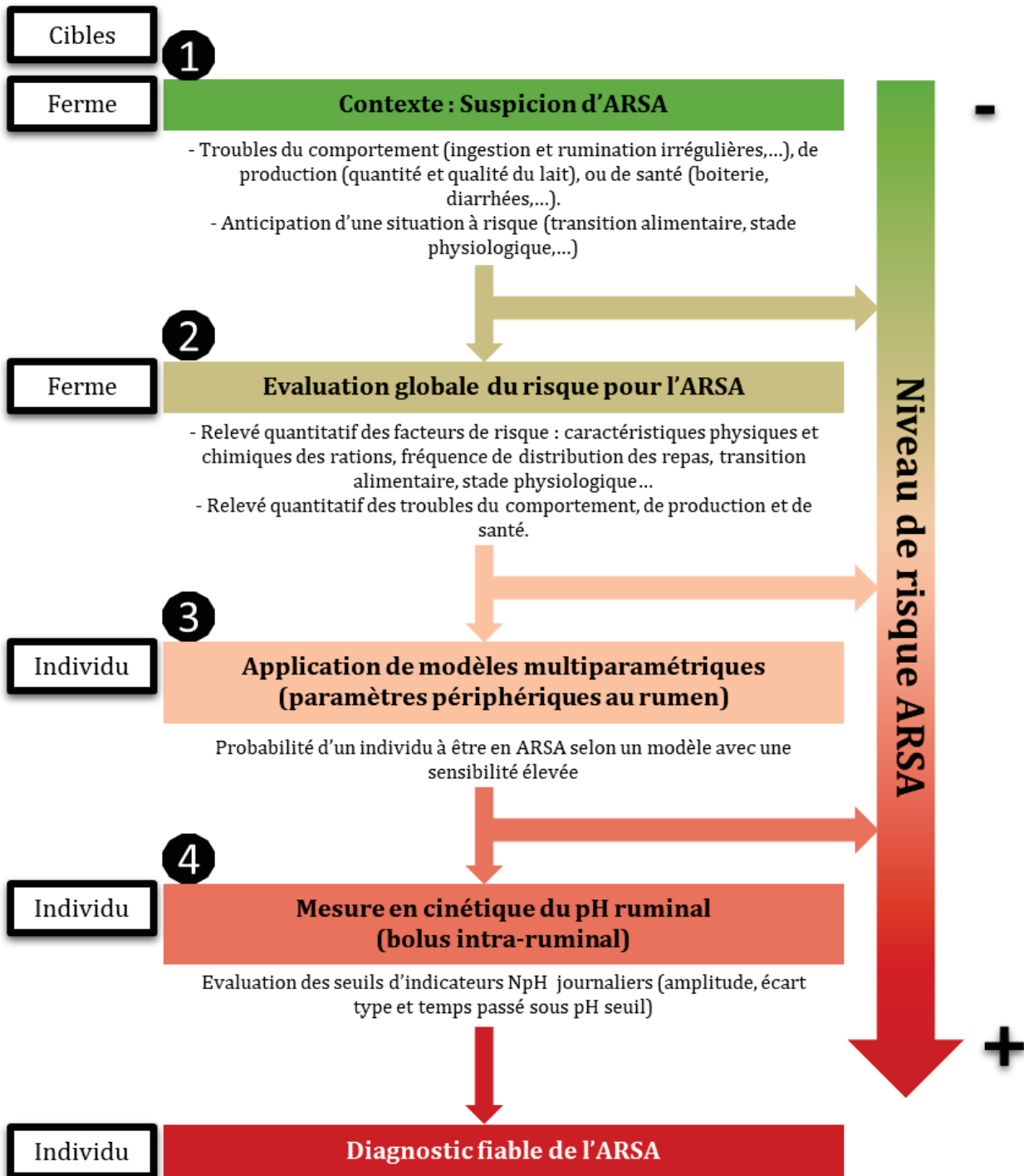


Figure 17: Stratégie de diagnostic de l'ARSA développée pour le terrain

CHAPITRE VII : STRATÉGIE POUR FIABILISER LE DIAGNOSTIC DE L'ARSA SUR LE TERRAIN

Dans cette partie, une stratégie de diagnostic de l'ARSA en élevage est proposée pour garantir une bonne gestion de la santé digestive des animaux et de leurs performances zootechniques afin de garantir la rentabilité financière des exploitations. Si l'amélioration des indicateurs pH conduit à une meilleure identification des animaux en ARSA, leur déploiement sur le terrain n'est encore pas très aisé. De plus, nous avons démontré tout au long de ce manuscrit que le diagnostic pouvait être enrichi avec des modèles multiparamétriques (paramètres périphériques au rumen) prédictifs de l'ARSA. L'analyse de critères de risques à l'échelle de l'environnement ou de l'animal a été également abordée de façon plus succincte lors de la mise en place de l'étude 3. Il semble nécessaire que cette étape soit menée sur le terrain pour fiabiliser le diagnostic de l'ARSA. Ainsi, nous proposons de suivre une stratégie déclinée en 4 étapes (Figure 17).

Etape 1 : Le contexte dans lequel la stratégie de diagnostic de l'ARSA sera mise en place, doit tout d'abord être précisé et 2 éléments déclencheurs majeurs peuvent être identifiés :

- 1) observation de troubles du comportement (ingestion et rumination irrégulières), de production (quantité et qualité du lait), et/ou de santé (boiterie, diarrhées...)
- 2) volonté d'anticiper des situations à risque (transition alimentaire, stade physiologique...)

Que l'on suspecte ou que l'on souhaite anticiper l'apparition d'ARSA, nous conseillons alors de poursuivre les différentes étapes chronologiques de la stratégie diagnostique de l'ARSA:

Etape 2 : Evaluation globale du risque à l'échelle de la ferme

Un recensement quantitatif précis de tous les critères de risque qu'ils soient liés au poste alimentation ou à la production, doit être effectué à l'échelle de la ferme afin d'établir un niveau de risque global. Même si cette étape n'a été que très peu développée dans ce projet et notamment dans les 2 premières études où l'ARSA a été induite expérimentalement, nous nous sommes confrontés sur le terrain à des évaluations du niveau de risque d'ARSA dans les fermes parfois peu précis. Ces expertises à l'échelle de la ferme doivent encore être améliorées. Durant notre projet, nous avons montré que cette 1^{ère} étape n'a pas suffi à estimer précisément l'ARSA au sein des fermes. En effet, dans le groupe de fermes à fort risque d'ARSA (FERME+) de l'étude 3, seulement 44% des individus présentaient des instabilités au niveau de leur pH ruminal.

Etape 3 : Evaluation de la probabilité pour un animal d'être en ARSA en appliquant un modèle multiparamétrique (paramètres périphériques au rumen) sensible.

Un modèle prédictif de l'ARSA le plus sensible possible doit alors être utilisé pour connaître la probabilité individuelle des animaux à être en ARSA avec le maximum de sensibilité possible. La spécificité du modèle peut quant à elle, être légèrement plus faible, le but étant dans un 1^{er} temps d'avoir le moins de faux négatifs possible. Certains modèles développés ici, et composés par exemple des concentrations en HCO_3^- dans le sang et de l'urée dans le lait, ont une sensibilité proche de 80% leur conférant de bonnes capacités à détecter des animaux en ARSA. De plus, ce modèle peut être déployé sur le terrain à l'échelle individuelle sans nécessité d'utiliser des techniques d'échantillonnage trop invasives pour les animaux, et sans engendrer des coûts financiers trop importants pour l'exploitation. La concentration en urée peut être évaluée par le contrôle laitier par analyse infra-rouge au même titre que les mesures de TB et TP. La concentration en HCO_3^- doit quant à elle être déterminée sur un échantillon de sang qui peut être prélevé par un vétérinaire ou l'éleveur. Un analyseur de gaz du sang doit néanmoins être à disposition dans l'élevage pour réaliser cette mesure le plus rapidement possible après la collecte du sang. La spécificité de ce modèle peine néanmoins à atteindre les 50%, ce qui signifie que plus d'une fois sur deux ce modèle détecte des animaux en ARSA alors qu'ils ne le sont pas. La seule utilisation de ce modèle aurait donc pour conséquence une prévention abusive de l'ARSA. A noter également que les qualités prédictives des modèles ont été évaluées jusqu'à présent par 2 indicateurs : leur sensibilité et leur spécificité face à l'ARSA. Pour calculer ces indicateurs, nous avons considéré qu'un modèle prédisait correctement un animal en ARSA lorsque la valeur calculée par le modèle était supérieure à une probabilité d'être en ARSA de 50% et inversement inférieure à 50% pour identifier un animal sain. Ce seuil de 50% est classiquement utilisé pour évaluer des modèles mathématiques mais il n'est peut-être pas assez restrictif pour être utilisé dans des situations de diagnostic de maladie. Il pourrait alors être intéressant à l'avenir d'évaluer les capacités prédictives des modèles en utilisant des seuils plus drastiques de classification pour calculer la sensibilité et la spécificité des modèles construits.

