

Université de Montréal

**Les variations de la phosphatémie chez les bovins laitiers**

par

Lisandro Montiel

Département de biomédecine vétérinaire

Faculté de médecine vétérinaire

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade  
Philosophiae Doctor ( Ph.D.)  
en sciences vétérinaires  
option biomédecine vétérinaire

Septembre, 2005

© Lisandro Montiel 2005





**Direction des bibliothèques**

**AVIS**

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

**NOTICE**

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée

## **Les variations de la phosphatémie chez les bovins laitiers**

Présentée par  
Lisandro Montiel

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes

Président du jury : Dr Jérôme Del Castillo

Directeur de recherche : Dr Armand V. Tremblay

Codirecteur de recherche : Dr Vincent Girard

Membre du jury : Dr Bruce D. Murphy

Examineur externe : Dr German David Mendoza Martinez (México)

Représentant du doyen : Dr Mario Jacques

## Résumé

Avec un groupe de 28 vaches nous avons démontré que la présence d'héparine, comme anticoagulant, n'a pas d'effet sur la valeur de la phosphatémie. La valeur de la phosphatémie d'échantillons de sang provenant des vaisseaux coccygiens est de  $1.85 \pm 0.35 \text{ mmole}\cdot\text{L}^{-1}$  chez des vaches laitières hautes productrices. Cette valeur chute significativement de 17 % si les échantillons sont prélevés dans la jugulaire. Deux heures après le repas, la phosphatémie tend à être plus élevée ( $P < 0.07$ ) que la phosphatémie avant le repas. Une valeur de la phosphatémie coccygienne inférieure à  $1.56 \text{ mmole}\cdot\text{L}^{-1}$  peut-être indicatrices d'un état d'hypophosphatémie et il devient nécessaire, pour une interprétation valable, de tenir compte du site de prélèvement des échantillons de sang.

Les phosphatémies de six vaches ont été mesurées, à chaque deux heures, pendant les dernières 48 heures de la période d'adaptation aux rations pour 6 répétitions du plan expérimental. L'analyse de ces données montrent la présence les variations ultradiennes, qui diminuent rapidement avec le nombre de vaches par groupe. À partir de quatre vaches, ces variations ne représentent que 26% de la variation standardisée de la série de phosphatémies. Le cycle circadien le plus important est le cycle nycthéral, c'est-à-dire la fréquence de deux cycles dans une série de 48h. La valeur de la phosphatémie varie jusqu'à  $0.6 \text{ mmole}\cdot\text{L}^{-1}$  entre le jour et la nuit. Le cycle exogène lié à la fréquence des repas est beaucoup moins important. On distingue une première augmentation vers 14h et une deuxième vers 22h, soit quatre heures après la distribution d'aliment. Un prélèvement quatre heures

après un repas surévalue la phosphatémie moyenne du groupe de vaches d'environ  $0.2 \text{ mmole}\cdot\text{L}^{-1}$ .

Nous avons réalisé des analyses quantitatives des cycles biologiques de six vaches soumissent à une infusion ruminale de sucrose et alimentées des rations à base de maïs chauffé, de maïs concassé ou de pulpe de betteraves. L'infusion ruminale de sucrose modifie significativement le cycle circadien de la phosphatémie et celui de la consommation de matière sèche. Nous avons démontré que l'infusion ruminale de sucrose provoque des réductions statistiquement significatives de l'ingestion, du temps de rumination et de la phosphatémie mais sans affecter la production de lait et de protéines du lait.

L'interprétation d'une valeur de la phosphatémie implique une connaissance du site et du moment du prélèvement au cours de la journée et la composition de la ration en hydrates de carbone influence aussi sa valeur. Les valeurs limites de référence de la phosphatémie devront être préparées en indiquant le site et le moment des prélèvements et les caractéristiques démographiques du groupe de vaches laitières de référence. D'autres études devraient être effectuées pour mieux comprendre les relations entre la valeur de la phosphatémie et le taux de phosphore dans la salive et la production laitière quotidienne.

## Mots clés

Phosphore inorganique, phosphatémie, bovin laitier, cycle biologique, jugulaire, vaisseaux coccygiens, profil métabolique, biodisponibilité intestinale.

## Abstract

Phosphorous blood concentration is commonly used to assess nutritional state of high productivity dairy cows. We measured the importance, on blood phosphorous level, of some preanalytical and biologic factors. In an experiment carried out on a total of 28 highly productive cows, we have shown that the use of heparin, an anti-coagulant, has no effect on the blood phosphorous concentration. An average value of  $1.85 \pm 0.35 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  was observed in samples taken from coccygian blood vessels while a 17% lower value was observed from jugular blood. In general, blood phosphorous concentrations was significantly higher ( $P < 0.07$ ) two hours following meals than before meals. Blood phosphorous level from coccygian vessels with a value lower than  $1.56 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  might indicate a state of hypophosphataemia.

The phosphorous blood level of six other cows was also measured every two hours for a period of 48 consecutive hours. This experiment was repeated six times on each cow. Results of this experiment demonstrated ultradian variations.

The most important cycle observed was the circadian cycle with a frequency of two complete cycles in every 48 hours period. It was shown that variation in blood phosphorous level between day and night values may reach  $0.6 \text{ mmole}\cdot\text{L}^{-1}$ . The exogenous cycle related to meal frequency was comparatively much less important. In this case, we observed an initial increase at 14h in the afternoon and a second one at 22h00 in the evening, i.e. approximately four hours following each feeding time. The values that are the most representative of the average blood phosphorous level were those taken before the first meal of the day and around 2h in the night. Samples

taken four hours following meals tended to over-evaluate blood phosphorous level when compared with the average value.

Quantitative analysis of the circadian cycles done on six cows submitted to ruminal infusion of saccharose during daytime and fed with rations composed different sources of carbohydrate - either flaked corn, grounded corn or beet pulp. We observed that saccharose infusion caused blood phosphorous concentration to raise significantly when compared to night level and that the source of carbohydrate also had a significant effect.

In conclusion, we demonstrated that, in order to interpret adequately values of blood phosphorous level, knowledge of the site of blood sampling, time of the day and source of carbohydrate in diet must be known. Consequently, we recommend that reference values for blood phosphorous level should be provided with the site of blood sampling and demographic characteristics of the cows used.

### Key words

Phosphorus inorganic, phosphataemia, dairy cow, biological cycle, jugular, vessels coccygeal, metabolic profile, biodisponibility intestinal

## Table des matières

Résumé .....	iii
Abstract .....	v
Table des matières .....	vii
Liste des tableaux .....	x
Liste des figures.....	xi
Liste des sigles et des abréviations.....	xii
Dédicace .....	xiv
Remerciements .....	xv
Introduction .....	1
Recension de la littérature .....	5
La phosphatémie et le phosphore alimentaire .....	5
Nutrition en phosphore chez la vache laitière .....	7
Généralités.....	7
Besoins journaliers en P de la vache laitière: .....	9
Les facteurs de variation des besoins d'entretien en phosphore .....	11
Déficience en phosphore chez la vache laitière.....	12
Excès de phosphore alimentaire .....	13
Le phosphore : un contaminant de l'environnement .....	14
Le métabolisme du phosphore.....	16
Les rôles du phosphore dans l'organisme .....	16
Relation entre le phosphore et le calcium .....	17
Économie du phosphore ruminale .....	19
Absorption intestinale du phosphore .....	20
Généralités:.....	20
Sites d'absorption du phosphore .....	21
Les facteurs modifiant l'absorption du phosphore à partir du tube digestif chez la vache laitière.....	22
Les routes d'excrétion du phosphore chez la vache laitière .....	23
Généralités.....	23
Composition de la salive en phosphore .....	25
La composition du fumier .....	27
La teneur en phosphore du lait .....	29
La phosphatémie.....	32
Généralité sur la phosphatémie .....	32
Les mécanismes de contrôle de la phosphatémie .....	33
Généralités.....	33
Absorption intestinale du PO <sub>4</sub> .....	34
Contrôle endocrinien .....	35
La formation et la résorption osseuse.....	36
Les rôles de la calcitonine (CT) .....	37
Les rôles du cholécalciférol (vitamine D 3) .....	38
Biochimie clinique chez les bovins laitiers .....	40
Généralités.....	40
Potentiel du profil métabolique pour estimer la phosphatémie.....	41
Variations de la phosphatémie et les valeurs de référence .....	43

Variations analytiques .....	43
Variations biologiques.....	44
Valeurs de référence .....	47
L'étude des cycles biologiques.....	48
Généralités.....	48
Composantes d'un rythme biologique : .....	50
Variation circadienne du phosphore sanguin chez la vache laitière.....	52
Biodisponibilité du phosphore alimentaire et pertes endogènes : .....	53
Généralités.....	53
Biodisponibilité des minéraux.....	56
Méthodes pour l'évaluation de la biodisponibilité. ....	57
Les stratégies nutritionnelles pour réduire l'excrétion du phosphore. ....	59
Généralités.....	59
Effet des hydrates de carbone sur la biodisponibilité du phosphore .....	61
Modification de l'activité ruminale par des infusions intra-ruminales de nutriments. ....	62
Biodisponibilité des hydrates de carbone .....	65
Les buts et les objectifs du programme de recherche.....	67
Article 1 : .....	69
Effect of anticoagulant, venipuncture site and time-related feeding on blood inorganic phosphorus in dairy cows.....	70
Abstract .....	70
Introduction .....	71
Material and methods .....	72
Effect of anticoagulant .....	72
Effect of venipuncture site and time after feeding .....	73
Biochemical analysis.....	73
Statistical analysis .....	74
Results .....	75
Effect of anticoagulant .....	75
Effect of venipuncture site and time after feeding .....	75
Discussion .....	75
Bibliographie .....	79
Article 2 : .....	81
Variations circadiennes et ultradiennes de la phosphatémie chez les bovins laitiers. .....	82
Sommaire.....	82
Introduction .....	83
Matériel et Méthodes : .....	84
Animaux et conditions de captivité:.....	84
Mesure de la phosphatémie .....	85
Statistiques.....	86
Résultats et discussion.....	87
Variations ultradiennes.....	88
Séries filtrées de la phosphatémie .....	90
Conclusion.....	94
Bibliographie .....	94

Article 3 : .....	97
Effects of type of carbohydrate supplementation and pattern of feed consumption on blood inorganic phosphorus in lactating dairy cows. ....	98
Résumé .....	98
Introduction: .....	99
Materials and methods.....	100
1- <i>Animals, experimental design and diets</i> .....	100
2- <i>Sample Collection and Analysis</i> .....	102
3- Statistical analysis .....	103
Results and Discussion:.....	105
<i>Voluntary feed intake, time spent ruminating, milk production and mean Pi ..</i>	105
<i>Periodogram of independent rhythm components</i> .....	106
Rhythm component .....	106
Relationships between DMI, T-RUM series and Pi values.....	107
Conclusions : .....	108
Bibliographie :.....	109
Discussion générale.....	117
Conclusions .....	128
Bibliographie.....	131

## Liste des tableaux

Tableau 1. Production et composition du fumier pour vache Holstein typique consommant 17.8 kg de matière sèche par jour et produisant 22.7 kg du lait (Van Horn et al. 1994).....	29
Tableau 2 Composition approximative du lait (modifié de Walstra et Jenness, 1984) .....	31
Tableau 3. Distribution approximative du phosphore dans le lait (modifié de Walstra et et Jenness, 1984).....	31
Tableau 4. Valeurs de référence de la phosphatémie chez les bovins.....	48
Article 1, Table 1. Plasma Pi concentrations from coccygeal (C) and jugular (J) venipunctures before and after the morning feeding.....	78
Article 2, Tableau 1. Description des rations alimentaires selon les traitements en % de la matière sèche consommée .....	85
Article 3, Table 1. Ingredients and analysis of diets used as treatments .....	112
Article 3, Table 2. Least square means of daily milk productions, daily time spent ruminating, daily dry matter intake and mean daily plasma Pi.....	113

## Liste des figures

Figure 1. Structure de l'acide phytique représentant les six phosphates avec les différentes possibilités d'interagir tant avec des cations métalliques comme avec des résidus des protéines. (Tirée de Leeson and Summers, 1997). .....	9
Figure 2. Schéma du devenir du phosphore alimentaire chez les bovins.....	14
Figure 3 . Schéma du bilan du phosphore chez une vache laitière.....	36
Figure 4 . Les sources des variations d'un paramètre sanguin.....	44
Figure 5. Illustration des paramètres d'une fonction rythmique .....	50
Article 1, Figure 1. . Regression analysis of plasma and serum Pi concentrations ...	78
Article 2, Figure 1. Variations de la phosphatémie sérique chez les bovins, aux deux heures pour une période de 48 h.....	88
Article 2, Figure 2. Effet du nombre de vache dans un échantillon groupé sur la proportion de la variation de la phosphatémie pendant 48h attribuée soit, aux cycles exogènes <sup>1</sup> , soit aux cycles ultradiens. ....	89
Article 2, Figure 3. Périodogramme (% de la variation totale standardisée par cycle) d'un groupe de quatre vaches échantillonnées pendant 48 h à trois reprises. ....	90
Article 2, Figure 4 : Cycles exogènes de la phosphatémie standardisée d'un groupe de quatre vaches mesurées à trois reprises .....	92
Article 2 - figure 4 : Cycles ultradiens de la phosphatémie standardisée d'un groupe de quatre vaches mesurées à trois reprises. La variation moyenne est de $\pm 0.15$ mmole L <sup>-1</sup> de plasma. ....	92
Article 3, Figure 1 : Periodograms plot (N=36) of 24 h chronological series for DMI (A), time spent ruminating (B) or Pi (C) with tops and bottoms of standard errors. Values are percentage of series sum of squares (SS). Frequencies significantly (P<0.05) modified by SI or TC are marked respectively with a * or a † .....	114
Article 3, Figure 2: Relationships between mean observed DMI and T-RUM (A) and individual noise-free time series (B) .....	115
Article 3, Figure 3 : Effect of intake (A) and rumination (B) on Pi values. Data are 24 h noise-free time-series representing ultradian dispersions .....	116

## Liste des sigles et des abréviations

ARC	Agricultural Research Council
AFRC	Agricultural and Food Research Council
CA	California
CCPA	Conseil Canadien de Protection des Animaux de laboratoire
CPAQ	Conseil des Productions Animales de Québec
IRDA	Institut de Recherche et de Développement en Agroenvironnement
NJ	New Jersey
NRC	National Research Council
PATLQ	Programme d'amélioration du Troupeau Laitière Québécois
SAS	Statistical Analysis System
USA	United States of America
ALB :	Albumine
AM :	Avant midi
ARN :	Acide ribonucléique
ATP :	Adénosine tri phosphate
BDP :	Binding Vitamin D Protein
°C :	Degrés Celsius
CAR :	Coefficient d'absorption réelle
CL <sup>-</sup> :	Chlorures
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> :	Bicarbonates
CMS :	Consommation de matière sèche
CT :	Calcitonine
g :	Gramme

$K^+$	: Potassium
Kg	: Kilogramme
MS	: Matière sèche
mL	: Millilitre
$mmole \cdot L^{-1}$	: Millimole par litre
N	: Azote
NDF	: Fibre détergent neutre
NS	: Non significative
P	: Phosphore
Pi	: Phosphore inorganique
pH	: $-\log [H^+]$
$PO_4$	: Phosphate
PTH	: Parathormone
RPM	: Révolution par minute
RTM	: Ration totale mélangée
TCA	: Acide trichloracétique

## **Dedicace**

A mis padres Mario Rodolfo Montiel Herrera y Maria Teresa Ramos Alas,  
con profundo agradecimiento por todo el amor que me han dado desde siempre

A mis hermanos José Rodolfo, Alfredo Alberto, Fidel Mauricio Ernesto y  
Maritza Roxana, con afecto

## Remerciements

J'aimerais remercier les personnes suivantes pour leur collaboration à la réalisation de ce travail :

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (México), qui m'a fourni l'appui nécessaire pour la réalisation de ce travail.

Dr Armand TREMBLAY directeur, pour les efforts et l'aide fournis tout au long de la réalisation de ce travail.

Dr Vincent GIRARD codirecteur, pour son importante contribution à la réalisation du projet de recherche et à la préparation des publications.

Dr Jérôme DEL CASTILLO, qui a toujours trouvé le temps pour me guider et m'aider à la réalisation de ce travail.

Dr Bruce MURPHY, pour avoir accepté participer à la révision du document.

Dr Germán MENDOZA qui ma toujours encourage à réussir ce travail

Dr Philippe BERTHIAUME, qui m'a fortement encouragé dans la réalisation de ce travail.

Dre Cécile CROST, qui m'a encouragé a la fin de ce travail.

## Introduction

Malgré l'utilisation des nouveaux outils de gestion du PATLQ, 70% du phosphore distribué au troupeau laitier se retrouve encore dans le fumier (CPAQ, 1998). Nous devons poursuivre le raffinement des méthodes de calculs et d'équilibre des rations en phosphore, tout en maintenant un état de santé optimal des vaches et une production laitière maximale du troupeau. Nous proposons de vérifier l'intérêt de la phosphatémie comme un indicateur d'un bon équilibre alimentaire en phosphore. Les profils sanguins, avec la valeur de la phosphatémie, peuvent être facilement utilisés en production laitière et ils auraient l'avantage de fournir l'information sans avoir recours aux collectes totales de fèces et d'urine. Une évaluation rapide de l'utilisation digestive du phosphore des aliments deviendrait un élément important pour les divers intervenants en production laitière. Chez les bovins laitiers, les données de la digestibilité du phosphore alimentaire sont des valeurs estimées et elles indiquent une excrétion fécale de 50% du phosphore alimentaire, indépendamment de la ration de base et des performances de production des vaches.

Les mesures de la biodisponibilité de phosphore alimentaire à l'aide de la méthode des bilans doivent tenir compte d'une importante excrétion salivaire du phosphore, une particularité physiologique chez les bovins. Des excès de phosphore alimentaire, de l'ordre de 30% à 100% des besoins ne provoquent pas d'effets néfastes sur le plan physiologique ou nutritionnel. L'excès d'apport alimentaire en phosphore se traduit par une augmentation de l'excrétion du phosphore dans les

fèces. L'évaluation et la réduction des rejets au niveau de la ferme impliquent une bonne connaissance des facteurs qui influent la digestibilité et les besoins en phosphore des vaches. Les rejets en phosphore d'une ferme laitière (en kilogrammes) dépendront de la quantité de phosphore consommée, de la source du phosphore alimentaire, du mode de conservation des aliments, de la biodisponibilité ou de la digestibilité du phosphore consommé, des teneurs de la ration en énergie, en protéines et en calcium, du stade de la lactation, de l'état de croissance des animaux et les teneurs en énergie, en protéines et en calcium de la ration.

Une meilleure connaissance des facteurs de variation du phosphore plasmatique ou de la phosphatémie sont nécessaires pour permettre l'utilisation des valeurs de ce paramètre comme des indicateurs de la biodisponibilité du phosphore alimentaire ou tout au moins du métabolisme et de l'état nutritionnel du phosphore chez les bovins laitiers.