Discussion générale

Comme nous l'avons montré précédemment (*Chapitre V.2*), la probabilité des animaux à être en ARSA devrait être évaluée quotidiennement pour surveiller la fréquence de cette maladie qui aura une grande importance sur les conséquences potentielles pour les animaux. Durant ce projet, cette caractéristique de la maladie a été peu étudiée sur le terrain. Si les modèles prédictifs de l'étude 1 ont été construits et évalués via des mesures répétées sur un challenge d'ARSA de 4 semaines, d'autres données sont indispensables pour préciser l'évolution des modèles de prédiction chez les individus à risque. Ceci pourrait notamment être réalisé lors de transitions alimentaires à risque (hivernage, mise à l'herbe, changement de ration après vêlage...). Sur le terrain, l'étude de cet aspect demande de pouvoir automatiser le calcul des paramètres composant les modèles créés mais également de pouvoir suivre sur une durée longue des animaux en production. Ces 2 éléments sont bien souvent les facteurs limitant de la validation des observations menées expérimentalement. Nous espérons néanmoins que les nouvelles technologies appliquées au secteur agricole pourront favoriser l'automatisation à bas coût de certains paramètres utilisés dans nos modèles et notamment ceux pouvant être mesurés dans des échantillons de lait collectés quotidiennement en routine. Cette étape semble être primordiale pour confirmer que l'inconfort potentiel suspecté au niveau du rumen, a un impact à l'échelle de l'individu et nécessite alors une intervention de prévention.

Etape 4 : Mesure en cinétique du pH ruminal individuel avec des bolus intra-ruminaux.

Afin de poser un diagnostic fiable de l'ARSA pour un animal jugé à risque, l'utilisation de bolus intra-ruminaux est fortement recommandée pour objectiver les instabilités ruminales. L'évaluation de la cinétique du pH ruminal aura pour objectif de confirmer l'origine ruminale de la maladie statuant sur la spécificité du diagnostic. Dans un second temps, les indicateurs pH calculés quotidiennement fourniront des informations précises sur la cinétique d'apparition de l'ARSA. La fréquence des instabilités ruminales pourra alors être prise en compte pour préciser l'intensité de l'ARSA et un diagnostic en temps réel pourra être posé.

Finalement, le degré de précision du diagnostic que l'on ambitionne, les moyens financiers et humains que l'on souhaite déployer, conditionneront la réalisation partielle ou totale des différentes étapes de la stratégie présentée. En effet, il est possible de s'arrêter à chaque étape (Figure 17) et de faire un choix sur l'action à mener à l'échelle du troupeau ou de l'individu. Le contexte dans lequel s'inscrit cette stratégie diagnostique pourra également guider l'éleveur vers une personnalisation de cette stratégie. Des actions plus ou moins préventives et correctives pourront alors être mises en place. Les moyens employés pour le diagnostic pourront alors être peu coûteux dans un cas mais une prévention souvent abusive de l'ARSA sera mise en place. A l'inverse, un processus diagnostique plus coûteux pourra être employé mais la fiabilité du diagnostic de l'ARSA sera normalement beaucoup plus élevée. En effet, le coût important des bolus intra-ruminaux (environ 400€) renferme la principale limite à cette stratégie diagnostique de l'ARSA proposée pour le terrain. Néanmoins cet outil permet la mesure du paramètre en continu sur une durée d'au moins 3 mois. Les modèles multiparamétriques semblent quant à eux plus accessibles à mettre en place mais très peu de paramètres utilisés dans les modèles sont actuellement mesurés en routine et de façon automatisée dans les élevages. L'ARSA étant un état qui, en se développant de façon chronique, aura des impacts néfastes sur la production et la santé des animaux, nous pensons qu'il est alors primordial de suivre l'évolution de ce paramètre surtout lors de situations à risque. Les modèles multiparamétriques ont, quant à eux, l'avantage de traduire l'impact de l'ARSA sur le métabolisme général de l'animal et donc de potentiellement objectiver l'effet d'un statut chronique de la maladie.

Un diagnostic fiable de l'ARSA reposerait alors sur 4 piliers fondamentaux : (1) l'étude du contexte général incitant à mettre en place un diagnostic de l'ARSA, (2) l'évaluation des conditions initiales du troupeau au niveau comportement, performance et santé pour objectiver précisément le niveau de risque général de la ferme, (3) la probabilité individuelle des animaux à être malades calculée avec des modèles utilisant des paramètres mesurés en périphérie du rumen ; et enfin (4) la mesure quotidienne d'indicateurs individuels du NpH ruminal avec des bolus intra-ruminaux. Cette stratégie chronologique conduit à un diagnostic individuel fiable de l'ARSA sur le terrain. Néanmoins, le coût de cette stratégie est à l'heure actuelle très élevé à l'échelle d'une exploitation, notamment à cause du coût des bolus ruminiaux. Il est alors possible d'interrompre ou de négliger une étape de ce processus, cependant la précision du diagnostic en sera nécessairement impactée.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Dans un contexte d'élevage où la main d'œuvre disponible diminue, et où la sélection génétique des animaux et leur rationnement sont maximisés pour réduire le nombre de têtes dans les exploitations laitières, le risque d'ARSA augmente dans les élevages laitiers à haut niveau de production et son diagnostic doit être amélioré. En effet cette maladie sans signe clinique spécifique est difficilement objectivable sur le terrain. Si le développement de bolus ruminiaux permet de mesurer de façon précise l'acidité ruminale, la communauté scientifique n'est pas unanime sur les valeurs seuils permettant d'objectiver des états d'ARSA chez les animaux. Ainsi, cette thèse de doctorat s'est attachée à préciser le diagnostic de la maladie à l'échelle individuelle chez la vache laitière en suivant deux objectifs parallèles et complémentaires. Dans un premier temps nous avons développé une nouvelle approche de traitement du signal issu de bolus ruminiaux pour élaborer des indicateurs relatifs du pH ruminal (NpH) qui sont plus spécifiques, plus sensibles et plus consensuels puisque comparables entre animaux, entre études et entre élevages. Parallèlement, nous avons développé des combinaisons de paramètres périphériques au rumen qui permettent de prédire de façon très sensible mais peu spécifique les situations d'ARSA sur le terrain. En combinant les résultats obtenus lors de nos expérimentations en station expérimentale et en élevages laitiers, nous proposons une stratégie de diagnostic qui s'appuie sur 4 étapes fondamentales : 1) l'analyse du contexte dans lequel le diagnostic de l'ARSA veut être déployé, 2) l'évaluation des facteurs de risques liés au management de la ferme, 3) l'étude de modèles combinant des paramètres périphériques au rumen, et 4) la mesure précise de la cinétique du pH ruminal des individus à risque. Ces étapes peuvent être conduites de façon synchrone ou dans un ordre différent en fonction de la nature du diagnostic que l'on souhaite mettre en place.

Aujourd'hui les bolus de mesure du pH ruminal présents sur le marché sont onéreux. A l'avenir, nous pensons que cette technologie pourrait devenir plus abordable et plus facilement utilisable via certaines améliorations : rallongement de la durée de vie des batteries, réduction de la dérive du capteur pH, analyse mathématique du signal. Ainsi, les bolus pourraient être fréquemment utilisés en élevage de précision et poser les mêmes enjeux que tout autre outil de monitoring générant un gros volume de données à savoir leur analyse en temps réel et la création d'algorithmes générant des alertes pour l'éleveur.

Conclusion et perspectives

Il semble alors évident d'anticiper l'analyse du signal produit par les bolus ruminiaux pour en extraire uniquement les données portant l'information nécessaire pour l'éleveur. Ce travail de thèse a permis de mettre en évidence l'intérêt des seuils relatifs du pH ruminal (NpH). Les recherches futures devront se focaliser sur l'adaptation de ces seuils à l'échelle individuelle afin de créer des seuils adaptatifs propres à chaque animal, ce qui permettra d'affiner les informations disponibles pour l'éleveur et de l'alerter uniquement à bon escient.

Une perspective à court terme de ce travail de thèse sera de développer d'autres combinaisons de paramètres périphériques au rumen en utilisant les données produites lors de l'essai réalisé en ferme. En effet, la plus forte variabilité contenue dans ces données par rapport à celle de l'étude expérimentale, pourrait enrichir les modèles de prédiction de l'ARSA actuellement développés. Le but serait d'améliorer leur capacité prédictive tout en essayant de maintenir une faisabilité et une praticité sur le terrain. A moyen terme, les probabilités d'un animal à être en ARSA devront être précisées. A plus long terme, l'automatisation en élevage de la mesure de nombreux paramètres laitiers et physiologiques permettrait d'automatiser le calcul de certains modèles de prédiction proposés dans ce travail. Il serait alors intéressant de calculer les probabilités individuelles des animaux à être en ARSA à l'échelle journalière pour observer la chronicité de la maladie puisque l'historique de l'animal est un élément clé du diagnostic de l'ARSA.

Enfin, que ce soit sur les indicateurs NpH ou sur les modèles de prédiction établis dans ce projet, une perspective serait de travailler spécifiquement sur les périodes en amont d'une ARSA installée. En effet, en situation expérimentale, la période de transition alimentaire précédant le challenge acidogène contient très certainement des informations sur la cinétique des paramètres ruminiaux et périphériques qui seront impactés durant le challenge. L'étude de ces modifications précoces permettrait de mieux anticiper l'apparition de la maladie sur le terrain et donc de mieux la prévenir.

BIBLIOGRAPHIE

- Allen, M. 1997. Relationship between fermentation acid production in the rumen and the requirement for physically effective fiber. *J Dairy Sci* 80(7):1447-1462.
- Allen, M. 2000. Effects of diet on short-term regulation of feed intake by lactating dairy cattle. *J Dairy Sci* 83(7):1598-1624.
- Allen, M. and R. Grant. 2000. Interactions Between Forage and Wet Corn Gluten Feed as Sources of Fiber in Diets for Lactating Dairy Cows. *J Dairy Sci* 83(2):322-331.
- Alonso, A. 1979. Diagnostic analysis of rumen fluid. *Veterinary Clinics of North America: Large Animal Practice* 1(2):363-376.
- AlZahal, O., E. Kebreab, J. France, and B. W. McBride. 2007. A mathematical approach to predicting biological values from ruminal pH measurements. *J Dairy Sci* 90(8):3777-3785.
- Aschenbach, J., G. Penner, F. Stumpff, and G. Gäbel. 2011. Ruminant nutrition symposium: Role of fermentation acid absorption in the regulation of ruminal pH. *J Anim Sci* 89(4):1092-1107.
- Bailey, C. and C. Balch. 1961. Saliva secretion and its relation to feeding in cattle. 2. The composition and rate of secretion of mixed saliva in the cow during rest. *British Journal of Nutrition* 15:383-402.
- Bannink, A., J. Kogut, J. Dijkstra, J. France, E. Kebreab, A. Van Vuuren, and S. Tamminga. 2006. Estimation of the stoichiometry of volatile fatty acid production in the rumen of lactating cows. *Journal of Theoretical Biology* 238(1):36-51.
- Bauman, D. E. and J. M. Griinari. 2003. Nutritional regulation of milk fat synthesis. *Annual review of nutrition* 23(1):203-227.
- Beauchemin, K., L. Eriksen, P. Nørgaard, and L. Rode. 2008. Salivary secretion during meals in lactating dairy cattle. *J Dairy Sci* 91(5):2077-2081.
- Beauchemin, K., W. Yang, D. Morgavi, G. Ghorbani, W. Kautz, and J. Leedle. 2003a. Effects of bacterial direct-fed microbials and yeast on site and extent of digestion, blood chemistry, and subclinical ruminal acidosis in feedlot cattle. *J Anim Sci* 81(6):1628-1640.
- Beauchemin, K., W. Yang, and L. Rode. 2003b. Effects of particle size of alfalfa-based dairy cow diets on chewing activity, ruminal fermentation, and milk production. *J Dairy Sci* 86(2):630-643.
- Beauchemin, K., S. Zelin, D. Genner, and J. Buchanan-Smith. 1989. An automatic system for quantification of eating and ruminating activities of dairy cattle housed in stalls. *J Dairy Sci* 72(10):2746-2759.
- Beauchemin, K. A. 1991. Effects of Dietary Neutral Detergent Fiber Concentration and Alfalfa Hay Quality on Chewing, Rumen Function, and Milk Production of Dairy Cows¹. *J Dairy Sci* 74(9):3140-3151.
- Bergman, E. 1990. Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. *Physiological reviews* 70(2):567-590.
- Bertoni, G. and E. Trevisi. 2013. Use of the liver activity index and other metabolic variables in the assessment of metabolic health in dairy herds. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice* 29(2):413-431.
- Bertoni, G., E. Trevisi, X. Han, and M. Bionaz. 2008. Effects of inflammatory conditions on liver activity in puerperium period and consequences for performance in dairy cows. *J Dairy Sci* 91(9):3300-3310.
- Bevans, D., K. Beauchemin, K. Schwartzkopf-Genswein, J. McKinnon, and T. McAllister. 2005. Effect of rapid or gradual grain adaptation on subacute acidosis and feed intake by feedlot cattle. *J Anim Sci* 83(5):1116-1132.
- Bramley, E., I. J. Lean, W. J. Fulkerson, M. A. Stevenson, A. R. Rabiee, and N. D. Costa. 2008. The Definition of Acidosis in Dairy Herds Predominantly Fed on Pasture and Concentrates. *J Dairy Sci* 91(1):308-321.

Bibliographie

- Brossard, L., C. Martin, F. Chaucheyras-Durand, and B. Michalet-Doreau. 2004. Protozoa involved in butyric rather than lactic fermentative pattern during latent acidosis in sheep. *Reproduction Nutrition Development* 44(3):195-206.
- Buccioni, A., M. Decandia, S. Minieri, G. Molle, and A. Cabiddu. 2012. Lipid metabolism in the rumen: New insights on lipolysis and biohydrogenation with an emphasis on the role of endogenous plant factors. *Animal Feed Science and Technology* 174(1):1-25.
- Burrin, D. and R. Britton. 1986. Response to monensin in cattle during subacute acidosis. *J Anim Sci* 63(3):888-893.
- Calamari, L., A. Ferrari, A. Minuti, and E. Trevisi. 2016. Assessment of the main plasma parameters included in a metabolic profile of dairy cow based on Fourier Transform mid-infrared spectroscopy: preliminary results. *BMC veterinary research* 12(1):4.
- Calsamiglia, S., M. Blanch, A. Ferret, and D. Moya. 2012. Is subacute ruminal acidosis a pH related problem? Causes and tools for its control. *Animal Feed Science and Technology* 172(1-2):42-50.
- Cassida, K. and M. Stokes. 1986. Eating and Resting Salivation in Early Lactation Dairy Cows. *J Dairy Sci* 69(5):1282-1292.
- Castro-Costa, A., A. A. K. Salama, X. Moll, J. Aguiló, and G. Caja. 2015. Using wireless rumen sensors for evaluating the effects of diet and ambient temperature in nonlactating dairy goats. *J Dairy Sci* 98(7):4646-4658.
- Chen, Y. and M. Oba. 2012. Variation of bacterial communities and expression of Toll-like receptor genes in the rumen of steers differing in susceptibility to subacute ruminal acidosis. *Veterinary microbiology* 159(3):451-459.
- CNIEL. 2017. L'économie laitière en chiffres. CNIEL, Paris. Centre National Interprofessionnel de l'Economie Laitière.
- Colman, E. 2012. Milk fatty acids as biomarkers of subacute ruminal acidosis in dairy cows. Ghent University.
- Colman, E., W. Fokkink, M. Craninx, J. Newbold, B. De Baets, and V. Fievez. 2010. Effect of induction of subacute ruminal acidosis on milk fat profile and rumen parameters. *J Dairy Sci* 93(10):4759-4773.
- Colman, E., W. Waegeman, B. De Baets, and V. Fievez. 2015. Prediction of subacute ruminal acidosis based on milk fatty acids: A comparison of linear discriminant and support vector machine approaches for model development. *Computers and Electronics in Agriculture* 111:179-185.
- Cooper, R., T. J. Klopfenstein, R. Stock, C. Milton, D. Herold, and J. Parrott. 1999. Effects of imposed feed intake variation on acidosis and performance of finishing steers. *J Anim Sci* 77(5):1093-1099.
- Coppa, M., A. Ferlay, C. Leroux, M. Jestin, Y. Chilliard, B. Martin, and D. Andueza. 2010. Prediction of milk fatty acid composition by near infrared reflectance spectroscopy. *Int Dairy J* 20(3):182-189.
- Dado, R. and M. Allen. 1993. Continuous computer acquisition of feed and water intakes, chewing, reticular motility, and ruminal pH of cattle. *J Dairy Sci* 76(6):1589-1600.
- Dijkstra, J., H. Boer, J. Van Bruchem, M. Bruining, and S. Tamminga. 1993. Absorption of volatile fatty acids from the rumen of lactating dairy cows as influenced by volatile fatty acid concentration, pH and rumen liquid volume. *British Journal of Nutrition* 69(2):385-396.
- Dirksen, G. 1965. Rumen acidosis in cattle. *Vet Med Rev Bayer* 2:98-125.
- Dirksen, G. and M. Smith. 1987. Acquisition and analysis of bovine rumen fluid. *The Bovine practitioner (USA)*.
- Dohme, F., T. DeVries, and K. Beauchemin. 2008. Repeated ruminal acidosis challenges in lactating dairy cows at high and low risk for developing acidosis: Ruminal pH. *J Dairy Sci* 91(9):3554-3567.