Le taux de la phosphatémie est influencé par des facteurs autres que celui de la teneur de la ration en phosphore. Les travaux de plusieurs chercheurs ont mis en évidence que le phosphore plasmatique varie, chez les bovins laitiers, en fonction de l'âge, de la production laitière, du stade physiologique, de la saison et de la race, etc. Le phosphore plasmatique subit des variations selon le site du prélèvement et des méthodes analytiques utilisées et selon le moment de la journée.

Les deux hypothèses qui sont vérifiées dans cette étude sont, premièrement, que les facteurs reliés aux modalités de prélèvements des échantillons de sang peuvent entraîner des erreurs d'interprétation de la phosphatémie et, deuxièmement, que la valeur de cette dernière, chez les bovins laitiers varie en fonction du taux d'ingestion du phosphore alimentaire. L'importance de certains facteurs de variations préanalytiques et biologiques de la phosphatémie est mesurable et, d'autre part, que la phosphatémie, chez les bovins laitiers varie en fonction de la disponibilité du phosphore intestinal.

Les objectifs de l'étude sur la phosphatémie, sont d'évaluer l'impact des modalités de prélèvement sanguins, de vérifier la présence d'un cycle biologique et d'examiner les effets de la composition de la ration et d'une manipulation de l'activité ruminale.

Les objectifs de la première partie de l'étude sont :

- 1- d'étudier l'effet de la présence d'un anticoagulant lors des prélèvements sanguins;
- 2- d'étudier la variation de la phosphatémie en fonction du site de ponction coccygienne ou de la jugulaire afin d'établir un moyen de différencier entre ces deux types d'échantillons et
- 3- d'évaluer la variation biologique de la phosphatémie en fonction du délai entre le repas et de la prise d'échantillon.

Les objectifs de la deuxième partie de cette étude sont :

- 1- de caractériser l'importance d'un cycle circadien et de cycles exogènes de la phosphatémie et
- 2- de déterminer l'effet des regroupements d'échantillons pour réduire les variations ultradiennes.

Les objectifs de la troisième partie de l'étude sont de mesurer les effets sur la phosphatémie, l'ingestion et la production laitière de

- 1- l'infusion ruminale de sucrose et
- 2- l'utilisation, dans la ration, de trois sources d'hydrates de carbone avec des vitesses variables de fermentation ruminale.

## **Recension de la littérature**

### ***La phosphatémie et le phosphore alimentaire***

Le sang est un fluide biologique facile à obtenir et les valeurs sériques, plasmatiques et du sang total sont utilisées pour des études d'évaluation de l'état nutritionnel minéral. Les concentrations en phosphore de la salive (Clark et al., 1973), du tissu osseux (Williams et al., 1990), des fèces (Cohen, 1974) et du poil (Cohen, 1973a; Cohen, 1973b) ont été utilisés comme indicateurs de l'état nutritionnel en phosphore.

L'utilisation de paramètres sanguins pour évaluer l'état nutritionnel et métabolique des bovins laitiers est un concept introduit au cours des années 1970 (Payne, 1970). Plusieurs études suggèrent que cette méthode permet un suivi plus efficace de la santé des vaches laitières (Eicher et al., 1999 ; Eicher et al., 1998 ; Herdt, 2000 ; Kelly, 1997; Tremblay, 1996 ; Whitaker, 1997). Mais l'utilisation du profil métabolique demande une mise au point qui inclue la standardisation des modalités de prélèvement et la détermination de valeur de références.

La phosphatémie est influencée par des facteurs autres que le taux de phosphore de la ration (Mylrea et Bayfield, 1968 ; Teleni et al., 1976). Chez les bovins laitiers, elle varie selon certains facteurs biologiques comme: l'âge, l'importance de la production laitière, le stade physiologique, la saison et la race (Lane et al., 1968 ;

Hewett, 1974 ; McAdam et O'Dell, 1982; Payne et Payne, 1987). Il est aussi à souligner que la phosphatémie semble connaître des variations diurnales (Forar et al., 1982).

Depuis plus de vingt ans, le laboratoire de biochimie clinique de la Faculté de Médecine Vétérinaire interprète une valeur de la phosphatémie plus petite que  $1.65 \text{ mmole}\cdot\text{L}^{-1}$  comme un état de subcarence en phosphore alimentaire et une indication de proposer un ajout de phosphore à la ration pour corriger la situation (Tremblay, 1996). Le phosphore alimentaire a longtemps été rapporté à tort ou à raison comme étant associé avec l'efficacité de la reproduction de vaches fortes productrices. Les observations cliniques laissaient croire que l'ajout de phosphore à la ration semble améliorer l'expression de l'oestrus et réduire le nombre de saillies par conception.

Il y a peu de travaux confirmant ces observations cliniques, mais beaucoup ont démontré l'absence de relation entre d'une part la production laitière et l'efficacité de la reproduction et d'autre part le taux de phosphore de la ration. Le NRC a proposé en 2001 que les recommandations de la teneur en phosphore dans la ration des vaches en lactation soit de 0.38% (NRC, 2001), par rapport à 0.48% recommandé en 1989 (NRC, 1989). Cette stratégie vise principalement la réduction du phosphore fécal, mais les effets métaboliques généraux et les mécanismes d'ajustement particuliers de la phosphatémie déployés pour faire face à cette réduction du phosphore alimentaire sont peu documentés. Il est par ailleurs démontré que les mécanismes d'homéostasie du phosphore dans l'organisme ne dépendent pas uniquement de sa teneur dans la ration (Goff, 1998; Reinhardt et al., 1988).

## **Nutrition en phosphore chez la vache laitière**

### **Généralités**

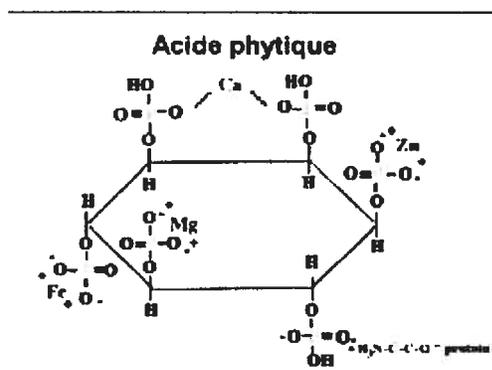
Le phosphore de la ration des bovins laitiers est l'un des éléments nutritifs nécessaires à la croissance des os, au métabolisme énergétique et à la production de lait. On en trouve dans chaque cellule de l'animal et il est un élément important dans l'équilibre acido-basique du milieu extracellulaire. Le phosphore est un élément majeur nécessaire dans plusieurs fonctions métaboliques et c'est un élément de la structure des acides nucléiques, de plusieurs protéines, des phospholipides et de différents glucides (Underwood et Suttle, 1999). Les micro-organismes du rumen ont également un besoin important en phosphore pour assurer leur propre développement et pour réussir une la digestion optimale de la cellulose et de l'hémicellulose. On évalue donc que les besoins de la biomasse ruminale peuvent atteindre jusqu'à 5 grammes de phosphore par kilogramme de matière sèche ingérée (Durand et Komisarczuk, 1988).

Le phosphore est souvent emmagasiné dans les végétaux sous la forme de phosphates liés, dont une des principales formes est le phytate de l'acide phytique (Figure 1). Le phytate, l'acide phytique, ou *Myo-inositol 1,2,3,4,5,6-hexakis dihydrogène phosphate* (IP6) est un phosphate organique produit par la phosphorylation des sucres (Angel et al., 2002). Le phytate, dont la molécule contient 28.2% de P (Ravindran et al., 1995), constitue de 1 à 3 % du poids des graines de céréales et des oléagineuses utilisées dans l'alimentation des animaux (Cheryan,

1980). En plus de jouer un rôle important dans le stockage du P, le phytate permet aussi de fixer différents cations. En effet, par sa charge négative, le phytate peut chélater les cations divalents ou trivalents tel que le zinc ( $Zn^{++}$ ), le fer ( $Fe^{++}$ ), le cuivre ( $Cu^{++}$ ), le magnésium ( $Mg^{++}$ ), le potassium ( $K^+$ ) et le calcium ( $Ca^{++}$ ) pour former des complexes peu solubles dans l'eau (Wise, 1995 ; Maenz et al., 1999).

Le phosphore des phytates ne peut pas être assimilé par les animaux et il doit être décomposé. Dans le tractus digestif des animaux, ce phosphore des phytate fixe des minéraux essentiels et d'autres éléments nutritifs, ce que diminue leurs biodisponibilités respectives et prive les animaux de leurs bienfaits. Dans sa forme basique, le phytate est la plus abondante source de phosphore d'origine végétale, constituant plus de 80% du phosphore total des céréales et des fourrages. Puisque l'hydrolyse du phytate est de grande importance dans les systèmes biologiques, il existe dans la nature un type d'enzyme spécifique, les phytases, capable de déphosphoryler ce type de substrat.

Figure 1. Structure de l'acide phytique représentant les six phosphates avec les différentes possibilités d'interagir tant avec des cations métalliques comme avec des résidus des protéines. (Tirée de Leeson and Summers, 1997).



Les phytases sont très répandues dans la nature, tant chez les micro-organismes et les plantes que chez les animaux, où ils sont présents dans certains tissus. La flore ruminale produit des phytases permettant de la libération de phosphore inorganique (Pi) et du myo-inositol libre (non phosphaté), un important facteur de croissance pour la flore. D'autre part, l'hydrolyse du phytate libère aussi de cations qui seraient liés au phytate (Kornegay, 2001).

### **Besoins journaliers en P de la vache laitière:**

Le NRC (le Conseil national de recherche), un organisme non gouvernemental américain sans but lucratif dont le mandat consiste à rassembler les scientifiques de tous horizons pour favoriser l'avancement de la connaissance et conseiller le gouvernement fédéral américain a réalisé, en 1997, une revue exhaustive des études publiées depuis la parution de la dernière édition, qui datait de 1989, afin de réviser

les besoins nutritionnels chez la vache laitière. Le nouveau guide pour cette espèce a été publié en 2001.

Pour se conformer aux nouvelles normes environnementales, il est nécessaire de considérer les recommandations d'apport en phosphore à la fois sous l'angle d'une connaissance plus précise des besoins des animaux et dans un optique de maîtrise des rejets polluants. Les besoins en phosphore sont calculées par la méthode factorielle, c'est à dire que la quantité totale du phosphore, que doit absorber une vache pour combler ses besoins, dépend des quatre principaux facteurs (NRC, 2001). Les besoins d'entretien sont de 1g par kg de matière sèche ingérée chez la vache adulte. Les besoins de croissance se situent à 6.8 g / kg de grain de poids chez les bovins de 300 à 600 kg. La gestation exige un supplément de phosphore pour le développement du squelette du fœtus après 190 jours de gestation, qui va de 1,5 g/j de P et jusqu'à 6,0 g /j juste avant le vêlage. Finalement, les besoins de production de la production laitière standardisée à 4% de matières grasses sont de 0,90 g pour toutes les races (NRC, 2001).

Les paramètres les plus sensibles de l'approche factorielle sont les besoins d'entretien et l'efficacité de l'utilisation digestive du phosphore ou coefficient d'absorption réelle (CAR). Ces paramètres ont été réexaminés par de nouvelles données expérimentales. Par ce que les besoins d'entretien en P apparaît fortement dépendant de l'excrétion salivaire, on utilise le taux de matière sèche ingérée et non du poids vif des bovins comme antérieurement (NRC, 1989).

## **Les facteurs de variation des besoins d'entretien en phosphore**

Les besoins en phosphore (g par jour) pour la production laitière sont fonction de la quantité de lait produit par jour, multipliée par la teneur en phosphore du lait. Cette dernière varie en fonction des études : il se situe entre 0.083 et 0.085% selon Wu et al. (2000), ou entre 0.087 à 0.089 % selon Spikers et al. (1993). Pour leur part, le NRC (2001) et l'AFRC (1991) proposent la valeur cible de 0.090 % de phosphore du lait soit 0.90 g par kg du lait produit.

L'efficacité de l'absorption du phosphore tend à diminuer au fur et à mesure que sa concentration augmente dans la ration (Challa et al., 1989). Lorsque la ration contient un taux de phosphore égal aux recommandations du NRC (2001), l'efficacité d'absorption (coefficient d'absorption) des sources inorganiques est significativement plus élevée chez les bovin (83%) que chez les ovins (74%) (Challa et al., 1989; Braithwaite, 1983). Le phosphore intestinal provient des aliments et surtout des la sécrétions salivaires. Le phosphore apporté par les sécrétions salivaires représente plus du double de celui d'origine alimentaire, et il est hautement biodisponible. Le coefficient d'absorption du phosphore des sécrétions salivaires est 68 à 81% chez le veau (Challa et al., 1989).

## Déficiência en phosphore chez la vache laitière

Une carence en phosphore alimentaire peut perturber la production de lait, la consommation d'aliments et le rendement de l'animal. Dans une expérience réalisée par le groupe de Wu (2000a), la production de lait, la performance reproductive et les excréments fécaux ont été mesurés chez 3 groupes des vaches nourries avec différents apports en phosphore, soit 0,31%, 0,39% et 0,47 % de matières sèches. Dans cette expérience, le régime contenant 0,31% de P s'est accompagné d'une production de lait égale à celle des deux régimes à teneur plus élevée en P pendant seulement les deux premiers tiers de la lactation. Chez le groupe de vaches recevant moins de phosphore alimentaire, la production de lait était d'environ 3,3 kg par jour plus faible que chez les autres groupes de vaches en lactation. Ce résultat a été comparé à ceux d'autres études qui ont démontré que la production de lait diminuait quand l'apport alimentaire en phosphore était réduit intentionnellement à un niveau plus bas que ce qui est requis, soit de 0,24 à 0,30% de matières sèches. Cette situation est possible chez les bovins au pâturage nourris avec les fourrages produits sur des sols pauvres en phosphore ou chez des animaux consommant de foin très matures ou des résidus des cultures dont les taux de phosphore est inférieur à 0,25% MS.

Les signes cliniques de carences chroniques en phosphore sont non spécifiques : de l'inappétence, une vitesse de croissance réduite et une diminution de la performance laitière (Call et al. 1987; Karn, 2001). Ces signes cliniques sont très souvent associés avec d'autres déficiences alimentaires comme celles en énergie ou

en protéines. Dans les cas de déficience sévère en phosphore, on observe une réduction de la masse et de la résistance osseuse. Les manifestations cliniques de carence sévères en phosphore incluent un état d'hypophosphatémie sévère, du rachitisme chez les jeunes animaux et de l'ostéomalacie chez les animaux adultes (Shupe et al., 1988; Herdt, 2000).

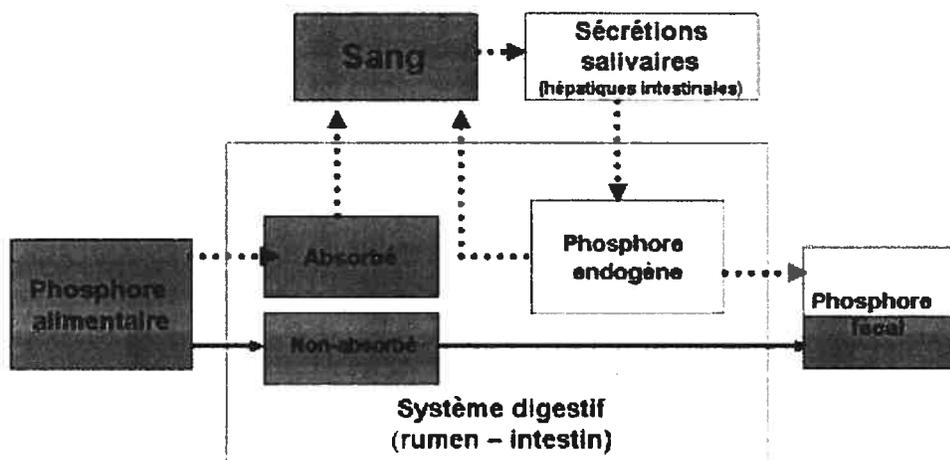
### **Excès de phosphore alimentaire**

L'excès de phosphore alimentaire, a long terme, peut avoir des effets négatifs sur le métabolisme du calcium, en induisant une forte réabsorption osseuse, une calciurie et une plus grande prévalence de lithiases urinaires (ARC, 1980). En général, les problèmes de toxicité phosphore sont associés à une déficience alimentaire en calcium. De fortes doses orales de supplément à base de phosphore, ne sont pas considérées comme hautement toxiques, mais sont responsables de diarrhée bénignes et de douleurs abdominales.

Le métabolisme du phosphore chez les vaches laitières (Figure 2) est bien adapté aux situations d'excès du phosphore alimentaire: on note une grande capacité d'excrétion salivaire et d'élimination par les fèces ce qui leur permet de maintenir le phosphore sanguin à l'intérieur des valeurs de références (Challa et al., 1989). L'excrétion urinaire du phosphore peut aussi être augmentée si l'ajustement salivaire n'est pas suffisant et que la phosphatémie est très élevée (Tomas et Somers, 1974 ; Sato, 1975)

On illustre, à la figure 2, le provenance du phosphore fécal chez le ruminants. Le phosphore, présent dans les fèces, provient d'une part du phosphore alimentaire non absorbé lors de son transit dans le tractus digestif et d'autre part des sécrétions des diverses glandes du système digestif principalement les glandes salivaires. Chez les ruminants la composition de la salive en phosphore et la quantité de salive ajoutée au fluide ruminal assure une stabilité du pH ruminal et intervient d'une manière importante dans l'homéostasie du phosphore surtout lors d'un excès d'apport alimentaire.

Figure 2. Schéma du devenir du phosphore alimentaire chez les bovins



### Le phosphore : un contaminant de l'environnement

Depuis les 10 dernières années, plusieurs de travaux de recherche ont démontré que le phosphore alimentaire est la source principale de phosphore du lisier qui

contamine les eaux de surface (Tamminga, 1996; Morse, 1996; Valk et al., 2000). De l'étude de Morse, (1992), on peut retenir comme élément important la relation directement proportionnelle qui existe, chez les bovins laitiers, entre la consommation de phosphore et la proportion de celui-ci excrétée dans les fèces. Tout dépassement au-delà des besoins conduit à augmenter la quantité du phosphore rejeté.

La plupart des organismes nationaux en matière de d'alimentation pour les bovins laitiers ont révisé à la baisse les recommandations pour les teneurs en phosphore, passant de 0,46% à 0,32% de la ration (NRC, 2001). L'application de cette nouvelle norme du phosphore par les nutritionnistes est en grande partie liée à une préoccupation environnemental et non à une correction de l'état nutritionnel des bovins laitiers. Cette révision importante des recommandations alimentaires en phosphore est à l'origine d'un grand nombre de travaux sur les méthodes d'évaluation de l'état nutritionnel des vaches laitières en phosphore et surtout chez les vaches hautes productrices (Valk et Sebek, 1999 ; Wu et al., 2001). Des excès de phosphore alimentaire, de l'ordre de 30% à 100% des besoins ne provoquent pas d'effets physiologiques ou nutritionnels. L'excès d'apport au cours de toute la période de lactation se traduit par une augmentation de l'excrétion du phosphore dans les fèces (Morse et al., 1992 ; Wu et al., 2000b).