Bibliographie

- Drackley, J. K. 1999. Biology of dairy cows during the transition period: The final frontier? *J Dairy Sci* 82(11):2259-2273.
- Dragomir, C., D. Sauvant, J. L. Peyraud, S. Giger-Reverdin, and B. Michalet-Doreau. 2008. Meta-analysis of 0 to 8 h post-prandial evolution of ruminal pH. *Animal* 2(10):1437-1448.
- Duffield, T., J. C. Plaizier, A. Fairfield, R. Bagg, G. Vessie, P. Dick, J. Wilson, J. Aramini, and B. McBride. 2004. Comparison of techniques for measurement of rumen pH in lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 87(1):59-66.
- Edwards, J. E., S. A. Huws, E. J. Kim, and A. H. Kingston-Smith. 2007a. Characterization of the dynamics of initial bacterial colonization of nonconserved forage in the bovine rumen. *FEMS Microbiology Ecology* 62:323-335.
- Edwards, J. E., S. A. Huws, E. J. Kim, and A. H. Kingston-Smith. 2007b. Characterization of the dynamics of initial bacterial colonization of nonconserved forage in the bovine rumen—corrigendum. *FEMS Microbiology Ecology* 62:1-2.
- Enemark, J. 2008. The monitoring, prevention and treatment of sub-acute ruminal acidosis (SARA): A review. *Veterinary Journal* 176(1):32-43.
- Enemark, J., R. J. Jorgensen, and N. B. Kristensen. 2004. An evaluation of parameters for the detection of subclinical rumen acidosis in dairy herds. *Veterinary Research Communication* 28(8):687-709.
- Enemark, J. M. D., R. Jorgensen, and P. S. Enemark. 2002. Rumen acidosis with special emphasis on diagnostic aspects of subclinical rumen acidosis: a review. *Veterinarija ir zootechnika* 20(42):16-29.
- Enjalbert, F. 2006. Assessment of nutritional adequacy in dairy cows through diet characteristics and animal responses. in *Proc. World Buiatrics Congress*.
- Enjalbert, F., M. Nicot, C. Bayourthe, and R. Moncoulon. 2001. Ketone bodies in milk and blood of dairy cows: Relationship between concentrations and utilization for detection of subclinical ketosis. *J Dairy Sci* 84(3):583-589.
- Enjalbert, F., Y. Videau, M.-C. Nicot, and A. Troegeler-Meynadier. 2008. Effects of induced subacute ruminal acidosis on milk fat content and milk fatty acid profile. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 92(3):284-291.
- Faisant, N., V. Planchot, F. Kozlowski, M.-P. Pacouret, P. Colonna, and M. Champ. 1995. Resistant starch determination adapted to products containing high level of resistant starch. *Sciences des Aliments* 15(1):83-89.
- Falk, M., A. Münger, and F. Dohme-Meier. 2016. Technical note: A comparison of reticular and ruminal pH monitored continuously with 2 measurement systems at different weeks of early lactation. *J Dairy Sci* 99(3), : 1951-1955.
- Ferlay, A., B. Martin, S. Lerch, M. Gobert, P. Pradel, and Y. Chilliard. 2010. Effects of supplementation of maize silage diets with extruded linseed, vitamin E and plant extracts rich in polyphenols, and morning v. evening milking on milk fatty acid profiles in Holstein and Montbéliarde cows. *Animal* 4(04):627-640.
- Fievez, V., E. Colman, J. Castro-Montoya, I. Stefanov, and B. Vlaeminck. 2012. Milk odd-and branched-chain fatty acids as biomarkers of rumen function—An update. *Anim Feed Sci Technol* 172(1):51-65.
- Gäbel, P., M. Bestmann, and H. Martens. 1991. Influences of Diet, Short-Chain Fatty Acids, Lactate and Chloride on Bicarbonate Movement across the Reticulo-Rumen Wall of Sheep. *Transboundary and Emerging Diseases* 38(1-10):523-529.
- Galster, H. 1991. pH measurement: fundamentals, methods, applications, instrumentation. VCH.
- Gantner, V., T. Bobić, and K. Potočnik. 2016. Prevalence of metabolic disorders and effect on subsequent daily milk quantity and quality in Holstein cows. *Archives Animal Breeding* 59(3):381-386.

Bibliographie

- Gao, X. 2016. Variation in the risk of developing sub-acute ruminal acidosis in lactating dairy cows. Thèse de Doctorat. University of Alberta.
- Gao, X. and M. Oba. 2014. Relationship of severity of subacute ruminal acidosis to rumen fermentation, chewing activities, sorting behavior, and milk production in lactating dairy cows fed a high-grain diet. *J Dairy Sci* 97(5):3006-3016.
- Gao, X. and M. Oba. 2015. Short communication: Noninvasive indicators to identify lactating dairy cows with a greater risk of subacute rumen acidosis. *J Dairy Sci* 98(8):5735-5739.
- Gardner, M. and D. Altman. 1989. Calculating confidence intervals for proportions and their differences. *Statistics with confidence*. London: British Medical Journal Publishing Group:28-33.
- Garrett, E., K. Nordlund, W. Goodger, and G. Oetzel. 1997. A cross-sectional field study investigating the effect of periparturient dietary management on ruminal pH in early lactation dairy cows. *J Dairy Sci* 80(Suppl 1):169.
- Garrett, E., M. Pereira, L. Armentano, K. Nordlund, and G. Oetzel. 1995. Comparison of pH and VFA concentration of rumen from dairy cows collected through a rumen canula vs. rumenocentesis. *J Dairy Sci* 78:299.
- Garrett, E., M. Pereira, K. Nordlund, L. Armentano, W. Goodger, and G. Oetzel. 1999. Diagnostic methods for the detection of subacute ruminal acidosis in dairy cows. *J Dairy Sci* 82(6):1170-1178.
- Garry, F. 2002. Indigestion in ruminants. Pages 722–747 in *Large Animal Internal Medicine*, B. P. Smith, ed, Mosby, St Louis and Baltimore.
- Gasteiner, J., M. Fallast, S. Rosenkranz, J. Häusler, K. Schneider, and T. Guggenberger. 2009a. Measuring rumen pH and temperature by an indwelling and wireless data transmitting unit and application under different feeding conditions. Pages 127-133 in *Proc. Proceedings Fourth European Conference Precision Livestock Farming 09*, Wageningen, the Netherlands.
- Gasteiner, J., M. Fallast, S. Rosenkranz, J. Häusler, K. Schneider, and T. Guggenberger. 2009b. Zum Einsatz einer intraruminalen pH-Datenmesseinheit mit kabelloser Datenübertragung bei Rindern unter verschiedenen Fütterungsbedingungen.
- Gasteiner, J., M. Horn, and A. Steinwidder. 2015. Continuous measurement of reticuloruminal pH values in dairy cows during the transition period from barn to pasture feeding using an indwelling wireless data transmitting unit. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 99(2):273-280.
- Geishauser, T. 1993. An instrument for collection and transfer of ruminal fluid and for administration of water soluble drugs in adult cattle. *Bovine Practitioner* 27:38-38.
- Giger-Reverdin, S., K. Rigalma, M. Desnoyers, D. Sauvant, and C. Duvaux-Ponter. 2014. Effect of concentrate level on feeding behavior and rumen and blood parameters in dairy goats: Relationships between behavioral and physiological parameters and effect of between-animal variability. *J Dairy Sci* 97(7):4367-4378.
- Goad, D., C. L. Goad, and T. G. Nagaraja. 1998. Ruminal microbial and fermentative changes associated with experimentally induced subacute acidosis in steers. *Journal of animal science* 76(1):234-241.
- González, L. A., X. Manteca, S. Calsamiglia, K. S. Schwartzkopf-Genswein, and A. Ferret. 2012. Ruminal acidosis in feedlot cattle: Interplay between feed ingredients, rumen function and feeding behavior (a review). *Animal Feed Science and Technology* 172(1–2):66-79.
- Gozho, G., D. O. Krause, and J. C. Plaizier. 2007. Ruminal lipopolysaccharide concentration and inflammatory response during grain-induced subacute ruminal acidosis in dairy cows. *J Dairy Sci* 90(2):856-866.
- Gozho, G., J. C. Plaizier, D. O. Krause, A. D. Kennedy, and K. M. Wittenberg. 2005. Subacute ruminal acidosis induces ruminal lipopolysaccharide endotoxin release and triggers an inflammatory response. *J Dairy Sci* 88(4):1399-1403.