Les défis actuels des nutritionnistes sont, d'une part, de réussir à augmenter la biodisponibilité des nutriments de la ration des vaches laitières et, d'autre part de réussir à réduire les rejets polluants dans l'environnement (NRC, 2001). Les rations des vaches hautes productrices devront mieux combler les besoins nutritionnels, mais

avec des rejets minimaux surtout pour le phosphore, l'azote et le potassium. La ration optimale pour les bovins laitiers est celle qui apporte les nutriments en quantité suffisante pour maximiser la fermentation ruminale et pour assurer la croissance maximale des microorganismes du rumen tout en optimisant le volume de lait et la synthèse des composantes du lait, et en minimisant la perte de nutriments dans l'environnement (NRC, 2001).

Par ailleurs, on a démontré que la mise en œuvre d'une stratégie visant à répondre de manière plus exacte aux besoins des vaches en phosphore est avantageuse pour l'environnement. En effet, en réduisant le phosphore alimentaire de 0,50% à 0,40%, pour une vache qui consomme 25 kg de matières sèches par jour, on peut économiser 25 g de P par vache par jour. Outre les avantages pour l'environnement, la réduction du phosphore alimentaire peut avoir un effet positif sur la marge bénéficiaire du producteur. En effet, les études alimentaires démontrent qu'il est possible de réaliser des économies de 15 à 20 \$ par vache par année sur les achats de suppléments minéraux (Rotz et al., 2002).

## ***Le métabolisme du phosphore***

### **Les rôles du phosphore dans l'organisme**

Plus de 90% du phosphore chez les mammifères se retrouve sous la forme de cristaux d'hydroxyapatite fixés à la matrice minérale osseuse. L'autre partie du phosphore, soit 10%, se trouve dans les tissus mous comme constituants du milieu

intracellulaire. Le phosphate est le principal anion intracellulaire de plusieurs composés organiques, entre autres les phospholipides, les acides nucléiques, les phosphoprotéines et le triphosphate d'adénosine (ATP). Le phosphore inorganique joue un rôle essentiel dans plusieurs processus métaboliques comme le métabolisme énergétique, le transport de l'oxygène vers les tissus, la contraction musculaire et le métabolisme du tissu osseux (Rosol et Capen, 1997).

Chez les ruminants la microflore ruminale requiert elle aussi du phosphore pour assurer de manière optimale les métabolismes bactériens et l'activité ruminale de digestion des aliments (Bryant et al., 1959); et le contenu total en phosphore des microorganismes du rumen varie entre 2-6% sur une base de matière sèche (Komisarcsuk-Bony et Durand, 1991).

### **Relation entre le phosphore et le calcium**

Il existe une relation étroite entre les mécanismes et physiologiques de contrôle des taux sanguins et tissulaires du phosphore et du calcium (Georgievski, 1982). En effet lorsque le taux de calcium alimentaire dépasse de beaucoup les recommandations, on s'attend à une forte réduction de l'absorption de phosphore intestinal (AFRC, 1991).

L'effet d'une augmentation des taux de calcium alimentaire a été étudié avec des rations caractérisées par des ratios alimentaires variables du calcium/phosphore allant de 0.60 à 3.60 (Field et al., 1983). L'efficacité de l'absorption du phosphore

chez les ovins était réduite proportionnellement à l'augmentation du calcium alimentaire. Pour ces expériences, le taux du calcium alimentaire respectait les recommandations de l'ARC (1980). Plusieurs études rapportent des résultats des effets de la consommation de rations avec des taux variables de Ca:P dans la ration. Chez des vaches en début lactation; les vaches alimentées avec des rations contenant des ratios calcium/phosphore de 1:1, 4:1 ou 8:1 (Smith et al., 1966), ou de 3:1 et 1:5 (Steevens et al., 1971) ne présentent aucune différence significative pour la production laitière, la persistance de la lactation et pour les principaux indices de la performance de reproduction.

Les variations de la phosphatémie sont expliquées par des changements du taux d'absorption ou de réabsorption du phosphore intestinal en raison de la très grande stabilité du rapport calcium/phosphore du tissu osseux. Ce dernier reste la plus importante réserve de phosphore de l'organisme. La mobilisation du phosphore osseux est sous la dépendance endocrinienne de la PTH.

Contrairement aux monogastriques, les ruminants tolèrent mieux les effets des rations Ca/P alimentaires variant entre 1:1 et 1:7 (McDowell, 1992). Selon la guide du NRC 2001, il semble que le ratio Ca/P alimentaire n'est important que si l'apport d'un des deux éléments est déficient.

## Économie du phosphore ruminale

Le phosphore ruminal provient d'une part du phosphore alimentaire et d'autre part du phosphore salivaire. Ce dernier constitue environ 80% du phosphore endogène recyclé par le tractus gastro-intestinal, l'autre fraction provient de la voie biliaire, du suc pancréatique et des sécrétions intestinales. La fraction du phosphore endogène recyclé par les glandes salivaires dépend de la consommation volontaire de matière sèche, de l'ingestion en phosphore et de la teneur en fibre efficace de la ration (Care, 1994). Avec des rations riches en fibre, la sécrétion salivaire du phosphore augmente, bien que la concentration en phosphore de la salive diminue.

Les bactéries, les protozoaires et les champignons ont besoins de phosphore pour maintenir leur métabolisme et leur croissance (Komisarcsuk-Bony et Durand, 1991). Le contenu total en phosphore des microorganismes du rumen varie entre 2% et 6% du phosphore de la matière sèche ruminale. Selon les travaux de Komisarcsuk-Bony et Durand (1991), la dégradation optimale des parois cellulaires des plantes et la synthèse optimale de protéines microbiennes nécessitent un apport d'au moins 5g de phosphore/kg de matière organique fermentée en phosphore biodisponible. Le phosphore d'origine alimentaire et celui d'origine salivaire sont capables de combler ces besoins.

## Absorption gastro-intestinale du phosphore

### Généralités:

La quantité de phosphore intestinal absorbé varie selon la quantité ingérée, le rapport calcium/phosphore de la ration, l'état nutritionnel en vitamine D, le pH intestinal, l'âge de l'animal, l'apport total en minéraux et en lipides (Barlet et al., 1995 ; Soares, 1995 ). Les bovins absorbent le P intestinal par diffusion passive et par transport actif et ce selon l'apport alimentaire (Breves et Schorder, 1991; Barlet et al., 1995).

L'absorption du phosphore intestinal dépend de sa solubilité au point de contact avec des membranes absorbantes des entérocytes (McDowell, 1992 ) et elle est plus importante dans des conditions d'acidité comme celles rencontrées dans le duodénum. L'absorption est stimulée par un gradient du pH à travers les membranes des entérocytes à bordure en brosse (Breves et Schorder, 1991; Yano et al., 1991 ; Care, 1994). Bien que l'hypophosphatémie ne change pas les taux sanguins de vitamine D, deux équipes de chercheurs (Breves et Schorder, 1991 ; Care, 1994) ont suggéré, chez les ruminants en état de carence, une relation possible entre l'absorption active du phosphore intestinal et les taux de vitamine D plasmatique. Cependant, ce mécanisme n'est pas encore bien compris.

Lorsque l'apport alimentaire en phosphore dépasse les besoins des animaux, l'efficacité de l'absorption intestinale diminue (Morse et al., 1992 ; Care, 1994). Challa et al. (1989) ont rapporté une absorption de 50 % à 60% du phosphore présent dans les aliments de la ration de base, de 75 à 85% du phosphore salivaire et de 80% à 90% des sources inorganiques phosphore. Il existe aussi une relation entre la forme physique (longueur des particules alimentaires) et l'efficacité de l'absorption du phosphore intestinal. L'absorption est plus importante lorsque les segments de foin dépassent 6 cm de longueur que lorsque le foin est coupé en segments de 1.3 et 0.2 cm (Yano et al., 1991). Ces observations peuvent être expliquées pour la quantité de salive sécrétée, qui dépend de la longueur et du taux de NDF (fibre détergent neutre) de l'aliment (Khorasani et al., 1997). Ces résultats semblent donc être reliés à une forte production de salive et à une augmentation du phosphore disponible dans le duodénum (Yano et al., 1991).

### **Sites d'absorption du phosphore**

Chez les ruminants, le phosphore inorganique (Pi) est principalement absorbé dans le duodénum et le jéjunum (Yano et al., 1991). L'absorption du phosphore à travers la paroi ruminale fait encore l'objet d'une grande controverse. Il est très difficile de déterminer l'importance de l'absorption ruminale du phosphore alimentaire et salivaire (Yano et al., 1991 ). Plusieurs techniques ont été appliquées pour l'étude, chez l'ovin, du rôle du réticulo-rumen, du feuillet et de la caillette dans l'absorption du phosphore. On a utilisé des bilans alimentaires (Tomas, 1974), des sections d'intestins isolées (Care, 1980 ; Scott et al., 1984a, Scott et al., 1984b), du

phosphore radioactif (Braithwaite, 1983) et des mesures de différences artérioveineuses en phosphore (Matsui et al., 1983). Les résultats obtenus de ces études diffèrent grandement les uns des autres. Certains chercheurs ne trouvent pas de flux du phosphore travers les parois du rumen, tandis que des autres ont mis en évidence une absorption nette ou une sécrétion nette vers le contenu du réticulo-rumen.

### **Les facteurs modifiant l'absorption du phosphore à partir du tube digestif chez la vache laitière**

L'efficacité de l'absorption de Pi varie entre 20 et 95% (Yano et al., 1991). Une augmentation des besoins semble entraîner une meilleure biodisponibilité plutôt qu'une meilleure digestibilité apparente. Cette dernière étant obtenue du bilan alimentaire du Pi, tandis que la biodisponibilité résulte de la fraction du phosphore intestinal qui atteint la circulation sanguine. Rajaratne et al. (1994) ont en effet démontré chez le mouton qu'une augmentation des besoins en phosphore favorise son absorption intestinale sans forcément réduire ses excréments endogènes. Il est même possible qu'un ajustement circadien de l'absorption ait lieu lors de la synthèse des constituants du lait. En effet, la parathormone (PTH) active les récepteurs ostéoclastiques avec comme résultat la libération rapide du calcium et du phosphore osseux vers le sang (Goff, 2000).

L'absorption de Pi est modulée simultanément par des facteurs endocriniens et des facteurs nutritionnels (Barlet et al., 1995). Parmi ces derniers, citons:

- Lorsque la concentration de Pi dans le rumen passe de 5 à 50 mmole•L<sup>-1</sup> à la suite d'un taux alimentaire élevé, l'augmentation du taux de phosphore disponible dans l'intestin provoque une réduction de moitié de l'absorption de Pi (de 70% à 35%) (Care et al., 1980).
- La présence de cations dans la ration comme l'aluminium, le magnésium, le calcium et des matières grasses, avec lesquels le Pi forme des sels insolubles, provoque une réduction importante de l'absorption de Pi de la ration (Yano et al., 1991).
- L'importance de l'activité hydrolytique de la flore ruminale. En effet, la plus grande partie du phosphore présent dans les aliments de la vache en lactation se retrouve, sous forme d'acide phytique, qui doit être hydrolysé pour être biodisponible. Son absorption intestinale est très variable, car elle dépend du temps de séjour et de l'activité bactérienne dans le rumen. Dans le cas des suppléments minéraux de phosphore, l'absorption dépend, comme pour les monogastriques, de leur solubilité (Sullivan et al., 1992).

## **Les routes d'excrétion du phosphore chez la vache laitière**

### **Généralités.**

Chez les bovins laitiers, les principales voies d'excrétions ou d'élimination du phosphore sont:

- 1) La salive, qui est la principale voie d'excrétion du phosphore chez cette espèce (Rosol et Capen, 1997 ;Yano et al., 1991).
- 2) Les fèces assurent l'élimination de 50 à 80% du Pi alimentaire non absorbé et celui d'origine salivaire et des autres voies du système digestif (Lomba et al., 1969 ; Morse et al., 1992 ; CPAQ, 1998).
- 3) Le lait, qui élimine de 20 à 40% du phosphore ingéré ou absorbé (Morse et al., 1992 ).
- 4) L'urine, qui représente une voie d'excrétion très secondaire avec moins de 4% du phosphore alimentaire (Morse et al., 1992).

Les phosphates, présents dans la salive, agissent comme substances tampons vis-à-vis des acides gras volatiles du rumen. Ils sont aussi des nutriments pour les microorganismes du rumen. En plus des fonctions déjà mentionnées, Tomas et Somers (1974) ont mis en évidence le rôle des glandes salivaires dans le contrôle du bilan du phosphore systémique. Les variations du taux du phosphore inorganique (Pi) salivaire s'inscrivent comme l'un des éléments d'ajustement de la phosphatémie.

Chez les ruminants consommant une ration à forte teneur en fibre, l'intestin joue un rôle plus important que les reins dans l'équilibre en phosphore de l'organisme. Par contre, les reins acquièrent chez les ruminants alimentés avec de rations riches en concentrés une certaine importance dans l'excrétion du phosphore bien que l'intestin

reste la voie la plus importante d'élimination du phosphore alimentaire en excès par rapport aux besoins (Scott et Buckan, 1988; Reed et al., 1965 ;Toops et al., 1966).

### **Composition de la salive en phosphore.**

Plusieurs expériences ont permis de mieux définir les mécanismes de contrôle du ruminant pour stabiliser la charge corporelle en phosphore et pour assurer l'équilibre entre les apports alimentaires et les besoins en phosphore. Clark et al. (1973) ont souligné l'importance des glandes salivaires pour la régulation du phosphore sanguin chez la brebis. L'excrétion salivaire du Pi, chez ces ruminants soumis à une surcharge en Pi par injection intraveineuse, augmente significativement et l'utilisation de marqueurs provenant du rumen a permis d'établir l'origine salivaire de l'augmentation de phosphore dans les fèces. Les données de cette étude sont confirmées par celle de Scott et al. (1984). Les résultats de ce groupe de chercheurs confirment la contribution de la salive aux changements du taux d'excrétion fécale du phosphore lors de l'augmentation de l'ingestion en phosphore. Challa et al. (1988) ont obtenu des résultats similaires chez le veau.

Pour quantifier l'importance relative de l'excrétion fécale et urinaire du phosphore chez le mouton, Tomas et Somers (1974) ont étudié les effets de la liaison bilatérale des glandes parotides sur l'homéostasie du phosphore sanguin. Ils rapportent qu'à la suite de ce blocage des voies salivaires, l'excrétion fécale du phosphore diminue sensiblement et l'excrétion urinaire du phosphore augmente de

manière importante. Les données de cette étude indiquent que la phosphatémie intervient sur le contrôle de son excrétion urinaire.

Mañas-Almendros et al. (1982), ont trouvé chez le mouton et la chèvre une relation linéaire entre la concentration Pi plasmatique et salivaire. Ils ont observé aussi que lors d'une déficience alimentaire en phosphore, une réduction de l'excrétion salivaire du Pi à la suite d'un ajustement de la concentration salivaire du phosphore. De plus ils ont démontré une augmentation de l'excrétion salivaire du Pi à la suite d'une surcharge par infusion intraveineuse en Pi.

La concentration plasmatique du phosphore semble un facteur déterminant de sa concentration salivaire et par voie de conséquence de son taux d'excrétion (Challa et Braithwaite, 1988a ; Challa et Braithwaite, 1988b ; Challa et al., 1989)

La salive des glandes parathyroïdes contient de 16 à 40 mmole•L<sup>-1</sup> de phosphate inorganique et la sécrétion totale quotidienne du phosphate des glandes salivaires dans le système digestif est plus importante que la quantité de phosphate apportée par la ration. (Rosol et Capen, 1997 ; Yano et al., 1991). Les rations riches en fibre favorisent la mastication et la production d'une grande quantité de salive de 100 à 180 litres et d'excrétion salivaire de Pi (Yano et al., 1991).

Les rations riches en concentrés réduisent l'importance de la mastication et des pertes intestinales de phosphate (Care, 1994; Barlet et al., 1995; Shirazi-Beechey

et al., 1996). Dans ce cas, un excès de phosphate dans la ration produit une réduction de la résorption tubulaire (Lotscher et al., 1996) et une excrétion urinaire accrue.

### **La composition du fumier**

La méthode du bilan alimentaire permet d'évaluer la différence entre les éléments apportés par la ration (par exemple ; l'azote (N) le phosphore (P) et le potassium (K) et ceux que les bovins retiennent pour leur la production de lait, la croissance, la gestation et le reste pour les fonctions liées au métabolisme basale. Cette différence constitue les éléments rejetés dans les déjections animales (les fèces et l'urine). L'équation de base de la méthode du bilan alimentaire est la suivante :

Éléments ingérés – éléments présents dans les fèces et l'urine = éléments retenus (N-P-K)

Le résultat du calcul détermine les quantités d'éléments fertilisants excrétés par les animaux en fonction de leur alimentation. Ce résultat peut être exprimé en unités de masse, kilogrammes ou grammes d'azote, de phosphore et de potassium par tête, ou encore pour l'ensemble de l'exploitation agricole. Il est à noter, que cette masse de matériel fertilisant excrétée est tributaire de la période pendant laquelle le bilan est effectué (par exemple: jours, semaines, mois, année, etc.). Cette méthode, lorsque basée sur une collecte de données rigoureuse, permettra de prendre en compte les situations particulières de chaque élevage quant aux performances des animaux et

aux modes de production et d'alimentation. Par ailleurs, cette méthode du bilan alimentaire est proposée dans des nombreux pays pour la détermination des rejets d'éléments fertilisants par les bovins. Ce type de résultat peut être utilisé pour déterminer la pression environnementale qu'exercent plusieurs entreprises, donc elle peut servir à évaluer une pression environnementale pour une entité géographique donnée.

On estime que 60 % de l'azote présent dans le fumier est perdu dans l'atmosphère par volatilisation. Ce n'est pas le cas pour les substances non volatiles comme le phosphore et potassium (Powers et Van Horn, 2001). Cette situation amène un fumier avec un taux plus élevé en phosphore et un taux plus faible en azote et ce par rapport aux besoins des plantes. Alors, si on prend l'azote comme référence pour le plan de fertilisation, l'enrichissement progressif en phosphore des sols agricoles devient inévitable et c'est pourquoi il est nécessaire mettre au point des stratégies pour retenir l'azote et pour diminuer le phosphore du fumier.

Une vache qui produit quotidiennement 40 L de lait et ingère 22 kg d'aliments contenant 0,45 % de phosphore consomme 96 g de cet élément par jour. Elle excrète 32g de phosphore dans 40 L de lait et 52g dans 65 kg de fumier. Dans le bilan du phosphore d'une ferme laitière, il est important d'ajouter le phosphore de la structure osseuse. Pour un bilan en phosphore plus précis d'une ferme laitière, on doit ajouter deux ou trois grammes de cet élément éliminés de l'exploitation lors de la réforme d'une vache.

**Tableau 1.** Production et composition du fumier pour vache Holstein typique consommant 17.8 kg de matière sèche par jour et produisant 22.7 kg du lait (Van Horn et al. 1994)

<b>PARAMÈTRES</b>	<b>Production journalière en Kg</b>
Production totale fraîche	34
Matière sèche	5.92
Eau	28.1
	<b>Composition</b>
Solides volatiles	5.27
ADF	1.85
NDF	3.15
Hydrates de carbone Non structuraux	0.94
Matières grasses	0.23
Carbone	2.50
	<b>Élimination fécale journalière en g</b>
N	160
NH <sub>3</sub> N	8
Protéines	151
P	50
K	31
Ca	118
Na	9
Mg	41
Fe	7.4
Zn	.60
Cu	.10
Mn	.40
Mo	.02

### **La teneur en phosphore du lait**

Le lait constitue un milieu aqueux caractérisé par trois phases: une émulsion de globules gras dans un colloïde de protéines dans du lactosérum. Ce dernier est une solution aqueuse neutre riche en lactose et en sodium. Ces deux derniers éléments, avec d'autres minéraux (potassium et chlore), confèrent l'activité osmotique au lait.

Les minéraux sont présents dans le lait (7,2 g/litre environ) soit en solution dans la fraction aqueuse, soit sous forme liée aux protéines de la fraction colloïdale. Le sodium, le potassium et les chlorures se trouvent exclusivement en solution sous forme d'ions et sont entièrement biodisponibles. Les autres (calcium, phosphore, magnésium et soufre) existent dans les deux fraction liquides. Dans la fraction aqueuse, ils sont en équilibre entre leur forme libre (calcium et magnésium ionisés), et leur forme liée. Les minéraux liés peuvent être sous forme de sel ionique (phosphates) non dissociés (calcium et magnésium), ou encore sous forme de complexes organiques (esters phosphoriques et phospholipides). Dans la fraction colloïdale, le calcium, le phosphore, le soufre et le magnésium sont associés ou liés à la caséine à l'intérieur de micelles.

Pour ce qui est du phosphore, 20 pour cent est lié aux groupements hydroxyles des acides aminés de la caséine (sérine, thréonine), plus de 60 pour cent est présent sous forme de phosphate inorganique (moitié lié à la caséine, moitié en solution) et le reste se partage entre les phospholipides et les esters hydrosolubles. Le magnésium est essentiellement en solution (environ 70 pour cent) et une fraction seulement est liée à la caséine en suspension colloïdale.

Le phosphore du lait se retrouve sous plusieurs formes: soit comme des composés orthophosphate, des constituants organiques estérifiés liés aux résidus serine et thréonine de la caséine et des composés organiques estérifiés liés à plusieurs petites molécules comme les hexoses, le glycérol et les phospholipides.

**Tableau 2 Composition approximative du lait (modifié de Walstra et Jenness, 1984)**

Constituants	Teneur en g/kg
Eau	860
Lactose	46
Protéines	
Caséine	26
$\beta$ - lactoglobuline	3.2
$\alpha$ - lactalbumine	1.2
lactoferrine	0.1
albumine	0.4
immunoglobulines	0.7
Enzymes	Traces
Matières grasses	
Triglycérides	38
phospholipides	0.3
Citrate	1,6
Minéraux	
Ca	1.3
P	0.9
Na	0.4
K	1.5
Cl	1.1

**Tableau 3. Distribution approximative du phosphore dans le lait (modifié de Walstra et et Jenness, 1984).**

Type	mg de P par kg du lait	% du phosphore totale
Estériefie aux protéines	216	22
Phospholipides	13	1
Forme d'esters solubles	90	9
Pi colloïdal	314	32
Pi dissous	348	36

La concentration du phosphore est donc 16 fois plus élevée ( $31.5 \text{ mmole}\cdot\text{L}^{-1}$ ) dans le lait que dans le sérum ( $1,90 \text{ mmole}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Le facteur de conversion utilisé pour la transformation de mg/100ml de phosphore en  $\text{mmole}\cdot\text{L}^{-1}$  est 0.3229.

## ***La phosphatémie***

### **Généralité sur la phosphatémie**

On appelle phosphate les sels de l'acide ortho-phosphorique,  $H_3PO_4$ , qui sont essentiellement sous forme de phosphates acides  $Na_2HPO_4$  et  $NaH_2PO_4$ , le sel disodique étant dans le plasma en concentration quatre fois plus élevée que le monosodique. Le phosphore existe à l'extérieur du compartiment vasculaire sous forme minérale, d'acide orthophosphorique et de ses différents sels, que l'on désigne par phosphore inorganique (qui fait l'objet de cette thèse) et sous diverses formes organiques: phospholipides, phosphoprotéines, acides nucléiques, adénosine triphosphate (ATP), nicotinamide adénosine dinucléotide phosphate, 2,3-bisphosphoglycérate. L'orthophosphate inorganique est la forme mesurée du phosphate sérique ou plasmatique et les formes organiques du phosphore ne sont pas mesurées de manière routinière.

Des méthodes colorimétriques reliés à la formation d'un complexe de phosphate avec un ion de molybdate sont utilisées pour la détermination de la concentration sanguine du phosphate inorganique (Fraser et al., 1987). Bien que l'on mesure le phosphate inorganique, le résultat est souvent présenté comme l'élément phosphore (Pi).

Dans le sang le phosphore existe sous forme de phosphate inorganique et d'esters phosphoriques organiques; la faible quantité de phosphore organique

extracellulaire se trouve presque exclusivement sous forme de phospholipides. Certaines méthodes d'analyses proposent une précipitation des protéines sériques avec l'acide trichloracétique (TCA) et la détermination du phosphore sur l'ultrafiltrat. (Littell et al., 1971). La difficulté de standardiser le pH de l'ultrafiltrat compromet l'avantage d'une mesure plus exacte de la phosphatémie. La méthode la plus utilisée pour le dosage du phosphore inorganique est celle sans déprotéinisation et avec la formation de phosphomolybdate d'ammonium, suivie d'une réduction avec formation de bleu de molybdène. Cette méthode est toutefois confrontée à des problèmes de stabilité des réactifs mais plusieurs compagnies proposent des réactifs plus stables.

## **Les mécanismes de contrôle de la phosphatémie**

### **Généralités**

Le sang de la vache laitière adulte a une teneur assez constante en phosphate, en moyenne  $1.90 \text{ mmole}\cdot\text{L}^{-1}$ , qui dépasse que très rarement au-delà de 10 % de cette valeur. La constance de la phosphatémie, chez la vache, résulte d'un équilibre entre la quantité de phosphore ingérée et la quantité excrétée, d'une part, et celle impliquée dans le processus de recyclage, d'autre part. L'apport alimentaire en P assure un approvisionnement quotidien, dont la quantité absorbée par l'intestin est fortement liée à la quantité ingérée, tandis que l'absorption intestinale du calcium dépend surtout d'un contrôle hormonal très précis.

Le calcium, le magnésium et le phosphore, des réserves plasmatiques et intestinales peuvent être perdus via les fèces, l'urine, le lait ou encore être transféré au fœtus en développement. Les processus de recyclage de ces trois nutriments ( Ca, Mg et P) impliquent via la résorption osseuse, la conservation rénale et, particulièrement pour le  $\text{PO}_4$ , le retour dans l'intestin via la salive. La régulation des pools actifs du Ca, du Mg et du  $\text{PO}_4$  est contrôlée par trois hormones. Ces hormones sont la PTH produite par les glandes parathyroïdiennes, la calcitonine sécrétée par les cellules C de la glande thyroïde et une hormone stéroïde la 1,25,dihydroxyvitamine D ( $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}$ ) ou calcitriol produite par le rein.

#### **Absorption intestinale du $\text{PO}_4$**

Contrairement à d'autres espèces, l'excrétion du Pi par voie rénale chez les ruminants est très mineure, ce rôle étant largement supplanté par les glandes salivaires. Le volume important de salive (25 à 190 litres par jour chez la vache) permet d'excréter 70 à 80 % (30 à 40 g) des pertes de Pi endogènes totales. Le Pi de la salive se mélange avec le P de la ration avant d'arriver à son site d'absorption dans l'intestin (Reinhardt et al., 1988). Les facteurs qui affectent l'absorption du P alimentaire affectent aussi l'absorption du Pi endogène sécrété par les glandes salivaires.

Le  $\text{PO}_4$  de la salive est sous la forme inorganique (Pi) et la concentration de  $\text{PO}_4$  de la salive des glandes parotides est 4.5 fois plus élevée que sa concentration plasmatique chez les bovins (Grace et al., 1974) chez les moutons est encore plus

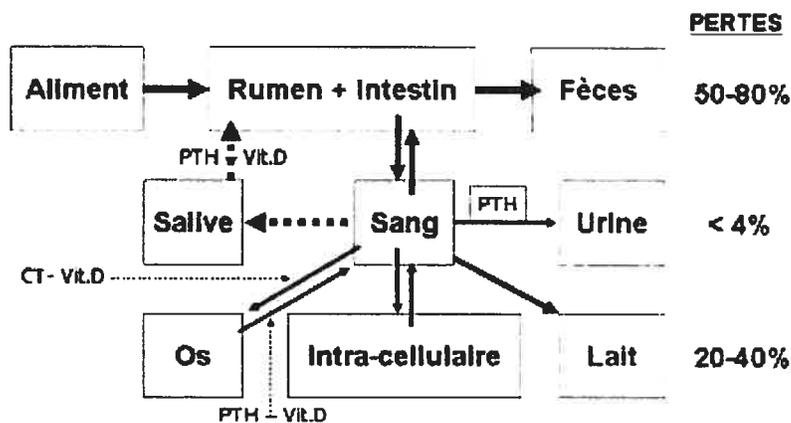
élevée (Clark, 1953 ; Thomas, 1967). L'excrétion total du  $\text{PO}_4$  dans la salive est directement influencé par des facteurs comme la quantité de  $\text{PO}_4$  de la ration ou du sang, et elle est inversement proportionnelle au débit salivaire, qui est influencé par l'état de jeûne ou le taux de fibre dans la ration entre autres. Finalement, la concentration de  $\text{PO}_4$  salivaire augmente lorsque les glandes salivaires sont sous l'effet de la PTH et avec comme conséquence une diminution de la phosphatémie. (Reinhardt et all, 1988). D'autres facteurs comme le pH des fèces et la quantité de calcium vont influencer l'absorption intestinale du Pi. Dans les fèces, la formation de complexes Ca-P dépend du pH: lorsque le pH diminue le complexe du Pi devient plus soluble et se dissocie. Une forte proportion de Ca dans les fèces augmente la formation de complexes de Pi et réduit sa solubilité (Reinhardt et al., 1988).

### **Contrôle endocrinien**

On présente à la figure 3 les principaux mécanismes de contrôle de l'homéostasie phosphocalcique chez la vache laitière. Trois hormones interviennent dans le contrôle global de l'homéostasie du phosphore. Lors d'un état d'hyper phosphatémie, la PTH provoque une diminution de la phosphatémie en stimulant la sécrétion des glandes salivaires. L'état d'hypophosphatémie amène une diminution de la PTH et une diminution de l'excrétion salivaire du Pi avec un rétablissement de la phosphatémie normale. Une diminution de la phosphatémie stimule la production rénale du calcitriol (dérivé actif de la vitamine D3) et augmente l'absorption intestinale du  $\text{PO}_4$ . La calcitonine favorise la formation osseuse ou la mise en réserve du calcium et du phosphore dans les tissus osseux, ce qui diminue la phosphatémie .Le

calcitriol apparaît comme un régulateur à long terme de la calcémie, alors que la PTH (parathormone) et la calcitonine interviennent plus ponctuellement lors d'hypo ou d'hypercalcémie (Rosol et Capen, 1997).

**Figure 3 .** Schéma du bilan du phosphore chez une vache laitière



**Légende:** CT = Calcitonine; PTH = Parathormone; Vit D = Vitamine D

D'autres hormones interviennent dans le métabolisme phosphocalcique, mais leur implication reste moins spécifique. Ce sont en particulier l'insuline, la thyroxine, l'hormone de croissance et les hormones stéroïdiennes. En raison des besoins accrus en calcium et en phosphore pendant la croissance, les effets de ces hormones sont plus marqués chez le veau que chez la vache.

### La formation et la résorption osseuse

Le squelette contient 99 % de tout le calcium et 80 % du P de l'organisme. Chez les ruminants, la vitesse de minéralisation avec le Ca et le  $PO_4$  est plus importante chez les jeunes animaux que chez les adultes. Le rôle du calcitriol dans le

processus de minéralisation est de maintenir des concentrations de Ca et de  $\text{PO}_4$  extracellulaires dans les normales.

La mobilisation osseuse du Ca et du  $\text{PO}_4$  contribue au maintien dans les valeurs normales des taux plasmatiques du Ca et du  $\text{PO}_4$ . Ce processus est sous le contrôle de deux hormones, la calcitriol et le PTH, et est sollicité en période de lactation surtout et chez les vaches laitières recevant des rations à très faible taux en calcium ou en phosphore. Lorsque le taux de résorption osseuse dépasse celui de la formation et ce sur une longue période, un état d'ostéoporose en résulte. Ce problème d'origine alimentaire entraîne rarement des manifestations cliniques en production laitière intensive lorsque le programme alimentaire est adéquat (Reinhardt et al., 1988).

### **Les rôles de la calcitonine (CT)**

L'hormone est sécrétée continuellement dans les conditions de calcémie normale, mais une augmentation de la concentration du  $\text{Ca}^{++}$  dans le plasma et le fluide extracellulaire stimule le déclenchement de la libération de la CT, ce qui entraîne une forte augmentation de son taux de sécrétion. La sécrétion de calcitonine augmente chez les bovins laitiers consommant une ration avec une haute concentration en calcium ou à la suite d'une faible élévation du  $\text{Ca}^{++}$  plasmatique. La calcitonine agit en inhibant temporairement la réabsorption du tissu osseux stimulée par la parathormone (blocage d'ostéolyse) et sur les tubules distaux des reins en diminuant la réabsorption de P (Chambers et Moore, 1983).

La parathormone et la calcitonine agissent ensemble pour le maintien de la calcémie par un mécanisme de double rétro-inhibition. Il semble que la libération de la parathormone, dans les conditions normales, à la suite des variations minute par minute le taux sanguin de  $\text{Ca}^{++}$  en assure une très grande stabilité tandis que l'état d'hypercalcémie postprandiale et les pertes excessives de Ca et de P de la masse osseuse au cours de la gestation déclenche la libération de la calcitonine et cette dernière doit être considérée comme une hormone d'urgence (Rosol et Capen, 1997).

### **Les rôles du cholécalciférol (vitamine D<sub>3</sub>)**

La vitamine D est un stérol, une famille de molécules apparentées au cholestérol. La vitamine D chez la vache provient en majorité (90%) de l'alimentation sous la forme d'ergocalciférol (vitamine D<sub>2</sub>), mais aussi de la synthèse dans le tissu sous-cutané (10%) où le cholestérol se transforme en cholécalciférol (vitamine D<sub>3</sub>), sous l'action des rayons ultraviolets (Sauberlich, 1987; Kaneko et al., 1997). La vitamine D<sub>2</sub> est absorbée avec les graisses dans l'intestin grêle. Elle rejoint ensuite la circulation générale, où elle s'ajoute à la vitamine D<sub>3</sub>. Ces deux molécules sont transportées jusqu'au foie par la protéine de transport 'vitamine D binding protein' (DBP). Dans les hépatocytes, elles sont hydroxylées en 25-hydroxy calciférol (25(OH) D), puis sont transportées jusqu'aux reins. Sous l'action de la PTH, l'enzyme alpha-1-hydroxylase mitochondriale des tubules rénaux proximaux, convertit le 25(OH) D en un dérivé très actif biologiquement, le calcitriol ou 1,25-dihydroxycalciférol (1,25(OH)<sub>2</sub>D). Cette molécule est la troisième hormone impliquée dans la régulation des taux sériques du  $\text{Ca}^{++}$ , du P, de leur absorption

intestinale, du remodelage osseux, mais son action est lente à se manifester (Bell, 1985).

L'intestin grêle constitue un organe cible important du calcitriol: ce dernier y stimule fortement l'absorption du calcium en augmentant d'une part; la perméabilité de l'épithélium à l'ion calcium et en activant d'autre part, la synthèse d'ARN messenger qui encode la protéine liante du calcium (Ca BP). Cette protéine spécifique permet le transport de deux molécules de calcium à travers la muqueuse de la partie proximale du petit intestin, ainsi que du phosphore dans sa partie distale (Rosol et Capen, 1997).

Au niveau des tissus osseux, le calcitriol favorise la libération de calcium et de phosphate osseux à la suite de la résorption de la matrice osseuse. Au cours de la croissance, son site d'action privilégiée est la zone métaphysaire, où le cartilage de conjugaison se transforme en tissu osseux. Au niveau des tubules rénaux, la réabsorption du calcium est aussi fortement activée par le calcitriol.

## ***Biochimie clinique chez les bovins laitiers***

### **Généralités**

Le principe d'homéostasie pour la survie de l'organisme vivant a été énoncé dans les années 1800 par Claude Bernard. Ce principe, qui s'applique à tous les animaux et plantes postule que le maintien de la constance du milieu intérieur est une condition pour une existence libre et indépendante. La plupart des fonctions physiologiques participent au maintien de cette constance du milieu intérieur, que l'on nomme "homéostasie". L'homéostasie permet aux vaches laitières de survivre lorsqu'elles sont soumises à des variations de leur composition du milieu intérieur au cours du cycle de lactation.

Les différentes composantes de l'organisme peuvent varier à l'intérieur de limites bien définies. La constance relative des différents paramètres hématologiques ou biochimiques sanguins s'explique par la présence de mécanismes de contrôle spécifiques à chacun de ceux-ci. Une mesure des constituants sanguins (biochimiques et cellulaires) permettra d'évaluer certaines fonctions physiologiques afin de déceler des perturbations du milieu intérieur (Kaneko et al., 1997).

La biochimie médicale (ou clinique) a pour objet le dosage, dans les liquides biologiques et les tissus de l'organisme, de constituants susceptibles d'apporter des informations utiles au diagnostic et au traitement des patients. Parmi les examens

complémentaires succédant à l'examen clinique, l'étude biochimique du sang est une étape importante pour le clinicien. L'interprétation des analyses du laboratoire de biochimie requière des valeurs de référence ou de normalité. Il faut cependant être conscient de l'importance des facteurs préanalytiques, analytiques et biologiques associées aux variations des valeurs pour chaque paramètre sanguin (Kaneko et al., 1997).

Le concept à la base de la biochimie clinique vétérinaire est que tout trouble pathologique débute par un déséquilibre métabolique. Ce déséquilibre provoque des modifications du taux de certains paramètres biochimiques du sang. Les variations de ces derniers en dehors des limites de référence peuvent être utilisées comme indicatrices de l'équilibre métabolique d'une fonction, de l'intégrité cellulaire ou de l'état nutritionnel d'un individu. Le sang reflète généralement l'état des liquides extracellulaires. Ces liquides sont en étroite relation avec l'état physiologique des tissus de l'organisme. La pratique des analyses du sang est donc importante et la mieux documentée. L'urine, le lait et le fluide du rumen sont analysés à l'occasion (Kaneko et al., 1997).

### **Potentiel du profil métabolique pour estimer la phosphatémie**

Le vétérinaire utilise très fréquemment les analyses biochimiques du sang pour le diagnostic des problèmes de santé chez une vache laitière. Les producteurs, les nutritionnistes et les vétérinaires sont intéressés aux informations pertinentes sur

l'état nutritionnel, l'état de santé et l'état métabolique d'un groupe de bovins laitiers à partir d'analyses du sang. L'analyse systématique d'une variété de paramètres sanguins est connue sous le nom de profil métabolique.