Bibliographie

- Grant, R., V. Colenbrander, and D. Mertens. 1990. Milk Fat Depression in Dairy Cows: Role of Silage Particle Size 1. *J Dairy Sci* 73(7):1834-1842.
- Greiner, M., D. Pfeiffer, and R. Smith. 2000. Principles and practical application of the receiver-operating characteristic analysis for diagnostic tests. *Preventive veterinary medicine* 45(1):23-41.
- Guatteo, R. 2004. La ruminocentèse chez les bovins. *Point vétérinaire* (243):58-59.
- Guo, Y., X. Xu, Y. Zou, Z. Yang, S. Li, and Z. Cao. 2013. Changes in feed intake, nutrient digestion, plasma metabolites, and oxidative stress parameters in dairy cows with subacute ruminal acidosis and its regulation with pelleted beet pulp. *J Anim Sci Biotechnol* 4(1):31.
- Gutierrez, A. M., K. Nobauer, L. Soler, E. Razzazi-Fazeli, M. Gemeiner, J. J. Ceron, and I. Miller. 2013. Detection of potential markers for systemic disease in saliva of pigs by proteomics: a pilot study. *Veterinary immunology and immunopathology* 151(1-2):73-82.
- Herman, N. 2012. Analyse de la composition du lait en France en 2005 et 2006: caractéristiques des productions et estimation de la prévalence de l'acidose ruminale chronique et la cétose subclinique à partir de l'étude des taux butyreux et protéiques. Thèse de Doctorat.
- Hou, Z.-g., Z.-y. Wang, T.-j. Chai, Y.-d. Jia, Q.-l. Gong, J. Ma, and Y.-t. Wang. 2008. Effects of forage to concentrate ratio on homeostasis of rumen and oxidative stress in cows. *Acta veterinaria et zootechnica sinica* 39(4):455.
- Inal, F., E. Gürbüz, B. Coşkun, and M. S. Alataş. 2015. A comparison of different analysis methods for milk urea nitrogen. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg* 21(5):767-772.
- INRA. 2010. Valeur alimentaire des fourrages et des matières premières: tables et prévisions. in *Alimentation des bovins, ovins et caprins. Besoins des animaux.* . Institut National de la Recherche Agronomique ed. Quae. Institut National de la Recherche Agronomique, Paris, France.
- Jarrige, R., Y. Ruckebush, C. Demarquilly, F. M.-H., and M. Journet. 1995. Nutrition des ruminants domestiques: ingestion et digestion. Pages 383-406 in *Nutrition des ruminants domestiques: ingestion et digestion.* Editions Quae.
- Josse, J. and F. Husson. 2012. Handling missing values in exploratory multivariate data analysis methods. *Journal de la Société Française de Statistique* 153(2):79-99.
- Kaur, R., S. Garcia, A. Horadagoda, and W. Fulkerson. 2010. Evaluation of rumen probe for continuous monitoring of rumen pH, temperature and pressure. *Animal Production Science* 50(2):98-104.
- Keefe, G. and T. H. Ogilvie. 1997. Comparison of oro-ruminal probe and rumenocentesis for prediction of rumen pH in dairy cattle. in *Proc. AABP Proceedings.*
- Kennelly, J. J., B. Robinson, and G. R. Khorasani. 1999. Influence of carbohydrate source and buffer on rumen fermentation characteristics, milk yield, and milk composition in early-lactation holstein cows. *J Dairy Sci* 82(11):2486-2496.
- Keunen, J. E., J. C. Plaizier, L. Kyriazakis, T. F. Duffield, T. M. Widowski, M. I. Lindinger, and B. W. McBride. 2002. Effects of a subacute ruminal acidosis model on the diet selection of dairy cows. *J Dairy Sci* 85(12):3304-3313.
- Khafipour, E., D. O. Krause, and J. C. Plaizier. 2009a. Alfalfa pellet-induced subacute ruminal acidosis in dairy cows increases bacterial endotoxin in the rumen without causing inflammation. *J Dairy Sci* 92(4):1712-1724.
- Khafipour, E., D. O. Krause, and J. C. Plaizier. 2009b. A grain-based subacute ruminal acidosis challenge causes translocation of lipopolysaccharide and triggers inflammation. *J Dairy Sci* 92(3):1060-1070.
- Kimura, A., S. Sato, H. Goto, N. Yamagishi, K. Okada, H. Mizuguchi, and K. Ito. 2012a. Simultaneous estimation of the pH of rumen and reticulum fluids of cows using a radio-transmission pH-measurement system. *Journal of Veterinary Medical Science* 74(4):531-535.

Bibliographie

- Kimura, A., S. Sato, T. Kato, K. Ikuta, N. Yamagishi, K. Okada, H. Mizuguchi, and K. Ito. 2012b. Relationship between pH and temperature in the ruminal fluid of cows, based on a radio-transmission pH-measurement system. *Journal of Veterinary Medical Science* 74(8):1023-1028.
- Kitkas, G., G. Valergakis, H. Karatzias, and N. Panousis. 2013. Subacute ruminal acidosis: prevalence and risk factors in Greek dairy herds. *Iranian Journal of Veterinary Research* 14(3):183-189.
- Kittelman, S., M. R. Kirk, A. Jonker, A. McCulloch, and P. H. Janssen. 2015. Buccal swabbing as a non-invasive method to determine bacterial, archaeal, and eukaryotic microbial community structure in the rumen. *Applied and environmental microbiology* 81(21):7470-7483.
- Kleen, J. 2004. Prevalence of subacute ruminal acidosis in Deutch dairy herds – A field study. Vol. PhD thesis. PhD thesis, Tierärztliche Hochschule Hannover, Germany.
- Kleen, J., G. A. Hooijer, J. Rehage, and J. P. Noordhuizen. 2003. Subacute ruminal acidosis (SARA): a review. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 50(8):406-414.
- Kleen, J., L. Ufgang, and J. Rehage. 2013. Prevalence and consequences of subacute ruminal acidosis in German dairy herds. *Acta Veterinaria Scandinavica* 55(1):48.
- Kleen, J. L. and C. Cannizzo. 2012. Incidence, prevalence and impact of SARA in dairy herds. *Anim Feed Sci Tech* 172(1):4-8.
- Klevenhusen, F., P. Pourazad, S. Wetzels, M. Kumar, A. Khol-Parisini, and Q. Zebeli. 2014. Technical note: Evaluation of a real-time wireless pH measurement system relative to intraruminal differences of digesta in dairy cattle. *J Anim Sci* 92(12):5635-5639.
- Kolver, E. and M. De Veth. 2002. Prediction of ruminal pH from pasture-based diets. *J Dairy Sci* 85(5):1255-1266.
- Krause, K., D. Combs, and K. Beauchemin. 2002a. Effects of forage particle size and grain fermentability in midlactation cows. II. Ruminal pH and chewing activity. *J Dairy Sci* 85(8):1947-1957.
- Krause, K. and D. K. Combs. 2003. Effects of Forage Particle Size, Forage Source, and Grain Fermentability on Performance and Ruminal pH in Midlactation Cows. *J Dairy Sci* 86(4):1382-1397.
- Krause, K., D. K. Combs, and K. A. Beauchemin. 2002b. Effects of Forage Particle Size and Grain Fermentability in Midlactation Cows. I. Milk Production and Diet Digestibility. *J Dairy Sci* 85(8):1936-1946.
- Krause, K. and G. Oetzel. 2005. Inducing subacute ruminal acidosis in lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 88(10):3633-3639.
- Krause, K. and G. R. Oetzel. 2006. Understanding and preventing subacute ruminal acidosis in dairy herds: A review. *Animal Feed Science and Technology* 126(3-4):215-236.
- Lampila, M. 1955. Preliminary studies on the variations of pH and volatile fatty acid concentration of the rumen contents of the cow. *Maataloustieteellinen Aikakauskirja* 27:142-153.
- Lamy, E. and M. Mau. 2012. Saliva proteomics as an emerging, non-invasive tool to study livestock physiology, nutrition and diseases. *J Proteomics* 75(14):4251-4258.
- Lane, G., C. Noller, V. Colenbrander, K. Cummings, and R. Harrington. 1968. Apparatus for obtaining ruminoreticular samples and the effect of sampling location on pH and volatile fatty acids. *J Dairy Sci* 51(1):114-116.
- Larousse, D. 2015. En ligne. consulté le 20 Août 2016 21.
- Lean, I., F. Annison, E. Bramley, G. Browning, P. Cusack, B. Farquharson, S. Little, and D. Nandapi. 2007. Ruminal acidosis—understandings, prevention and treatment. Australia. Australian Veterinary Association.
- Lechartier, C. and J. L. Peyraud. 2010. The effects of forage proportion and rapidly degradable dry matter from concentrate on ruminal digestion in dairy cows fed corn silage-based diets with fixed neutral detergent fiber and starch contents. *J Dairy Sci* 93(2):666-681.