L'usage des profils métaboliques en biochimie clinique fut introduit au cours des années 1970 pour améliorer le suivi de la santé des vaches laitières (Payne et al., 1970). Les variations des concentrations sanguines de différents métabolites, si on les compare à des valeurs de référence, peuvent nous procurer des informations pertinentes sur l'état métabolique et nutritionnel des vaches et, dans de nombreux cas, sur les pratiques alimentaires du troupeau (Eicher et al., 1999; Eicher et al., 1998; Herdt, 2000; Kelly, 1997; Whitaker, 1997; Whitaker, 2000).

L'utilisation du phosphore inorganique du sérum ou de plasma comme indicateur de l'état nutritionnel en phosphore des bovins laitiers est controversée. Certains reports n'accordent que peu de valeur à la phosphatémie comme un indicateur de l'état nutritionnel en phosphore (Commite on Mineral Nutrition, 1973; Cohen, 1973a,b ; McLean et Ternouth, 1994). Par contre d'autres travaux suggèrent sa validité (Abdelrahman et al., 1998 ; Gartner et al., 1982; Karn, 1997 ; Noller et al., 1977 ; Williams et al., 1991 ; Winks et al., 1977; Winter, 1988).

La mesure du taux de phosphore inorganique plasmatique (Pi) est utilisée comme un élément du diagnostic des carences en phosphore alimentaire chez les bovins laitiers (Whitaker, 1997). Ce type de carence est très rare aujourd'hui sauf

chez les bovins au pâturage, qui ne reçoivent pas de supplément alimentaire minéral (McDowell, 1996; Karn, 1997).

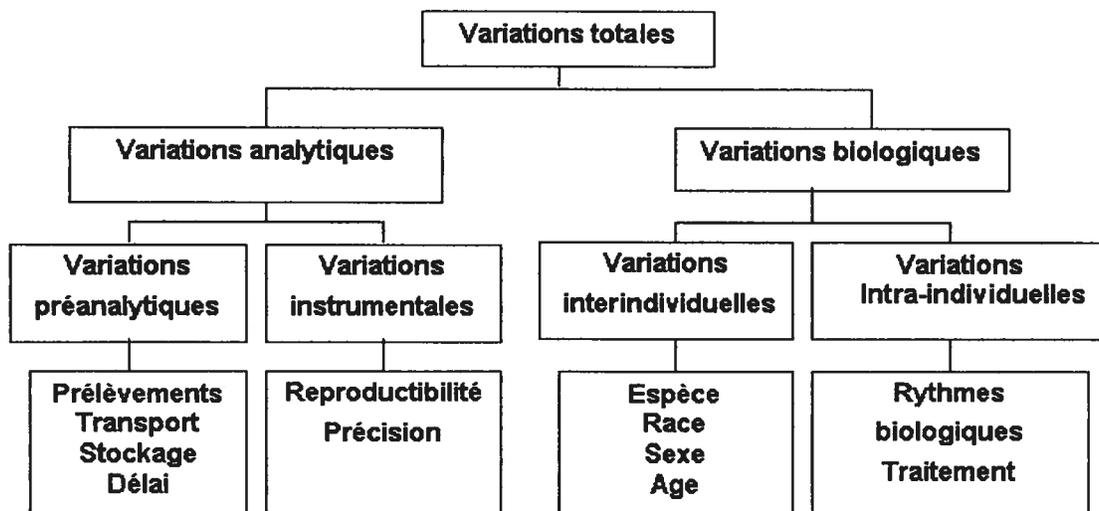
## **Variations de la phosphatémie et les valeurs de référence**

### **Variations analytiques**

Les taux de Pi diffèrent selon que l'on utilise comme échantillon le sang total, le plasma ou le sérum. Selon Williams et al. (1991), le taux de Pi dans le sang total est supérieur de  $3.23 \text{ mmole}\cdot\text{L}^{-1}$  par rapport au sérum lorsque le taux sérique du Pi est de  $1.66 \text{ mmole}\cdot\text{L}^{-1}$  chez des vaches recevant une ration avec 0.20 % de phosphore. Les valeurs de Pi plasmatique des bovins laitiers subissent des variations selon le site du prélèvement. Le taux de Pi est  $0.20$  à  $0.26 \text{ mmole}\cdot\text{L}^{-1}$  plus élevé pour les échantillons originant des vaisseaux coccygiens que de la jugulaire (Parker et Blowey, 1974; Teleni et al., 1976). Il devient donc important de standardiser les modalités de prélèvement, de conservation des échantillons de sang et d'analyse du phosphore inorganique sérique ou plasmatique. Une atteinte à l'intégrité des globules rouges, le site du prélèvement et l'efficacité de la méthode de dosage sont les principaux facteurs préanalytiques responsables des variations de la phosphatémie. Cependant les variations analytiques peuvent être contrôlées en utilisant systématiquement la même méthode d'analyse du phosphore et en appliquant un contrôle de qualité sur la procédure du laboratoire (Kaneko et al., 1997).

La figure 5 illustre cette notion sous forme d'un organigramme, les variations sanguines de la phosphatémie suivirent ce modèle.

**Figure 4 .** Les sources des variations d'un paramètre sanguin



### Variations biologiques

La teneur du Pi plasmatique est influencée par des facteurs autres que la teneur en phosphore de la ration. La valeur du Pi plasmatique varie chez les bovins laitiers elle diminue en fonction de l'âge de 0.13 mmole•L<sup>-1</sup> par année (Hewett, 1974). Le taux de Pi dans le sérum varie de manière inversement proportionnelle à la production laitière (Forar et al., 1982) et son taux est plus élevé en fin de lactation et en période de tarissement qu'en début de lactation. (Shaffer et al., 1981). La phosphatémie des vaches au moment de la parturition (1.60 mmole•L<sup>-1</sup>) ne diffère pas significativement de celle observée chez les mêmes vaches (1.66 mmole•L<sup>-1</sup>) 3

semaines après la parturition (Williams et al., 1991). La phosphatémie des vaches est plus faible en l'été que l'hiver (Payne et al., 1964).

Wu et al. (2000a) rapportent que pendant les premiers 14 jours de lactation la concentration moyenne du P sérique serait plus basse chez des vaches consommant la ration contenant 0.31% en P que chez celles consommant des rations contenant 0.40% ou 0.49%. Par la suite, la concentration moyenne du P sérique est semblable pour les trois groupes. Ces auteurs citent d'autres études qui suggèrent que la concentration sérique en phosphore pourrait refléter l'ingestion de P: Les auteurs remarquent le retour à la norme des concentrations sériques du calcium et du phosphore, qui chutent à leur taux le plus faible le deuxième jour après le vêlage, survient le troisième jour après le vêlage lorsque les vaches reçoivent des rations avec les deux teneurs élevées en P. Par contre chez celles qui consomment la ration avec 0.31% de P, le retour à la normale de la concentration phosphatémie prend plus de 28 jours (Wu et al., 2000a), quant au taux sérique du calcium, il revient à la normale 14 jours après le vêlage pour les trois groupes. Selon Rodehutschord et al. (1994), la concentration sérique du P n'est pas toujours un bon indicateur du statut en P chez les bovins laitiers, tel que le suggèrent les concentrations de phosphore sérique similaires entre les traitements pendant les périodes de mi-lactation et de fin de lactation, même lorsque les vaches ayant une production laitière moindre recevaient la ration avec 0.31% de phosphore (Wu et al., 2000a).

Il est possible d'observer un état d'hypophosphatémie chronique chez des vaches dont les concentrations plasmatiques de  $P_i$  sont inférieures à  $0.65 \text{ mmole} \cdot \text{L}^{-1}$

alors qu'elles maintiennent les teneurs du phosphore du lait à l'intérieur des valeurs normales. L'état d'hypophosphatémie sévère, avec des taux  $P_i$  sérique inférieurs  $0.65 \text{ mmole}\cdot\text{L}^{-1}$ , sont possibles lorsque les vaches sont alimentées avec des rations faibles en phosphore et que les besoins augmentent durant la dernière partie de la gestation, lorsque la croissance fœtale accélère, de même que lors de la synthèse du colostrum et du lait au début de la lactation. Ce déséquilibre métabolique du phosphore est souvent associé à d'autres maladies métaboliques comme l'hypocalcémie, l'hypomagnésémie et possiblement l'hypoglycémie (Goff, 2000).

Pendant la période péri-partum, les concentrations plasmatiques du phosphore peuvent tomber en dessous de  $1.29 \text{ mmole}\cdot\text{L}^{-1}$ , soit la valeur limite inférieure de référence. Chez les autres mammifères, les corrections physiologiques d'un état d'hypophosphatémie ont lieu suite à de la synthèse rénale de calcitriol répondant à une teneur faibles en  $P_i$  plasmatique (Goff, 1998 ; Reinhardt et al., 1988). Ce type de réponse chez la vache laitière en période péri-partum a été peu étudié. Cependant, l'ajustement de la phosphatémie est compromis chez la vache qui développe un état d'hypocalcémie sévère. En effet la parathormone est libérée avec comme conséquence une aggravation de l'hypophosphatémie à la suite des pertes urinaires et salivaires plus élevées en phosphore. Un taux élevée cortisol en période péri-partum réduit aussi la capacité d'ostéolyse, de mobilisation du Ca et du P osseux et la capacité d'ajustent de la phosphatémie.

En conclusion, La phosphatémie normale des bovins laitiers adultes varie à l'intérieur de limites relativement faibles soit entre 1.30 à 2.30 mmole•L<sup>-1</sup> et avec une tendance centrale de 1.90 mmole•L<sup>-1</sup>. (Kaneko et al.,1997).

### **Valeurs de référence**

L'établissement de valeurs de référence de la phosphatémie pour les bovins laitiers pose des difficultés comme pour les autres paramètres sanguins. Il faut se rappeler que cette valeur est obtenue par la mesure. L'obtention d'une série de valeurs de phosphatémie chez une population tout venant permet de définir les valeurs usuelles de ce paramètre. L'obtention de valeurs de références est plus précise mais plus complexe car elle requiert d'utiliser des individus de référence. Ces individus doivent être sélectionnés à l'aide de critères bien définis, de façon à s'assurer qu'elles se trouvent dans un état parfaitement connu, en fonction du but à atteindre (Lumsden, 1998).

Il existe plusieurs listes de valeurs de références pour les divers groupes de bovins (tableau 3). L'examen de ces valeurs pour les paramètres sanguins montre des différences plus au moins importantes entre ces listes, ce qui commande la prudence lors de l'emploi de ces valeurs de références. La décision du clinicien dépend, à ce moment, des autres observations cliniques et des résultats des autres paramètres sanguins. Les différences entre ces listes de valeurs de référence dépendent de la population utilisée.

**Tableau 4.** Valeurs de référence de la phosphatémie chez les bovins

Référence	Groupe	Nombre	Phosphatémie (mmole•L <sup>-1</sup> )
Paynes et al., 1970	Adultes	ND	1.75 ± 0.58
Larsen et al., 2001	Vêlage	200	1.30 ± 0.60
Kaneko et al., 1997	Adultes	ND	1.80 - 2.10
Parra et al., 1999	Lactation	79	1.99 ± 0.30
Monke et al., 1998	Mâle 2-4 ans	225	2.42 ± 0.18
Otto et al., 2000	Adultes *	23	1.90 ± 0.50
Hewett., 1974	adultes	572	1.84 ± 0.35

\* Vaches adulte de race angoni ND = non défini

## ***L'étude des cycles biologiques***

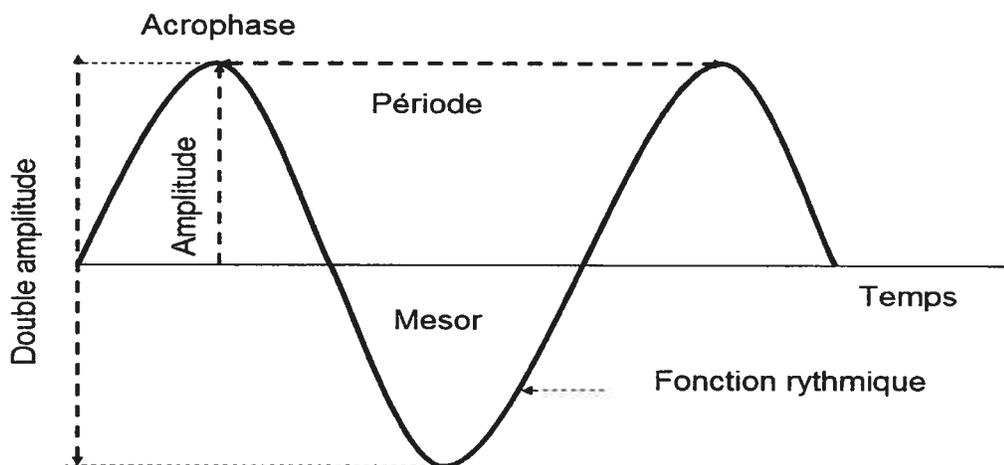
### **Généralités**

Un rythme biologique se définit comme une suite de variations physiologiques d'une périodicité statistiquement significative, déterminant des oscillations reproductibles en fonction du temps. Il s'agit donc d'un phénomène prévisible dont les résultats peuvent être présentés sous la forme de courbes, c'est-à-dire des séries de concentrations de la variable mesurée en fonction du temps, que l'on nomme chronogrammes. On cherche à déterminer ou à identifier dans une série temporelle de mesures expérimentales des fonctions sinusoïdales qui s'ajustent le mieux aux oscillations observées. Ces fonctions trigonométriques permettent d'estimer les paramètres qui caractérisent le rythme biologique.

Les quatre paramètres caractérisant un rythme biologique sont présentés à la figure 5:

- 1- La **période** est la durée d'un cycle complet de la variation rythmique étudiée. Selon leur périodicité, un rythme est qualifié de circadien s'il a une périodicité d'environ un jour, soit  $24 \pm 4$  heures. Un rythme ultradien présente une périodicité de moins de 20 heures et un rythme infradien a une périodicité comprise entre 28 heures et plusieurs années.
- 2- Le **mesor** est la valeur moyenne ajustée d'un rythme ( $C_{\text{moy}}$  de la période), correspondant à la moyenne arithmétique lorsque les données sont équidistantes et couvrent un cycle complet ( $C \cdot \frac{1}{2}$  de l'amplitude).
- 3- L'**amplitude** du rythme correspond à la moitié de la variabilité totale. C'est la valeur de la différence entre le zénith ( $C_{\text{max}}$ ) et le nadir ( $C_{\text{min}}$ ) d'une fonction étudiée ou des valeurs observées  $(C_{\text{max}} - C_{\text{min}}) \cdot 0.5$ .
- 4- L'**acrophase** est la localisation du sommet de la fonction (sinusoïdale) utilisée pour l'approximation du rythme ( $t_{\text{max}}$ ). Par exemple pour un rythme circadien, acrophase correspond à l'heure du pic dans l'échelle des 24 heures (Piccione et Caola, 2002).

**Figure 5. Illustration des paramètres d'une fonction rythmique**



### **Composantes d'un rythme biologique :**

On peut identifier dans un rythme biologique circadien des composantes exogènes et des composantes endogènes. Entre autres, un rythme biologique dépend en partie de facteurs de l'environnement tels que les alternances lumière - obscurité, travail - repos, chaud-froid, qui ne créent pas les rythmes mais les modulent. On les appelle synchroniseurs ou agents déclanchants (Touitou, 1998). Chez l'homme le synchroniseur prépondérant est de nature socio-économique et sont représentés par les alternances lumière - obscurité et repos - activité; ainsi que des facteurs sociaux tels que les horaires de repas.

En supprimant la composante exogène d'un rythme biologique, on peut mettre en évidence de manière expérimentale la composante endogène. Alors il est possible de contrôler les alternances lumière - obscurité, les alternances éveil - sommeil, l'heure de repas, notamment lors expériences connues comme « hors du temps ». Pour l'appui de cette notion du rythme endogène, on peut citer tous les travaux montrant que les jumeaux homozygotes ont des rythmes biologiques identiques (Reinberg, 1985). Au total, il semble que les rythmes biologiques sont de nature endogène principalement, probablement génétiquement déterminés. (Haus, 1980 ; Hyman, 1990). Il a été observé que la tendance individuelle à se lever et se couche plus ou moins tôt était associée a un polymorphisme du gène « clock » (Katzenberg et al., 1988).

Le périodogramme permet l'étude de rythmes biologiques pour un phénomène physiologique ou pour un paramètre sanguin spécifique. En fait un périodogramme est souvent utilisé pour détecter et évaluer un rythme possible, soit une procédure de détection de pic.

En applications biomédicales, les séries chronologiques sont traditionnellement utilisées pour obtenir un périodogramme dans le temps (Sokolove et Bushell, 1978). Ces périodogrammes donnent des mesures de l'intensité des rythmes dans une série chronologique pour une période de temps donnée (T). Le pic du périodogramme indiquent la dominance relative pour la période correspondante. Ces rythmes peuvent être déclarés statistiquement significatifs si leur pouvoir excède un certain seuil pré établi (Van Dongen et al., 1999).

Chacune des séries chronologiques représente la mesure répétée d'un phénomène biologique déterminé (par exemple le taux d'un métabolite dans le sang). Normalement il y a des dizaines, voire des centaines de mesures pour un même sujet (soit une unité expérimentale). Les analyses sont basées en fixant un rythme circadien (ou un autre période de temps) avec une série courbes de sinus et cosinus. Cette approche peut être décrite comme régression harmonique (Bergendahl et al., 1996 ; Radomski et al., 1995).

### **Variation circadienne du phosphore sanguin chez la vache laitière**

Les minéraux sanguins et le pH sont des variables importantes qui peuvent être affectés par le moment du prélèvement sanguin. Des variations journalières significatives des taux sériques du calcium total, du sodium, du potassium et des chlorures ont été rapportées chez la vache laitière (Bajcsy et al., 1999 ; Stampfli et al., 1980 ; Unshelm et Rapen, 1968).

La variation journalière des métabolites sanguins doit être tenue en compte lors de l'établissement des valeurs limites de référence; si non ces variations deviennent une source d'erreur potentielle (Coggins et Field, 1976 ; Manston et al., 1981).

Manston et al. (1981) ont étudié les variations de la composition du sang chez la vache laitière selon le moment du prélèvement de l'échantillon de sang au cours de

la journée. Les résultats obtenus lors de l'étude situent le cycle des variations pour le  $\beta$ -hydroxybutyrate, l'urée, le calcium total, le sodium, le magnésium et le cuivre. Pour ces métabolites sanguins, le moment du prélèvement de sang au cours de la journée est un des composants importants de la variance. Mais pour le phosphore aucun cycle journalier significatif n'a pu être démontré. Coggins et Field, (1976) réalisent une seconde étude des bovins de boucherie et cette fois obtiennent des résultats similaires quant à l'absence de variations significatives des valeurs sériques du Pi au cours de la journée.

Mais d'autres études décrivent des résultats différents : Forar (1982) a rapporté des variations journalières importantes pour le phosphore sanguin chez la vache en lactation. Une différence de 8% sépare la plus forte concentration du phosphore pendant le jour par rapport à la nuit et ce chercheur rapporte aussi une augmentation importante du phosphore plasmatique deux heures après le repas.

### ***Biodisponibilité du phosphore alimentaire et pertes endogènes :***

#### **Généralités**

La biodisponibilité se définit comme la proportion d'un nutriment ingéré en provenance d'un aliment spécifique qui est absorbé sous une forme utilisable métaboliquement (Forbes et Erdeman, 1983 ; Sauberlich, 1987 ; Southgate, 1988).

Les données de la biodisponibilité sont souvent exprimées en pourcentages de la quantité ingérée. Une autre approche permet d'exprimer la biodisponibilité en relation avec la réponse obtenue par rapport à un aliment standardisé.

L'absorption intestinale d'un élément minéral chez l'animal peut être utilisé pour obtenir un estimé de sa biodisponibilité. Le minéral, absorbé par le tractus gastro-intestinal, est généralement disponible pour une mise en réserve ou pour une utilisation immédiate par divers processus physiologiques par l'animal. Des études sur l'absorption de macroéléments comme le calcium, le phosphore et le magnésium sont souvent réalisées chez les ruminants et elles se déroulent sur plusieurs jours. Par rapport aux éléments minéraux, pas juste les minéraux la forme chimique et la solubilité peuvent influencer fortement la biodisponibilité d'un supplément (Ammerman et al. 1995).

La digestibilité apparente se définit comme la différence entre la quantité totale du minéral ingérée et la teneur fécale de l'élément et elle est exprimée en pourcentage. Elle est utilisée pour comparer certaines sources de minéraux:

$$\text{Pourcentage d'absorption apparente} = (I - F_{\text{tot}}) / I \times 100$$

$$\text{Pourcentage d'absorption réelle} = [I (F_{\text{tot}} - F_{\text{endo}})] / I \times 100$$

(I = ingestion totale;  $F_{\text{tot}}$  = Excrétion fécale totale) et  $F_{\text{endo}}$  = Excrétion fécale endogène totale).

La valeur de la digestibilité réelle est un estimé plus précis de la quantité du minéral qui est retrouvée dans les tissus et est utilisée dans les divers processus métaboliques. La valeur de l'absorption réelle est plus élevée que celle de l'absorption apparente. L'excrétion fécale endogène totale peut être estimée à l'aide d'un isotope de l'élément minéral et en utilisant la formule:

$$\text{Eftot.} = [\text{radioactivité (fèces)} / \text{radioactivité (sang)}] \cdot \text{excrétion fécale totale}$$

(Eftot. = Excrétion fécale endogène totale)

La méthode de dilution de radio-isotopes, l'une des méthodes de mesure de l'absorption vraie, donne de bons résultats pour des éléments comme le calcium ou le phosphore chez les ruminants. Cependant, Ammerman et al. (1957) ont utilisé une technique alternative aux radioéléments, soit la méthode des bilans alimentaires lors de deux périodes de collection. Cette technique a permis d'établir la valeur de l'absorption vraie du phosphore chez le mouton.

La méthode de l'excrétion urinaire est possible parce que l'urine est la voie principale d'excrétion de certains minéraux comme le magnésium et le potassium, la mesure de l'excrétion urinaire devient un bon indicateur de l'absorption intestinale.

La rétention nette d'un élément se définit comme la valeur de l'ingestion totale de l'élément à laquelle on soustrait de la valeur de son excrétion totale (fécale et urinaire de l'élément minéral). Pour certains éléments, il faut tenir compte que la valeur de l'excrétion de l'élément représente une fraction potentiellement nutritive et déjà utilisée dans des processus métaboliques avant d'être excrétée.

## Biodisponibilité des minéraux

La différence entre l'ingestion et l'excrétion représente la disparition nette de l'élément du tractus gastro-intestinal et cette valeur n'est pas corrigée pour les autres fractions de l'élément qui sont ajoutés dans le tube digestif soit celle reliée à de la desquamation cellulaire des muqueuses ou celles des diverses sécrétions digestives de l'élément vers le tractus digestif (salive, sécrétions gastriques, intestinale, pancréatique et hépatique par les voies biliaires). La valeur de l'absorption apparente est donc imprécise pour les minéraux utilisant le système digestif comme voie importante d'excrétion (calcium, phosphore, zinc, magnésium et cuivre).

La valeur de l'absorption réelle d'un minéral est une valeur corrigée pour la portion de l'élément absorbée et qui sera subséquemment excrétée vers le tractus gastro-intestinal. Cette fraction de l'élément minéral, par rapport à la valeur fécale totale, est connue sous le nom de « fraction d'excrétion fécale endogène » ou « d'excrétion métabolique ». Cette dernière comprend les valeurs de la fraction :

- de l'excrétion endogène minimale soit la perte fécale endogène minimale ou perdre inévitable (ARC, 1980).
- de l'excrétion endogène variable soit celle de la perte endogène résiduelle reliée en grande partie à l'ingestion et à la biodisponibilité de l'élément minéral.

Ces deux dernières fractions sont indivisibles et elles n'existent que théoriquement. La valeur de l'absorption réelle, exprimée en pourcentage, est calculée à partir de celle de l'ingestion totale moins celle l'excrétion fécale totale corrigée pour la valeur de l'excrétion fécale endogène.

La modification qualitative et quantitative des hydrates de carbone de la ration des bovins laitiers favorise une réduction de l'excrétion fécale du phosphore. Glenn et al. (1998) rapportent une diminution de l'excrétion fécale de phosphore lors qu'ils ont utilisé des sources hautement digestibles d'hydrates de carbone. Des résultats semblables sont obtenus par Guyton et al. (2000): ils observent une réduction de l'excrétion fécale du phosphore alimentaire lorsqu'ils comparent l'effet de différentes sources d'hydrates de carbone sur le bilan du phosphore.

### **Méthodes pour l'évaluation de la biodisponibilité.**

Comme nous l'avons déjà vu, la biodisponibilité ne doit pas être confondue avec la digestibilité apparente, qui varie avec l'importance relative de l'excrétion endogène par rapport à l'ingestion. C'est la digestibilité réelle, c'est-à-dire l'absorption ruminale et intestinale, qui est une mesure plus exacte de la biodisponibilité. Or, l'excrétion endogène et la digestibilité réelle peuvent être mesurées en appliquant une analyse de régression à l'ingestion de  $P_i$  digestible, analyse que l'on appelle communément test de Lucas (Lucas, 1964):

$$\text{Ingestion de } P_i \text{ digestible} = \text{intercept} + \alpha (\text{ingestion de } P_i)$$

Lorsque le modèle statistique correspond à la réalité, l'intercept du modèle a une valeur négative et est assimilé aux pertes endogènes (ingestion négative = excrétion sans ingestion). Le coefficient de régression ( $\alpha$ ) correspond alors à la digestibilité réelle. Le phosphore biodisponible ( $P_d$ ) est donc obtenu en multipliant la concentration en  $P_i$  par  $\alpha$ .

Cette mesure de la biodisponibilité suppose une constance des pertes endogènes et de la digestibilité réelle quel que soit le niveau d'ingestion. Or, chez la vache en lactation l'absorption réelle selon les besoins de la production laitière et les voies d'excrétion varient selon la nature des aliments. Il est donc important de vérifier l'applicabilité du test de Lucas chez la vache pour mesurer la biodisponibilité du phosphore alimentaire.

Des études sur la cinétique du phosphore chez les ruminants, incluant les pertes de P endogènes, ont été réalisées lors de l'administration de l'isotope radioactif  $^{32}\text{P}$ . Plusieurs groupes de recherches ont utilisé cette approche pour redéfinir les données de la cinétique gastro-intestinal et osseuse du P chez le mouton (Braithwaite, 1983). L'utilisation de l'isotope  $^{32}\text{P}$  a permis d'établir les proportions de phosphore fécal d'origine endogène et alimentaire (exogène) chez la vache en lactation (Kleiber et al. 1951). Avec cette technique il a été possible d'établir la valeur de la digestibilité réelle chez le agneau (Lofgreen et Kleiber, 1953) et chez le mouton (Lofgreen et

Kleiber, 1954). Martz et al. (1990) ont aussi calculé la digestibilité réelle du phosphore alimentaire chez la vache laitière, avec le  $^{32}\text{P}$ , et leurs résultats montrent une disponibilité du P alimentaire plus élevée que celle proposée dans le guide du NRC de 1989.

La disponibilité ruminale du phosphore contenu dans plusieurs types d'aliments comme les fourrages, les grains, les sous-produits des grains et les divers tourteaux (de soya) entre autres a été évaluée à l'aide de sacs en nylon placés dans le rumen des vaches laitières fistulées. Les données de ces essais ont montré que la libération du phosphore est très différente entre les différents types d'aliments et que cette méthode d'évaluation de la disponibilité ruminale de phosphore est une approche intéressante pour prédire l'utilisation de phosphore alimentaire chez les ruminants (Bravo et al., 2000).

### ***Les stratégies nutritionnelles pour réduire l'excrétion du phosphore.***

#### **Généralités**

Dans le contexte de l'agriculture durable, une ferme doit réussir à maintenir un état d'équilibre dans le flux des nutriments, c'est à dire que la quantité de nutriments entrant dans la ferme sous la forme de fourrages, de concentrés, de suppléments ou de fertilisants, doit permettre une production maximale et constante des nutriments qui sortent sous la forme de lait ou de viande (Van Horn et al. 1996 ; Tamminga, 1996).

Une étude menée au Wisconsin et une autre en Floride démontrent que la suralimentation en phosphore est une pratique courante chez plusieurs producteurs (Shaver et Howard 1995; Morse et al. 1994). Il est possible, en respectant les nouvelles normes alimentaires du phosphore, d'améliorer de 23 à 30 % le rendement d'utilisation du phosphore à la ferme chez la vache laitière (Tamminga, 1996).

Une autre approche vise à réduire l'excrétion du phosphore en utilisant des rations pour bovins laitiers avec une forte teneur en concentrés. Ces rations ont permis une réduction de 30% de l'ingestion de matière sèche en même temps qu'une augmentation de 15% de la digestibilité apparenté du phosphore (Driedger et Loerch 1999).

Un meilleur équilibre alimentaire entre les besoins et les apports en phosphore chez la vache laitière semble l'approche nutritionnelle la plus utilisée pour favoriser une réduction de l'excrétion fécale du phosphore. Cependant, sa mise en application nécessite une connaissance assez précise de la composition des aliments en phosphore, de même qu'une bonne évaluation des besoins aux divers stades physiologiques.

## **Effet des hydrates de carbone sur la biodisponibilité du phosphore**

La disponibilité en énergie de la ration semble être un des facteurs influençant la biodisponibilité du phosphore alimentaire chez la vache laitière. L'utilisation de diètes contenant une source d'hydrates de carbone très fermentescible réduit l'excrétion fécale du phosphore, soit à la suite d'une plus grande digestibilité du phosphore alimentaire ou une plus grande absorption du phosphore intestinal (Guyton et al. 2000). Par exemple, l'utilisation de rations avec une forte teneur en grains de maïs (Driedger et Loerch 1999) réduit l'excrétion du phosphore de 30% chez la vache laitière.

Une fraction importante du phosphore alimentaire est sous forme de complexe organique (acide phytique) et sa libération est favorisée par l'action des enzymes produites par les bactéries du rumen. L'augmentation de l'activité métabolique des bactéries du rumen pourrait donc favoriser une plus grande biodisponibilité du phosphore alimentaire et une réduction des pertes fécales.

L'utilisation des grains dans la ration augmente le métabolisme bactérien du rumen des vaches hautes productrices et permet de combler leurs grands besoins énergétiques. L'amidon représente de 60-80% du grain sur la base de matière sèche et elle est facilement fermentescible par la biomasse ruminale en donnant comme produits terminaux les acides gras volatiles. Plusieurs facteurs sont responsables des

variations de l'efficacité de la fermentation de l'amidon qui va de 40 à 90%. Ces facteurs sont: la structure du grain, la variété, la disponibilité de l'amidon à l'attaque enzymatique, le type de transformation physique (mouture, humide, sec) et les conditions environnementales du rumen.

Les formes sous lesquelles les hydrates de carbone sont rendues disponibles aux microorganismes du rumen pourraient donc modifier la biodisponibilité du phosphore. Cependant, l'augmentation de l'ingestion chez les ruminants a été rapportée comme étant la cause d'une diminution de la digestibilité. Russel et al. (1981) observent chez le bovin de boucherie qu'une augmentation de 2 kg de maïs par jour provoque une réduction de la digestibilité du phosphore d'environ 5,4%. Les pertes fécales de phosphore pourraient donc diminuer si on maintenait constante la digestibilité apparente du phosphore lorsque la consommation d'aliment augmente.

### **Modification de l'activité ruminale par des infusions intraruminales de nutriments.**

L'infusion intraruminale de sucrose au cours de la journée, à l'aide d'une pompe péristaltique à débit constant, provoque une réduction de consommation de matière sèche (CMS) mais assure le maintien des apports énergétiques. L'infusion ruminale de sucrose produit une situation de jeûne de tous les nutriments et les caractéristiques alimentaires du phosphore ne changent pas. Elle maintient toutefois une activité métabolique maximale des bactéries du rumen, ce qui assure une

digestion complète des diverses formes du phosphore alimentaire. L'infusion intraruminale de sucre est utilisée pour vérifier l'influence de la vitesse de fermentation des différentes sources énergétiques, de la synthèse des protéines et de l'activité métabolique des bactéries du rumen sur la libération du phosphore alimentaire, spécialement celui présent sous une forme organique complexe.

Avec un tel modèle les vaches sont soumises à une restriction de tous les nutriments sauf de l'énergie. La réduction s'observe avec différentes formes d'hydrates de carbone : avec du sirop de glucose chez la vache laitière (Knowlton et al., 1998), ou encore le sucrose chez les bovins de boucherie (Rooke et al., 1987). Il est à noter que la solubilité du sucrose facilite son utilisation dans ce type expériences. La réduction de la consommation volontaire de matière sèche devrait entraîner une réponse métabolique chez l'animal caractérisée par une augmentation de la biodisponibilité des divers nutriments. Cette approche rend difficile la distinction entre l'augmentation de la biodisponibilité liée à l'activité microbienne de celle liée au contrôle exercé au niveau de l'intestin (absorption active).

L'infusion ruminale de sucrose permet, par rapport à son inclusion dans la RTM, un contrôle de la distribution du sucrose sur une période de temps déterminé pour éviter les variations du pH ruminale. Avec du sucrose incorporé dans la RTM, le rythme d'ingestion de l'animal détermine la distribution ruminale de sucrose, ce qui peut induire des variations du pH ruminal et des changements dans l'activité métabolique des bactéries du rumen. Par rapport à l'amidon, on note pour le sucrose une plus grande solubilité dans l'eau à température ambiante, ce qui facilite

l'homogénéité de la préparation et la constance de la vitesse d'infusion. En effet la solubilité de l'amidon dans l'eau est faible ce qui donne une suspension difficile à infuser à un débit constant. Bauer et al. indiquent en 1995 que l'hydrolyse partielle de l'amidon facilite sa solubilisation et son infusion ruminal.

Contrôler la quantité de glucose traversant le rumen sans subir la fermentation bactérienne est difficile. Une fraction du sucrose infusé dans le rumen peut se retrouver dans le duodénum et y subir une hydrolyse en glucose et en fructose, ce qui peut faciliter l'absorption active du phosphore par les entérocytes. Les effets du glucose résiduel sur les entérocytes et de sa participation à une plus grande absorption intestinale du phosphore alimentaire sont difficilement mesurables. Si la vitesse de perfusion du sucrose se limite à 6,25 g/min, la limite maximale de la vitesse de fermentation du glucose par la biomasse ruminale n'est pas atteinte. Par conséquent la totalité du sucrose devrait être hydrolysée et fermentée par les bactéries du rumen (Journet et al. 1995).

L'infusion ruminale de propionate est aussi une source d'énergie qui remplace le sucrose et permet de maintenir l'équilibre énergétique de l'animal et sa production laitière. L'étude de Sheperd et Combs en 1998 démontre que l'infusion de propionate chez la vache laitière en mi-lactation assure une production de 36 kg de lait par jour. Compte tenu que la plupart d'acides gras volatiles sont absorbés par la paroi du rumen (Russell et Gahr 2000), l'infusion ruminale n'est pas un moyen efficace pour stimuler au maximum l'activité ruminale.

L'infusion duodénale de sucrose réduit la CMS sans affecter la production laitière (Lemosquet et al. 1997), mais avec des tendances à la hausse pour la production de protéine et à la baisse la production de matières grasses du lait. Cependant, l'infusion duodénale prive le milieu ruminal d'un apport énergétique qui pourrait être responsable d'une meilleure hydrolyse de l'acide phytique et donc d'une meilleure absorption du phosphore alimentaire. Giduck et al. (1988) n'ont pas observé de variation de l'excrétion fécale du phosphore avec une ration contenant peu de phosphore sous forme d'acide phytique, dont la ration de la vache laitière contient typiquement plusieurs sources. Arieli et al. en 2001, rapporte que les infusions ruminales et abomasales ont des effets équivalents sur la production laitière et la production de protéine du lait.

### **Biodisponibilité des hydrates de carbone**

Le broyage du maïs et de l'orge, avec une réduction la grosseur de particule du grain de 3 ou 2 mm à 0.25 ou 0.89, augmente de manière très significative la digestibilité ruminale de l'amidon (McAllister et al. 1993). Des résultats similaires ont été obtenus par Callison et al. (2001): ils démontrent une augmentation quadratique de la digestibilité du maïs cassé par rapport à la diminution du diamètre des particules.

L'utilisation de la chaleur ou de la pression permet l'hydrolyse de la matrice protéinique des divers grains favorisant ainsi la digestibilité ruminale de leur contenu

d'amidon. Huntington (1997) rapporte que la digestibilité ruminale du maïs extrudé est de 10% supérieure à celle du maïs roulé. Pour le sorgho, la digestibilité est 26% plus élevée lorsque le sorgho est extrudé. Le processus d'extrusion diminue la densité du maïs, ce qui entraîne une augmentation de la digestion ruminal de l'amidon (Swingle et al. 1999 ; Zinn, 1990).

L'augmentation de l'efficacité de la digestibilité de l'amidon entraîne des changements dans l'environnement ruminal. Ainsi l'incorporation d'hydrates de carbone facilement fermentescibles provoque une diminution du pH ruminal (Philippeau et al. 1999; Yang et al. 2001). Plusieurs études chez la vache laitière rapportent que l'utilisation de maïs ou sorgho extrudés favorise une plus forte proportion propionate ruminale et une diminution du rapport de concentration acétate/propionate, les deux principaux acides gras volatils du rumen chez la vache laitière (Joy et al. 1997 ; Knowlton et al. 1998).

## **Les buts et les objectifs du programme de recherche**

Le but ultime de l'étude est éventuellement de permettre l'utilisation de la valeur de la phosphatémie des bovins laitiers, comme indicateur biologique de la biodisponibilité du phosphore alimentaire.

### **Les buts du programme de recherche sont :**

- de mieux connaître les facteurs (analytiques, biologiques et alimentaires) à l'origine des variations de phosphatémie chez les vaches laitières.
- d'évaluer la représentativité des valeurs de la phosphatémie mesurées entre 9 et 12 AM (temps de prélèvement habituel pour les vétérinaires cliniciens) en rapport à leur fluctuation journalière chez les bovins laitiers.