Bibliographie

- Leonardi, C. and L. Armentano. 2003. Effect of quantity, quality, and length of alfalfa hay on selective consumption by dairy cows. *J Dairy Sci* 86(2):557-564.
- Lettat, A., P. Noziere, M. Silberberg, D. P. Morgavi, C. Berger, and C. Martin. 2012. Rumen microbial and fermentation characteristics are affected differently by bacterial probiotic supplementation during induced lactic and subacute acidosis in sheep. *Bmc Microbiol* 12.
- Li, S., E. Khafipour, D. Krause, L. González, and J. Plaizier. 2011. Effects of grain-pellet and alfalfa-pellet subacute ruminal acidosis (SARA) challenges on feeding behaviour of lactating dairy cows. *Can J Anim Sci* 91(2):323-330.
- Li, S., E. Khafipour, D. O. Krause, A. Kroeker, J. C. Rodriguez-Lecompte, G. N. Gozho, and J. C. Plaizier. 2012. Effects of subacute ruminal acidosis challenges on fermentation and endotoxins in the rumen and hindgut of dairy cows. *J Dairy Sci* 95(1):294-303.
- Liebich, H.-G., G. Dirksen, A. Arbel, S. Dori, and E. Mayer. 1987. Feed dependent changes of the ruminal mucosa of high producing dairy cows during the dry period and first eight weeks post partum. *Journal of Veterinary Medicine, Series A (Germany, FR)*.
- Lohölter, M., R. Rehage, U. Meyer, P. Lebzien, J. Rehage, and S. Dänicke. 2013. Evaluation of a device for continuous measurement of rumen pH and temperature considering localization of measurement and dietary concentrate proportion. *Applied Agricultural and Forestry Research*:61.
- Luan, S., K. Cowles, M. Murphy, and F. Cardoso. 2016. Effect of a grain challenge on ruminal, urine, and fecal pH, apparent total-tract starch digestibility, and milk composition of Holstein and Jersey cows. *J Dairy Sci* 99(3):2190-2200.
- Mao, S., R. Y. Zhang, D. S. Wang, and W. Y. Zhu. 2013. Impact of subacute ruminal acidosis (SARA) adaptation on rumen microbiota in dairy cattle using pyrosequencing. *Anaerobe* 24(0):12-19.
- Marguet, C. 2015. Etude épidémiologique de l'acidose ruminale subaigüe dans les élevages bovins laitiers français: prévalence, persistance et lien avec la production laitière. Thèse de Doctorat. ONIRIS-Ecole Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation, Nantes Atlantique.
- Martin, C., L. Brossard, and M. Doreau. 2006. Mécanismes d'apparition de l'acidose latente et conséquences physiopathologiques et zootechniques. *INRA Productions Animales* 19(2):93-108.
- Martin, C., G. Fonty, and B. Michalet-Doreau. 2002. Factors affecting the fibrolytic activity of the digestive microbial ecosystems in ruminants. *Research Signpost, Trivandrum, India*:1-17.
- Matscher, R., G. Borghi, and V. Beghelli. 1957. Sulla tecnica di determinazione del pH del contenuto ruminale.
- Maulfair, D., K. K. McIntyre, and A. J. Heinrichs. 2013. Subacute ruminal acidosis and total mixed ration preference in lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 96(10):6610-6620.
- Meignan, T., C. Lechartier, G. Chesneau, and N. Bareille. 2017. Effects of feeding extruded linseed on production performance and milk fatty acid profile in dairy cows: A meta-analysis. *J Dairy Sci* 100(6):4394-4408.
- Meissner, S., F. Hagen, C. Deiner, D. Günzel, G. Greco, Z. Shen, and J. R. Aschenbach. 2017. Key role of short-chain fatty acids in epithelial barrier failure during ruminal acidosis. *J Dairy Sci*.
- Mialon, M., C. Martin, F. Garcia, J. Menassol, H. Dubroeuq, I. Veissier, and D. Micol. 2008. Effects of the forage-to-concentrate ratio of the diet on feeding behaviour in young Blond d'Aquitaine bulls. *Animal* 2(11):1682-1691.
- Mohammed, R., D. Stevenson, P. Weimer, G. Penner, and K. Beauchemin. 2012. Individual animal variability in ruminal bacterial communities and ruminal acidosis in primiparous Holstein cows during the periparturient period. *J Dairy Sci* 95(11):6716-6730.
- Mohan, G., A. Kumar, and B. Naik. 2015. Effect of rumen fermentative disorders on physiological parameters in buffaloes. *Int J Vet Sci* 4(1):10-14.

Bibliographie

- Moher, D., A. Liberati, J. Tetzlaff, D. G. Altman, and P. Group. 2009. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. *PLoS medicine* 6(7):e1000097.
- Monteils, V., M. Rey, M. Silberberg, L. Cauquil, and S. Combes. 2012. Modification of activities of the ruminal ecosystem and its bacterial and protozoan composition during repeated dietary changes in cows. *J Anim Sci* 90:4431-4440.
- Morgante, M., C. Stelletta, P. Berzaghi, M. Gianesella, and I. Andrighetto. 2007. Subacute rumen acidosis in lactating cows: an investigation in intensive Italian dairy herds. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 91.
- Mouriño, F., R. Akkarawongsa, and P. Weimer. 2001. Initial pH as a determinant of cellulose digestion rate by mixed ruminal microorganisms in vitro. *J Dairy Sci* 84(4):848.
- Nagaraja, T. and M. Chengappa. 1998. Liver abscesses in feedlot cattle: a review. *J Anim Sci* 76(1):287-298.
- Nagaraja, T. and E. C. Titgemeyer. 2007. Ruminal acidosis in beef cattle: the current microbiological and nutritional outlook. *J Dairy Sci* 90 Suppl 1:E17-38.
- Nelson, A. and M. Cattell. 2001. Culling and laminitis: Real herds, real cows, real deaths. *Bovine Practitioner* 35(1):42-46.
- Neubauer, V., E. Humer, I. Kröger, T. Braid, M. Wagner, and Q. Zebeli. 2017. Differences between pH of indwelling sensors and the pH of fluid and solid phase in the rumen of dairy cows fed varying concentrate levels. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 102(1): 343-349
- Nocek, J. 1997. Bovine acidosis: implications on laminitis. *J Dairy Sci* 80(5):1005-1028.
- Nocek, J., W. Kautz, J. Leedle, and J. Allman. 2000. Altering diurnal pH and in situ digestion in dairy cows with ruminal supplementation of direct-fed microbials (DFM) and yeast. *J Dairy Sci* 83(Suppl 1):1242.
- Nordlund, K., N. B. Cook, and G. R. Oetzel. 2004. Investigation strategies for laminitis problem herds. *J Dairy Sci* 87:E27-E35.
- Nordlund, K. and E. Garrett. 1994. Rumenocentesis: a technique for collecting rumen fluid for the diagnosis of subacute rumen acidosis in dairy herds. *Bovine Practitioner* 28:109-109.
- Nordlund, K., E. F. Garrett, and G. R. Oetzel. 1995. Herd-based rumenocentesis-a clinical approach to the diagnosis of sub acute rumen acidosis.
- Nozière, P., I. Ortigues-Marty, C. Loncke, and D. Sauvant. 2010. Carbohydrate quantitative digestion and absorption in ruminants: from feed starch and fibre to nutrients available for tissues. *Animal* 4(7):1057-1074.
- Noziere, P., D. Sauvant, J.-L. Peyraud, J. Agabriel, R. Baumont, G. C. Hajar, P. Champciaux, M. Eugène, A. Ferlay, and A. Lamadon. 2016. Rénovation des systèmes d'unités d'alimentation pour les ruminants: Systali. Page 115 p. in Proc. Journées d'Animation des Crédits Incitatifs du Département de Physiologie Animale et Systèmes d'Élevage (JACI Phase 2016).
- Nydam, D. V., P. A. Ospina, J. A. McArt, G. Oetzel, and T. R. Overton. 2013. Monitoring Negative Energy Balance in Transition Dairy Cows for Herd Results. Pages 9-22 in Proc. of the 22nd Tri-State Dairy Nutrition Conference, Fort Wayne, Indiana, USA, 23-24 April 2013. Michigan State University.
- O'Grady, L., M. L. Doherty, and F. J. Mulligan. 2008. Subacute ruminal acidosis (SARA) in grazing Irish dairy cows. *The Veterinary Journal* 176(1):44-49.
- Oba, M. and M. Allen. 2003. Effects of corn grain conservation method on feeding behavior and productivity of lactating dairy cows at two dietary starch concentrations. *J Dairy Sci* 86(1):174-183.
- Oetzel, G. 2000. Management of dry cows for the prevention of milk fever and other mineral disorders. *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice* 16(2):369-386, vii.