### **Les objectifs principaux de l'étude sont :**

- Vérifier les effets de facteurs pré analytiques et biologiques sur les valeurs de la phosphatémie:
  - évaluer l'effet de l'anticoagulant l'héparine sur la mesure de la phosphatémie.
  - comparer les valeurs de la phosphatémie pour des échantillons prélevés par ponction de vassaux coccygienne par rapport aux ceux de la jugulaire.
- Documenter les variations circadiennes de la phosphatémie
  - Mesurer les variations, à toutes les deux heures sur une période de 48 heures, de la phosphatémie et des paramètres liés à l'ingestion de protéines.
  - Déterminer l'effet des regroupements d'échantillons pour réduire les variations ultradiennes.

- Examiner la relation entre la digestibilité des sources d'hydrates de carbone ingérées et les valeurs de la phosphatémie chez les bovins laitiers.
  - Mesurer l'effet d'une infusion intraruminale de sucrose sur la phosphatémie, l'urémie, l'ingestion alimentaire et la production laitière.
  - Mesurer les effets de trois différentes sources d'hydrate de carbone sur la phosphatémie, l'urémie, l'ingestion alimentaire et la production laitière.

## **Article 1 :**

### **Effect of anticoagulant, venipuncture site, and time-related feeding on blood inorganic phosphorus in dairy cows**

Lisandro Atilio Montiel Ramos<sup>1,2</sup>, Vincent Girard<sup>2</sup>, Younes Chorfi<sup>2</sup>, Armand Tremblay<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Current address Universidad Autonoma Metropolitana Unidad Xochimilco,  
Mexico, D. F.

<sup>2</sup> Département de Biomédecine Vétérinaire, Faculté de Médecine Vétérinaire,  
Université de Montréal, 3200 Sicotte St-Hyacinthe, Québec J2S 7C6.

Soumis à

## ***Effect of anticoagulant, venipuncture site and time-related feeding on blood inorganic phosphorus in dairy cows***

Lisandro Atilio Montiel Ramos, Vincent Girard, Younes Chorfi, Armand Tremblay

### ***Abstract***

**Background:** To assess hypophosphatemia in dairy cow, a precise biological parameter is needed. Plasmatic inorganic phosphorus (Pi) can be used as potential indicator of bioavailability of feed phosphorus (P) in dairy cows. **Objective:** To evaluate the effect of anticoagulant, blood sampling site (jugular vs coccygeal) and the effect of morning feeding on blood Pi concentrations in dairy cows. **Methods:** blood samples from 28 clinically healthy multiparous Holstein cows (40 to 150 days in milk) were analyzed for Pi concentrations. Animals were sampled twice by coccygeal vessel into Vacutainer tubes both with and without sodium heparin 3 hours after the morning feeding. In 4 additional cows, concentrations of Pi were measured in blood samples obtained simultaneously by jugular and coccygeal venipuncture into heparinized tube before the morning feeding and 2h, 4h and 6h after the morning feeding. Results were analyzed at a 0.05  $\alpha$ -level using parametric statistical tests. **Results:** Serum and plasma concentrations of Pi were well correlated ( $r^2= 0.999$ ,  $P < .0001$ ) but serum Pi concentrations were higher than plasma Pi concentrations ( $P < .02$ ). Plasma Pi, two hours postprandial tend to be higher ( $P < .10$ ) than before feeding for the jugular venipuncture. There was no significant variation of plasma Pi during the postprandial AM period. However, in average jugular concentrations were 19% lower than coccygeal concentrations ( $P < .04$ ). **Conclusions:** In order to

increase accuracy of plasmatic Pi as potential indicator of bioavailability of feed P in dairy cows, the sampling time and the site of venipuncture must be taken in account to interpret Pi plasma concentrations.

## ***Introduction***

Increased environmental concerns and regulations have stimulated renewed interest in P in dairy cattle. Excessive dietary P intake leads to high fecal P concentration and surface runoff (Satter, 2002 ; Valk et al., 2002). However, limiting P intake might induce hypophosphatemia in dairy cows as the result of a sudden and increasing loss of P in milk (Satter, 2002). Hypophosphatemia has been associated with conditions that affect feed intake, milk production, or hydration status in early lactation (Satter, 2002; Valk and Sebek, 1999; Correa et al., 1993).

To diagnose hypophosphatemia in dairy cow, a precise biological parameter is needed. Plasmatic Pi can be used as potential indicator of the bioavailability of dietary P in dairy cows. In order to increase the accuracy of plasmatic Pi, effect of anticoagulant, venipuncture site and time after feeding must be considered as preanalytical sources of variation.

The aim of this study was to evaluate the effect of anticoagulant, blood sampling site (jugular vs coccygeal) and the effect of morning feeding on blood P concentration in dairy cows.

## ***Material and methods***

The study was conducted at the Centre de Recherche en Science Animales de Deschambault (CRSAD) of the Institut de Recherche et de Développement en Agroenvironnement (IRDA) in Deschambault, Quebec. The diets were provided as a TMR consisting of corn silage, grass silage, chopped hay, cracked corn grain, rolled barley grain, soybean meal, a commercial protein supplement, and a commercial vitamin-mineral mixture. Diet concentrations of NEL, MP, NDF, Ca, and P were adjusted for milk production (NRC, 2001). Cows had free access to fresh water and were cared for according to guidelines provided by the Canadian Council on Animal Care (Olfert, 1993).

### **Effect of anticoagulant**

Values are presented as average  $\pm$  sd unless otherwise stated. Twenty eight clinically healthy multiparous Holstein cows averaging of  $4.4 \pm 2.3$  years of age,  $642 \pm 29$  kg body weight,  $164 \pm 72$  day in milk and producing  $36.3 \pm 11.0$  kg of milk daily were used. Cows were sampled twice by coccygeal vessel (7 ml) into Vacutainer tubes both with and without sodium heparin (Becton Dickenson, Rutherford, NJ, USA) 3 hours after the morning feeding.

## **Effect of venipuncture site and time after feeding**

The experiment involved the use of 4 multiparous non pregnant Holstein dairy cows (average BW  $630 \pm 50$  kg) in early lactation ( $60 \pm 10$  d after calving). Concentrations of Pi were measured in blood samples obtained simultaneously by jugular and coccygeal venipuncture into heparinized tube before the morning feeding and at 2h, 4h and 6h after the morning feeding. Venous jugular catheters were installed on the first day of the trial (Micro-Renathane Tubing MRE-080 2 ml, Braintree Scientific, Braintree, MA, USA). A heparin solution prepared with 250 ml of 0.9% NaCl, 1000 IU/ ml of Hepalean (Organon Teknika, Toronto, ON, Canada) and 106 IU/ml penicillin G (Sigma Chemical, Co, St. Louis, MO, USA), was used to maintain patency of the catheters during the sampling period.

## **Biochemical analysis**

Blood samples without anticoagulant were allowed to clot for 45 min at room temperature and were then centrifuged at 3500 RPM for 20 min. Heparinized blood samples were immediately centrifuged at 3500 rpm for 20 min. Sera and plasma sample were analyzed on a Beckman-Synchron CX5 autoanalyzer (Beckman instruments, Fullerton, CA, USA) using Beckman reagents. Serum and plasma Pi concentrations were measured by a timed endpoint method, where, Pi reacts with ammonium molybdate in an acidic solution to form a colored phosphomolybdate complex that is monitored at 340 nm. The intensity in absorbance is directly

proportional to the concentration of Pi in the sample and is used by the system to calculate and express the Pi concentration. Intra- and inter-assay coefficients of variation were 2.30 % (n= 30) and 3.06% (n=60) respectively.

### Statistical analysis

Data were analyzed using SAS System software (SAS statistical software version 8, SAS Institute, Cary, NC, USA). A  $P$ -value  $\leq 0.05$  was considered significant. All mean values are reported with standard deviation ( $\pm$ SD).

To evaluate the effect of coagulant, regression analysis was performed using REG procedure which are + day in milk. Paired T-test was performed comparing concentration in plasmas.

Variations of  $r$ , e and time-related feeding were analyzed with SAS as repeated subject of measurement. The mixed model analysis method was restricted maximum likelihood (REML).

## **Results**

### **Effect of anticoagulant**

Serum and plasma concentrations of Pi were respectively  $1.85 \pm 0.32$  and  $1.82 \pm 0.31$   $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  ( $n=28$ ). They were well correlated ( $r^2= 0.999$ ,  $P < .0001$ ) (Fig 1) but serum Pi concentrations were higher than plasma Pi concentrations ( $P < .02$ ). Minima and maxima concentrations of Pi were 1.13 and 2.50  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  for sera and 1.10 and 2.44  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  for plasmas.

### **Effect of venipuncture site and time after feeding**

Plasma Pi, two hours postprandial tend to be higher ( $P < .10$ ) than before feeding for jugular venipuncture (table 1). There was no significant variation of plasma Pi during the postprandial AM period, however in average; jugular concentrations were 19% lower than coccygeal concentrations ( $P < .04$ ).

## **Discussion**

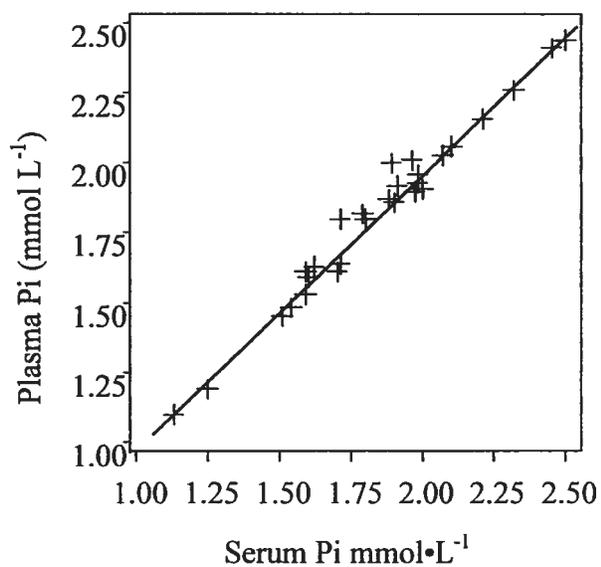
The current concerns about P runoff from dairy cattle industry increase the need for a precise biological parameter of dietary P status. Plasmatic Pi can be used as potential indicator of bioavailability of feed P in dairy cows. In order to increase the precision of plasmatic Pi, effect of anticoagulant and venipuncture site and time-related feeding as preanalytical sources of variation must be considered.

In this study, the means of plasma and serum Pi concentrations were in the normal ranges for similar dietary P and milk production of cows (Rogers & Poole, 1986; Tallam et al., 2005). As expected, plasma Pi concentrations were well correlated to serum Pi concentrations ( $r^2 = 0.999$ ,  $P < 0.0001$ ). However plasma Pi concentrations were significantly higher than serum Pi concentrations as reported by Williams et al. (1991) and Rogers & Poole, (1986). Hemolysis or an increase of red blood cell membranes permeability in serum samples can lead to this difference since red blood cells are 6 to 8 times more concentrated in Pi than serum (NRC, 2001) binding with heparan or fibrinogen also decrease Pi in plasma samples. Compared to plasma, serum as biological material is frequently used for laboratory biochemical analyses. But in experimental conditions or veterinary emergency medicine, clotting blood to get serum from tube without anticoagulant is more time consuming than plasma from tube with anticoagulant. In addition, centrifugation temperature varying from 4 to 15°C had no significant effect on plasma and serum Pi concentrations (data not shown).

Phosphorus absorption is thought occur mainly in the duodenum and jejunum (Scott et al., 1984). The absorption is in direct relation to supply of potentially absorbable P in the lumen of the small intestine (Care, 1994). In this study, two hours after the morning feeding, plasma Pi concentrations from jugular venipuncture tend to be higher ( $P < 0.10$ ) than those of prefeeding.

In average, jugular Pi concentrations were 19% lower than coccygeal Pi concentrations ( $P < .04$ ). This result is in agreement with previous report of Blowey (1992), who found differences of 15% to 20% between jugular and coccygeal Pi concentrations. Ingestion and rumination cause the excretion of large amounts of Pi rich saliva (Harris et al., 2003), whose Pi concentration can be 4 to 5 times that in blood plasma (NRC. 2001). This Pi is mainly cleared from blood the carotid region (Judkins et al., 1985; Parker and Blowey, 1974) and may explain the lower concentrations of Pi in jugular plasma samples than coccygeal ones. Then samples taken from a non feeding, non ruminating cow must avoid this artefact.

In conclusion, plasma concentrations of Pi were correlated, but significantly lower than serum Pi concentrations. In order to increase the accuracy of plasmatic Pi as potential indicator of bioavailability of feed P in dairy cows, the sampling time and the site of venipuncture must be taken in account to interpreted Pi plasma concentrations.

**Article 1, Figure 1.** Regression analysis of plasma and serum Pi concentrations

Εξίσωση  
 $y = x$   
 $b_1 = 1$

**Article 1, table 1.** Plasma Pi concentrations ( $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) from coccygeal (C) and jugular (J) venipunctures before and after the morning feeding.

Time-related feeding	C	J	P		
			Pre vs postprandial		C vs J
			C	J	
Preprandial	$1.75 \pm 0.35$	$1.37 \pm 0.37$	-	-	0.09
2h postprandial	$1.98 \pm 0.34$	$1.75 \pm 0.33$	N.S	0.09	N.S
4h postprandial	$1.89 \pm 0.33$	$1.53 \pm 0.18$	N.S	N.S	N.S
6h postprandial	$1.82 \pm 0.21$	$1.38 \pm 0.08$	N.S	N.S	N.S
All	$1.86 \pm 0.30$	$1.51 \pm 0.29$	-	-	0.04

N.S: non significant

## **Bibliographie**

Blowey, R.W. 1992. Metabolic Profiles. p. 601-606. *In: Bovine Medicine Diseases and Husbandry of Cattle*. A. H. Andrews, editor. Blackwell Scientific Publishing, Oxfordshire, New York USA..

Care, A.D. 1994. The absorption of phosphate from the digestive tract of ruminant animals. *Brit vet J*. 150:197-205.

Correa, M.T., H.N. Erb, and J.M. Scarlett. 1993. Risk factors for downer cow syndrome. *J Dairy Sci*. 76:3460-3463.

Harris, B.M., D Head, H.H. Van Horn, H.H. Phosphorus Nutrition and Excretion by Dairy Animals. *In series of the Animal Science Department*. Florida Cooperative Extension Service, editor. Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. <http://edis.ifas.ufl.edu/DS165> .

Judkins, M.W., JP Parker, EE and Wright, JD. 1985. Performance and phosphorus status of range cows with and without phosphorus supplementation. *J Range Manage*. 38:139-143.

National Research Council NRC. 2001. Nutrient Requirement of Dairy Cattle. 6 th edition (series: Nutrient Requirement of Domestic Animals), Edition : National academy press Washington, U.S.A.

Olfert, E.D. 1993. Guide to the care and use of experimental animals. Canadian Council on Animal Care, Ottawa. 232 pp.

Parker, B.J., and R.W. Blowey. 1974. A comparison of blood from the jugular vein and coccygeal artery and vein of cows. *Vet Rec*. 95:14-18.

Rogers, P.P., and EP Poole, DBR. Phosphorus status of cattle blood and forage in the Munster area. *Irish Vet J*. 40:176-182.

Satter, L. 2002. What goes in must come out-Phosphorus balance on dairy farms.. *In AABP Proc*. 35: 125-130.

Scott, D., A.F. McLean, and W. Buchan. 1984. The effect of variation in phosphorus intake on net intestinal phosphorus absorption, salivary phosphorus secretion and pathway of excretion in sheep fed roughage diets. *Q J Exp Physiol*. 69:439-452.

Tallam, S.K., A.D. Ealy, K.A. Bryan, and Z. Wu. 2005. Ovarian activity and reproductive performance of dairy cows fed different amounts of phosphorus. *J Dairy Sci*. 88:3609-3618.

Valk, H., and L.B.J. Sebek. 1999. Influence of long-term feeding of limited amounts of phosphorus on dry matter intake, milk production, and body weight of dairy cows. *J Dairy Sci.* 82:2157-2163.

Valk, H., L.B.J. Sebek, and A.C. Beynen. 2002. Influence of Phosphorus Intake on Excretion and Blood Plasma and Saliva Concentrations of Phosphorus in Dairy Cows. *J Dairy Sci.* 85:2642-2649.

Williams, S.N.M., L.R. Warnick, A.C. Wilkinson, N.S. Lawrence, L.A. 1991. Phosphorus concentrations in blood, milk, feces, bone and selected fluids and tissues of growing heifers as affected by dietary phosphorus. *In* Livestock Research for Rural Development 3, <http://www.cipav.org.co/lrrd/lrrd3/2/florida4.htm>.

## **Article 2 :**

### **Variations circadiennes et ultradiennes de la phosphatémie chez les bovins laitiers.**

Lisandro Atilio Montiel Ramos<sup>12</sup>, Vincent Girard<sup>2</sup> Younes Chorfi<sup>2</sup> Armand  
Tremblay<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Adresse actuelle Universidad Autonoma Metropolitana Unidad Xochimilco,  
Mexico, D. F.

<sup>2</sup> Département de Biomédecine Vétérinaire, Faculté de Médecine Vétérinaire,  
Université de Montréal, 3200 Sicotte St-Hyacinthe, Québec J2S 7C6.

## ***Variations circadiennes et ultradiennes de la phosphatémie chez les bovins laitiers.***

Montiel Lisandro, Vincent Girard, Younes Chorfi et Armand Tremblay

### ***Sommaire***

Les phosphatémies de six vaches Holstein en début de lactation ont été mesurées à deux heures d'intervalle pendant les dernières 48h de 3 périodes d'observation de 29 jours. Les vaches, dont la production laitière variant entre 23 et 32 kg de lait par jour, étaient traites chaque jour à 07h00 et 18h00 et étaient nourries, à 10h00 et 18h00, avec une ration totale mélangée isoénergétique faisant varier les concentrations en protéine des repas selon trois traitements. La phosphatémie moyenne des échantillons de sang provenant de la jugulaire était de  $1.54 \pm 0.29$   $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  et elle était plus élevée le jour que la nuit. La présence d'un cycle circadien et de cycles ultradiens sur la phosphatémie des vaches laitières sont responsables de variation de  $0.60$   $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ .

Les données suggèrent que, même en préparant des échantillons composites d'échantillons prélevés toujours au même moment par rapport aux cycles biologiques, la variation ultradienne de la phosphatémie ne peut être réduite chez les bovins laitiers en dessous de  $\pm 0.15$   $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ . En conséquence, il sera toujours nécessaire de tenir compte de cette imprécision lors de l'établissement des valeurs de limites de référence.

## ***Introduction***

Chez la vache laitière, plusieurs métabolites et minéraux sanguins présentent des variations circadiennes (Bajcsy et al. 1999) qui obéissent à un cycle d'environ 24 h, que l'on nomme nycthéral. Les variations obéissant à des cycles plus courts, soit moins de 20 heures, sont appelées ultradiennes et elles sont conditionnés par l'environnement (alimentation, traite, éclairage), et les cycles ultradiens aléatoires (Haus et al., 1980; Hyman, 1990; Deswysen et al., 1989).