Bibliographie

- Oetzel, G. 2007. Subacute ruminal acidosis in dairy herds: physiology, pathophysiology, milk fat responses, and nutritional management. Pages 89-119 in Proc. 40th Annual Conference, American Association of Bovine Practitioners.
- Offner, A., A. Bach, and D. Sauvant. 2003. Quantitative review of in situ starch degradation in the rumen. *Animal Feed Science and Technology* 106(1):81-93.
- Orpin, C. and K. Joblin. 1997. The rumen anaerobic fungi. Pages 140-195 in *The rumen microbial ecosystem*. Springer.
- Owens, F., D. Secrist, W. Hill, and D. Gill. 1998. Acidosis in cattle: a review. *J Anim Sci* 76(1):275-286.
- Penner, G., J. Aschenbach, G. Gäbel, and M. Oba. 2009a. Evaluation of a continuous ruminal pH measurement system for use in noncannulated small ruminants. *J Anim Sci* 87(7):2363-2366.
- Penner, G., J. R. Aschenbach, G. Gäbel, R. Rackwitz, and M. Oba. 2009b. Epithelial capacity for apical uptake of short chain fatty acids is a key determinant for intraruminal pH and the susceptibility to subacute ruminal acidosis in sheep. *The Journal of nutrition* 139(9):1714-1720.
- Penner, G., K. Beauchemin, and T. Mutsvangwa. 2007. Severity of ruminal acidosis in primiparous Holstein cows during the periparturient period. *J Dairy Sci* 90(1):365-375.
- Penner, G., K. A. Beauchemin, and T. Mutsvangwa. 2006. An evaluation of the accuracy and precision of a stand-alone submersible continuous ruminal pH measurement system. *J Dairy Sci* 89(6):2132-2140.
- Penner, G., M. Steele, J. Aschenbach, and B. McBride. 2011. Ruminant Nutrition Symposium: Molecular adaptation of ruminal epithelia to highly fermentable diets. *J Anim Sci* 89(4):1108-1119.
- Perfield, J., A. Lock, J. Griinari, A. Sæbø, P. Delmonte, D. Dwyer, and D. Bauman. 2007. Trans-9, cis-11 conjugated linoleic acid reduces milk fat synthesis in lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 90(5):2211-2218.
- Piperova, L., B. B. Teter, I. Bruckental, J. Sampugna, S. E. Mills, M. P. Yurawecz, J. Fritsche, K. Ku, and R. A. Erdman. 2000. Mammary lipogenic enzyme activity, trans fatty acids and conjugated linoleic acids are altered in lactating dairy cows fed a milk fat-depressing diet. *The Journal of nutrition* 130(10):2568-2574.
- Plaizier, J., D. O. Krause, G. N. Gozho, and B. W. McBride. 2008. Subacute ruminal acidosis in dairy cows: The physiological causes, incidence and consequences. *The Veterinary Journal* 176(1):21-31.
- Plaizier, J., A. Martin, T. Duffield, R. Bagg, P. Dick, and B. McBride. 1999. Monitoring acidosis in the transition dairy cow. *J Dairy Sci* 82(Suppl 1):110.
- Plaizier, J. C., E. Khafipour, S. Li, G. N. Gozho, and D. O. Krause. 2012. Subacute ruminal acidosis (SARA), endotoxins and health consequences. *Animal Feed Science and Technology* 172(1-2):9-21.
- Plaizier, J. C., S. Li, A. M. Danscher, H. Derakshani, P. H. Andersen, and E. Khafipour. 2017. Changes in Microbiota in Rumen Digesta and Feces Due to a Grain-Based Subacute Ruminal Acidosis (SARA) Challenge. *Microb Ecol*:1-11.
- Reis, L. F., A. H. Minervino, C. A. Araújo, R. S. Sousa, F. L. Oliveira, F. A. Rodrigues, E. Meira-Júnior, R. A. Barrêto-Júnior, C. S. Mori, and E. L. Ortolani. 2014. Comparison of rumen fluid pH by continuous telemetry system and bench pH meter in sheep with different ranges of ruminal pH. *The Scientific World Journal* 2014.
- Rémond, D., I. Ortigues, and J.-P. Jouany. 1995. Energy substrates for the rumen epithelium. *Proceedings of the Nutrition Society* 54(1):95-105.
- Roche, J., A. Sheahan, L. Chagas, and R. Boston. 2008. Change in plasma ghrelin in dairy cows following an intravenous glucose challenge. *J Dairy Sci* 91(3):1005-1010.

Bibliographie

- Rustomo, B., O. AlZahal, J. Cant, M. Fan, T. Duffield, N. Odongo, and B. McBride. 2006. Acidogenic value of feeds II. Effects of rumen acid load from feeds on dry matter intake, ruminal pH, fibre degradability and milk production in the lactating dairy cow. *Can J Anim Sci* 86(1):119-127.
- Sato, S., A. Ikeda, Y. Tsuchiya, K. Ikuta, I. Murayama, M. Kanehira, K. Okada, and H. Mizuguchi. 2012a. Diagnosis of subacute ruminal acidosis (SARA) by continuous reticular pH measurements in cows. *Veterinary Research Communication* 36(3):201-205.
- Sato, S., H. Mizuguchi, K. Ito, K. Ikuta, A. Kimura, and K. Okada. 2012b. Development and testing of a radio transmission pH measurement system for continuous monitoring of ruminal pH in cows. *Preventive veterinary medicine* 103(4):274-279.
- Sauvant, D. and D. Mertens. 2001. Empirical modeling of ruminal pH from dietary NDF and mean particle size. *J. Dairy Sci* 84:198-199.
- Sauvant, D., F. Meschy, and D. Mertens. 1999. Les composantes de l'acidose ruminale et les effets acidogènes des rations. *INRA Productions animales* 12:49-60.
- Sauvant, D. and J. Peyraud. 2010. Calculs de ration et évaluation du risque d'acidose. *INRA Productions animales* 23(4):333.
- Sauvant, D., P. Schmidely, J.-J. Daudin, and N. R. St-Pierre. 2008. Meta-analyses of experimental data in animal nutrition. *Animal* 2(8):1203-1214.
- Schanzenbach, C., D. Ilver, J. Blomgren, C. Jonasson, C. Johansson, A. Krozer, L. Ye, and B.-O. Rustas. 2017. Preparation and characterisation of a sensing system for wireless pH measurements in vivo, in a rumen of a cow. *Sensors and Actuators B: Chemical* 242:637-644.
- Schirmann, K., M. A. von Keyserlingk, D. Weary, D. Veira, and W. Heuwieser. 2009. Technical note: Validation of a system for monitoring rumination in dairy cows. *J Dairy Sci* 92(12):6052-6055.
- Schwartzkopf-Genswein, K., K. Beauchemin, D. Gibb, D. Crews Jr, D. Hickman, M. Streeter, and T. McAllister. 2003. Effect of bunk management on feeding behavior, ruminal acidosis and performance of feedlot cattle: A review. *Journal of animal science* 81:149-158.
- Shen, J., Z. Chai, L. Song, J. Liu, and Y. Wu. 2012. Insertion depth of oral stomach tubes may affect the fermentation parameters of ruminal fluid collected in dairy cows. *J Dairy Sci* 95(10):5978-5984.
- Shingfield, K., L. Bernard, C. Leroux, and Y. Chilliard. 2010. Role of trans fatty acids in the nutritional regulation of mammary lipogenesis in ruminants. *Animal* 4(7):1140-1166.
- Silberberg, M., F. Chaucheyras-Durand, L. Commun, M. M. Mialon, V. Monteils, P. Mosoni, D. P. Morgavi, and C. Martin. 2013. Repeated acidosis challenges and live yeast supplementation shape rumen microbiota and fermentations and modulate inflammatory status in sheep. *Animal* 7(12):1910-1920.
- Silberberg, M., B. Meunier, I. Veissier, and M. Richard. 2017. Continuous monitoring of cow activity to detect sub-acute rumen acidosis. in *Proc. European Conference on Precision Livestock Farming (ECPLF)*, Nantes, France.
- Smith, V. R. 1941. In vivo studies of hydrogen ion concentrations in the rumen of the dairy cow. *J Dairy Sci* 24(8):659-665.
- Soriani, N., E. Trevisi, and L. Calamari. 2012. Relationships between rumination time, metabolic conditions, and health status in dairy cows during the transition period. *J Anim Sci* 90(12):4544-4554.
- Sournia, J.-C. 1995. *Histoire du diagnostic en médecine*. Éditions de Santé.
- Steele, M., G. Vandervoort, O. AlZahal, S. E. Hook, J. C. Matthews, and B. W. McBride. 2011. Rumen epithelial adaptation to high-grain diets involves the coordinated regulation of genes involved in cholesterol homeostasis. *Physiological Genomics* 43(6):308-316.

- Stefańska, B., W. Nowak, J. Komisarek, M. Taciak, M. Barszcz, and J. Skomiał. 2016. Prevalence and consequence of subacute ruminal acidosis in Polish dairy herds. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 101(4):694-702.
- Steiner, S., A. Neidl, N. Linhart, A. Tichy, J. Gasteiner, K. Gallob, W. Baumgartner, and T. Wittek. 2015. Randomised prospective study compares efficacy of five different stomach tubes for rumen fluid sampling in dairy cows. *The Veterinary record* 176(2):50-50.
- Stone, W. 2004. Nutritional approaches to minimize subacute ruminal acidosis and laminitis in dairy cattle. *J Dairy Sci* 87:E13-E26.
- Stone, W. C. 1999. The effect of subclinical rumen acidosis on milk components. Pages 40-46 in *Proc. Proc. Cornell Nutr. Conf. Feed Manuf. Cornell University, Ithaca NY*.
- Tajik, J., M. G. Nadalian, A. Raofi, G. R. Mohammadi, and A. R. Bahonar. 2008. Prevalence of subacute ruminal acidosis in some dairy herds of Khorasan Razavi province, northeast of Iran. *Iranian Journal of Veterinary Research* 10(1): 28-32
- Tajik, J. and S. Nazifi. 2011. Diagnosis of subacute ruminal acidosis: a review. *Asian Journal of Animal Sciences* 5(2):80-90.
- Tapio, I., K. J. Shingfield, N. McKain, A. Bonin, D. Fischer, A. R. Bayat, J. Vilkki, P. Taberlet, T. J. Snelling, and R. J. Wallace. 2016. Oral Samples as Non-Invasive Proxies for Assessing the Composition of the Rumen Microbial Community. *Plos One* 11(3):e0151220.
- Theurer, C., O. Lozano, A. Alio, A. Delgado-Elorduy, M. Sadik, J. Huber, and R. Zinn. 1999. Steam-processed corn and sorghum grain flaked at different densities alter ruminal, small intestinal, and total tract digestibility of starch by steers. *J Anim Sci* 77(10):2824-2831.
- Trevisi, E., N. Jahan, G. Bertoni, A. Ferrari, and A. Minuti. 2015. Pro-inflammatory cytokine profile in dairy cows: consequences for new lactation. *Italian Journal of Animal Science* 14(3).
- Trevisi, E., A. Minuti, S. Cogrossi, P. Grossi, S. Ahmed, and P. Bani. 2014. Can a single rumen sample really diagnose SARA in commercial farms? *Anim. Prod. Sci.* 54(9):1268-1272.
- Vagnoni, D. and G. Oetzel. 1998. Effects of dietary cation-anion difference on the acid-base status of dry cows. *J Dairy Sci* 81(6):1643-1652.
- Van Soest, P., J. Robertson, and B. Lewis. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J Dairy Sci* 74(10):3583-3597.
- Villot, C., C. Martin, B. Meunier, M. Richard, and M. Silberberg. 2017a. Relative rumen pH thresholds to predict subacute ruminal acidosis (SARA) in dairy cows. in *Proc. European Conference on Precision Livestock Farming (ECPLF), Nantes*.
- Villot, C., B. Meunier, J. Bodin, C. Martin, and M. Silberberg. 2017b. Relative reticulo-rumen pH indicators for subacute ruminal acidosis detection in dairy cows. *Animal*:1-10.
- Vlaeminck, B., V. Fievez, S. Tamminga, R. Dewhurst, A. Van Vuuren, D. De Brabander, and D. Demeyer. 2006. Milk odd-and branched-chain fatty acids in relation to the rumen fermentation pattern. *J Dairy Sci* 89(10):3954-3964.
- Vlcek, M., J. Candrak, and R. Kasarda. 2016. Fat-to-protein ratio: Evaluation of metabolic disorders and milk yield. *Acta Agric. Slov.* 5:77.
- Weimer, P., G. Waghorn, C. Odt, and D. Mertens. 1999. Effect of Diet on Populations of Three Species of Rumen Cellulolytic Bacteria in Lactating Dairy Cows. *J Dairy Sci* 82(1):122-134.
- Wiese, B. I. 2017. Defining the risk, prevalence, and pathological threshold of low ruminal pH in feedlot cattle. *Thèse de Doctorat*.
- Woodford, S. and M. Murphy. 1988. Effect of Forage Physical Form on Chewing Activity, Dry Matter Intake, and Rumen Function of Dairy Cows in Early Lactation. *J Dairy Sci* 71(3):674-686.

Bibliographie

- Xiaoxiao, L. 2009. Evaluation of Kahne rumen sensors in fistulated sheep and cattle under contrasting feeding conditions. Thèse de Matser, Massey University, Palmerston North, New Zealand.
- Xu, Y. and Z. Ding. 2011. Physiological, biochemical and histopathological effects of fermentative acidosis in ruminant production: a minimal review. *Spanish Journal of Agricultural Research* 9(2):414-422.
- Yu, Z. and M. Morrison. 2004. Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples. *Biotechniques* 36(5):808-813.
- Zebeli, Q. and B. N. Ametaj. 2009. Relationships between rumen lipopolysaccharide and mediators of inflammatory response with milk fat production and efficiency in dairy cows. *J Dairy Sci* 92(8):3800-3809.
- Zebeli, Q., J. Dijkstra, M. Tafaj, H. Steingass, B. Ametaj, and W. Drochner. 2008. Modeling the adequacy of dietary fiber in dairy cows based on the responses of ruminal pH and milk fat production to composition of the diet. *J Dairy Sci* 91(5):2046-2066.
- Zebeli, Q., S. Dunn, and B. Ametaj. 2011. Perturbations of plasma metabolites correlated with the rise of rumen endotoxin in dairy cows fed diets rich in easily degradable carbohydrates. *J Dairy Sci* 94(5):2374-2382.
- Zebeli, Q. and B. U. Metzler-Zebeli. 2012. Interplay between rumen digestive disorders and diet-induced inflammation in dairy cattle. *Res Vet Sci* 93(3):1099-1108.
- Zebeli, Q., B. U. Metzler-Zebeli, and B. N. Ametaj. 2012. Meta-analysis reveals threshold level of rapidly fermentable dietary concentrate that triggers systemic inflammation in cattle. *J Dairy Sci* 95(5):2662-2672.
- Zou, K. H., A. J. O'Malley, and L. Mauri. 2007. Receiver-operating characteristic analysis for evaluating diagnostic tests and predictive models. *Circulation* 115(5):654-657.