Dans une expérience précédente (Montiel et al., 2006), l'écart type de la phosphatémie d'un échantillon mesurée 3h après le repas chez 28 vaches saines était  $0.3 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , une valeur très proche d'un écart type moyen d'échantillons prélevés de façon répétée entre 0 et 6h après le repas chez quatre vaches. Cette similarité permet de supposer que les variations causées par des cycles circadien et ultradiens sont aussi importantes que les variations entre individus.

Or l'utilisation d'un paramètre sanguin comme l'un des moyens pour évaluer le statut nutritionnel nécessite des connaissances sur des cycles biologiques avant l'établissement des valeurs de limites de normalité (Piccione & Caole, 2002).

L'objectif de cette étude est donc de déterminer la présence et l'importance d'un cycle circadien et de cycles ultradiens sur la phosphatémie des vaches laitières et

de déterminer l'efficacité de l'analyse et d'échantillons composite pour réduire les variations ultradiennes aléatoires.

## **Matériel et Méthodes**

### **Animaux et conditions de captivité**

Six vaches Holstein en début de lactation (53 jours en lait) munies de fistules ruminales (Bar Diamond Inc., Parna, Idaho, USA) ont été utilisées selon un dispositif en carre latin comportant des trois périodes, trois traitements où les concentrations en protéine des repas varient, Chaque période, était divisée en deux phases, la première d'une durée de 20 jours pour permettre l'adaptation à la ration testée et la deuxième d'une durée de 9 jours, où du sucrose était infusé la nuit dans le rumen. Les phosphatémies individuelles ont été mesurées chaque deux heures pendant les dernières 48h chaque phase. Pour cette étude, seules les observations de la phase 1 sont utilisées, les données de la 2<sup>ème</sup> phase étant associés à l'étude du bilan azoté des bovins et fait l'objet d'une autre publication. Les vaches étaient placées dans des stalles individuelles et chaque traites jour à 07h00 et 18h00. Elles recevaient chaque jour, à 10h00 et à 18h00, une ration totale mélangée isoénergétique (NRC, 1989) faisant varier les concentrations en protéine des repas selon trois traitements (Tableau 1). La répartition des quantités distribuées lors des repas du matin et du soir était ajustée hebdomadairement afin que la consommation journalière ad libitum de MS l'ingestion de protéine soient semblables entre les traitements. Les expériences ont

été réalisées conformément au guide du Conseil Canadien de Protection des Animaux sur l'utilisation d'animaux en recherche (Olfert 1993).

Article 2, Tableau 1. Description des rations alimentaires selon les traitements en % de la matière sèche consommée

Traitement	<u>Haut - bas</u>		<u>Bas - haut</u>		<u>Témoin</u>	
	matin	soir	matin	soir	matin	soir
Repas						
Ensilage de maïs	48.61	57.72	57.72	48.61	56.51	56.51
Tourteau de soya	16.76	4.41	4.41	16.76	9.75	9.75
Supl. protéique	15.88	4.41	4.41	15.88	11.97	11.97
Mais cassé	18.76	31.54	31.54	18.76	21.43	21.43
Supl. minéral <sup>1</sup>	0	1.92	1.92	0	0.34	0.34
Total	100	100	100	100	100	100

<sup>1</sup> : *Vitarax 15-5* (*Vitarax 15-5* (15 % de calcium, 5 % phosphore et 8 % magnésium., COOP Fédéré, Québec)

## Mesure de la phosphatémie

Le jour 17 de chaque période, 70 mg de maleate d'acépromazine (Atravet, Ayerst Laboratory, Montréal, Québec) était mélangés au repas du matin pour faciliter la pose de deux cathéters dans chaque veine jugulaire vaches (Micro-Renathane Tubing MRE-080). Les cathéters étaient maintenus fonctionnels à l'aide de 0.2 ml d'une solution physiologique héparinée contenant de la pénicilline (250 ml de 0.9 % NaCl + 10 millions I.U. de pénicilline G et 5000 UI d'héparine). À partir de 10h00, le 18<sup>ième</sup> jour de chaque période, des prélèvements sanguins étaient effectués toutes les deux heures pendant 48 h. Les échantillons de 12 mL, prélevés à l'aide d'une seringue étaient transférés dans des tubes sans anticoagulant, qui étaient laissés à la

température de la pièce pour permettre la coagulation avant de les centrifuger à 3500 RPM et 4°C pendant 30 minutes. Les sérums étaient congelés à -20°C jusqu'au moment des analyses.

Les concentrations sériques en phosphore (P) ont été déterminées à l'aide d'un analyseur biochimique automatisé (Synchron CX5, Beckman Coulter, Brea., Calif.) utilisant des réactifs commerciaux (Beckman Coulter, Somerset, NJ). Le domaine de mesure du phosphore inorganique sérique ou plasmatique avec cette méthode se situe entre 0.10 et 6.40 mmol•L<sup>-1</sup>.

## **Statistiques**

Les séries de mesures de chaque animal ont été étudiées à l'aide d'une analyse spectrale (Van Dongen et al., 1999). Ce type d'analyse superpose des fonctions trigonométriques qui, s'ajustent à la périodicité des variations observées. Avec 24 observations étalées ou répartie sur 48h, l'analyse spectrale décompose les variations observées de la phosphatémie en 12 périodicités ou cycles. Selon la durée du cycle, celui-ci se répète le nombre de fois qui correspond à sa fréquence, ainsi le cycle de 8h se répète six fois en 48 h et sa fréquence est donc de six. La plupart des ces périodicités sont virtuelles, c'est à dire qu'elles n'interviennent que pour des raisons mathématiques. Il faut donc distinguer parmi les périodicités celles qui ont des causes spécifiques ou aléatoires. Comme les repas étaient espacés de 8h, tous les cycles ultradiens conditionnés plus grands ou égaux à 8h, y compris le cycle nycthéral,

ont été considérés comme circadiens, les autres correspondant aux variations ultradiennes 'aléatoires'. Toutes les séries d'observations ont été standardisées à l'aide de la procédure STDIZE (SAS Institute, 2000). Puis la procédure SPECTRA (SAS Institute, 2000) a été utilisée pour obtenir les périodogramme des 18 séries de 24 observations standardisées de la phosphatémie. Une filtration a été ensuite effectuée pour éliminer de la variation standardisée attribuable aux cycles ultradiens aléatoires.

On a ensuite regroupé les six vaches par période en groupes de 1, 2, 3, 4 ou 5 vaches et calculé la phosphatémie moyenne du groupe pour chacun des 24 échantillons des séries de 48 h. Pour chacun des groupes, on a obtenu le pourcentage de variations attribués aux variations ultradiennes en divisant la somme des variations par cycles ultradiens par la somme des douze cycles du périodogramme. La même opération a été répétée pour les cycles dits circadiens.

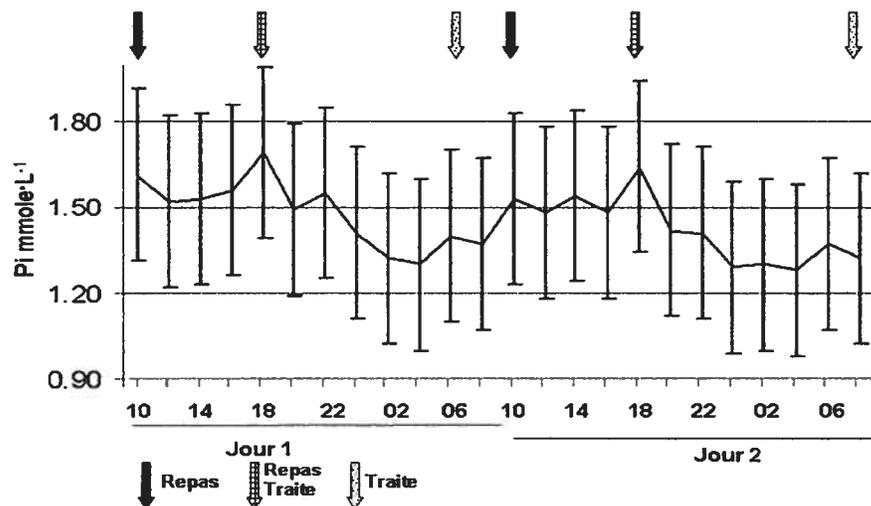
### ***Résultats et discussion***

Une phosphatémie moyenne de  $1.54 \pm 0.29 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  est obtenue pour les six vaches et de leurs 24 échantillons de chacune des trois séries de 48 h. Cette donnée se compare bien avec celle des échantillons prélevés par ponction de la jugulaire d'études précédentes (Montiel et al., 2006; Borucki Castro et al., 2004; Dubreuil et al., 1997), mais diffère des valeurs obtenues avec les échantillons coccygiens (Hewett, 1974; Pelletier et al., 1985; Tremblay, 1996). Les valeurs de la

phosphatémie déterminées à partir d'échantillons de sang provenant de la jugulaire sont inférieures par rapport à celles provenant du sang des vaisseaux coccygiens.

La figure 1 illustre les variations de la phosphatémie sérique ( $P_i$  en  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) de six vaches laitières au cours de 48 heures débutant à partir de 10:00h, mesurée à chaque deux heures. Les valeurs maximales s'observent vers 18:00 heures soit au moment du repas du soir et minimales vers 2:00 h. La phosphatémie semble obéir à des variations cycliques, et ces résultats sont différents de ceux déjà reportés (Manston et al., 1981).

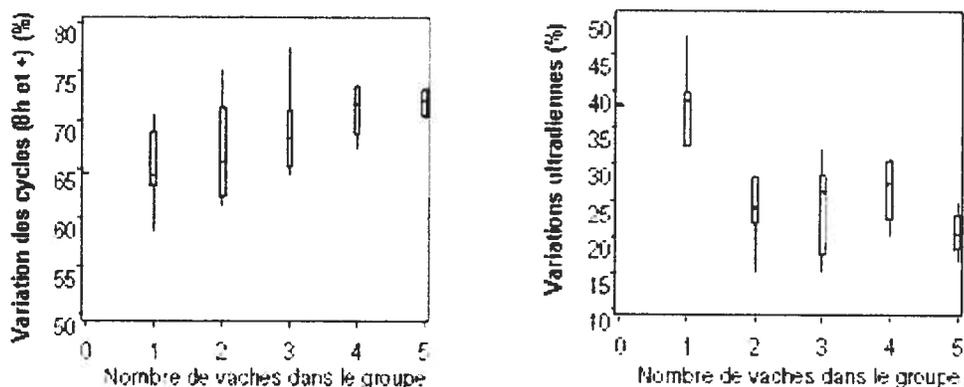
**Article 2, Figure 1.** Variations de la phosphatémie sérique chez les bovins, mesurée à toute les deux heures pendant une période de 48 h.



### Variations ultradiennes

La figure 2 permet de constater que les variations ultradiennes aléatoires diminuent rapidement avec le nombre de vaches par groupe. À partir de quatre vaches, ces variations ne représentent que 26% de la variation standardisée de la série de phosphatémies.

**Article 2, Figure 2.** Effet du nombre de vaches dans un échantillon groupé sur la décomposition de la variation de la phosphatémie pendant 48h en cycles de 8 hrs et plus<sup>1</sup> et en cycles ultradiens aléatoires<sup>2</sup>.



Légende pour le boxplot : Moyenne, ligne du centre ; E.T. ligne inférieure ou supérieure

<sup>1</sup>: cycles de 8 heures et plus : somme de la variation expliquée par des cycles plus grands que ou égal à 8h.

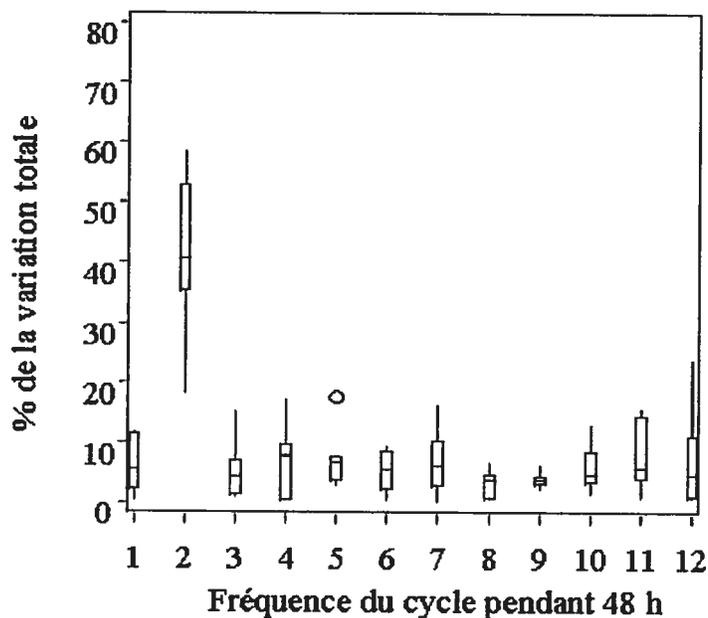
<sup>2</sup>Cycles ultradiens aléatoires : variation totale – variation des cycles de 8h et +.

Peu de travaux ont étudié l'importance du nombre d'animaux à échantillonner pour réduire au minimum les effets des variations ultradiennes aléatoires sur les valeurs de référence des paramètres sanguins des bovins laitiers et la phosphatémie en particulier, (Lumsden, 1998 ; Piccione & Caola, 2002 ; Whitaker, 2000).

Le périodogramme d'un groupe de quatre vaches est représenté dans la figure 3. Le cycle le plus important est le cycle circadien, qui se produit avec une fréquence de deux cycles en de 48h. Le cycle de 8h, dont est de 6 fois en 48 heures est peu important, probablement parce qu' il est difficile à différentier des cycles de 16 heures (fréquence 3) et de 12 heures (fréquence 4). La variation expliquée par les

cycles de 8 heures et plus est la somme des variations de cycles de fréquence égale ou inférieure à 6 (72 %, cycles de 8 à 24h).

**Article 2, Figure 3.** Périodogramme (% de la variation totale standardisée par cycle) d'un groupe de quatre vaches échantillonnées pendant 48 h à trois reprises.



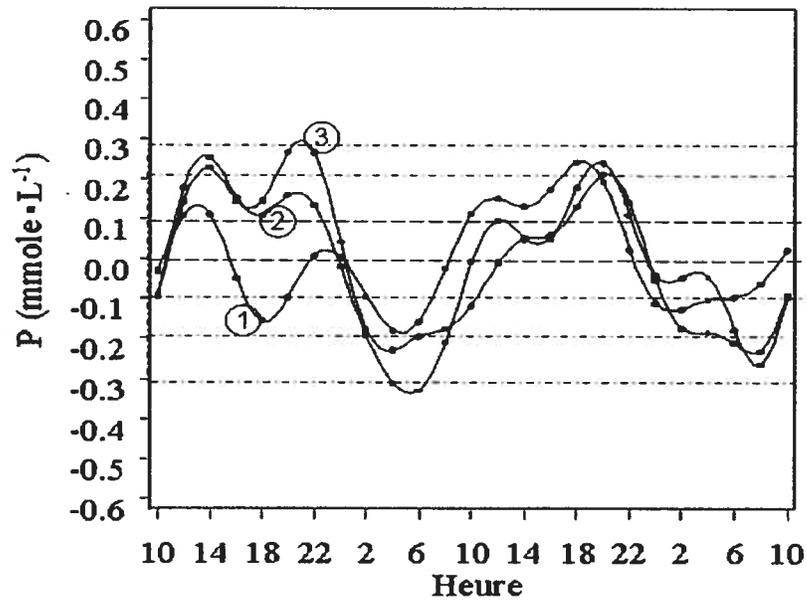
### Séries filtrées de la phosphatémie

Comme nous l'avons vu avec les données antérieures, le cycle le plus important est le circadien. Cependant, une expérience faite avec des ruminants privés de nourriture a démontré la persistance d'un cycle circadien en l'absence d'influences exogènes. Les valeurs de la phosphatémie sont plus élevées le jour que la nuit et ce malgré la privation de nourriture (Valtorta et al., 2000). Il semblerait donc que le cycle circadien soit bien endogène, donc exempt des influences de la traite et de l'alimentation. La valeur de la phosphatémie entre le jour et la nuit peut varier

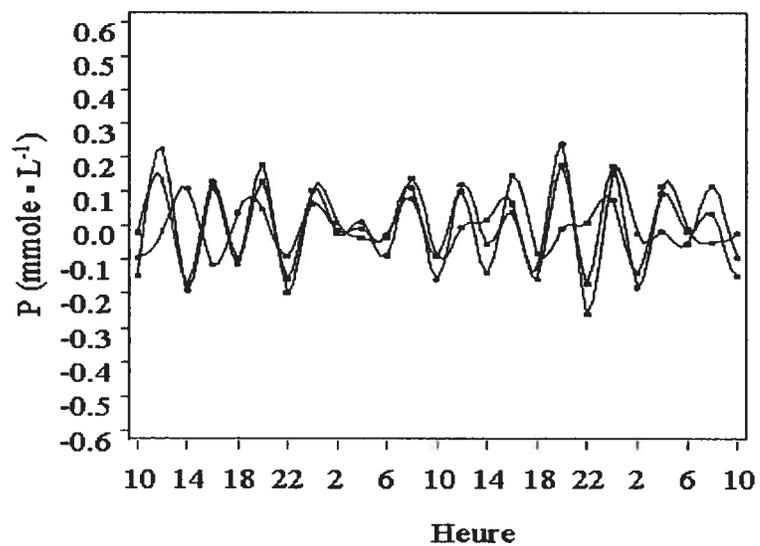
jusqu'à  $0.6 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  (figure 4). Les effets des facteurs synchronisateurs comme la fréquence des repas ou de la traite (Deswysen et al., 1989) sont beaucoup moins importants sur la phosphatémie des bovins laitiers. On distingue une première augmentation vers 14h puis vers 22h, soit dans les deux cas, quatre heures après la distribution d'aliment. Les valeurs les plus proches de la phosphatémie moyenne se trouvent avant le repas du matin ou vers 02h00 (Portale et al., 1987; Valk et al. 2002).

Un prélèvement quatre heures après un repas surévalue la phosphatémie moyenne d'environ  $0.2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ . Cette valeur est semblable à celle trouvée par Forar et al. (1982). Cependant, quelque soit le moment du prélèvement diurne, les variations ultradiennes restent importantes. Comme on peut le voir dans la figure 5, les variations ultradiennes 'aléatoires' sont de  $\pm 0.15 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , sauf entre 02h00 et 06h00. Ce moment est cependant impraticable dans le cadre des prélèvements sanguins effectués chez les producteurs laitiers.

**Article 2, Figure 4** : Cycles de 8h et plus de la phosphatémie standardisée d'un groupe de quatre vaches mesurées à trois reprises (1)(2)(3).



**Article 2 - figure 5** : Cycles ultradiens aléatoires de la phosphatémie standardisée d'un groupe de quatre vaches mesurées à trois reprises. La variation moyenne est de  $\pm 0.15 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  de sérum.



Ces résultats démontrent des variations cycliques de la phosphatémie chez ce groupe de vaches en lactation. Ces données peuvent s'inscrire dans la nouvelle approche des rythmes biologiques. Les observations individuelles ou de groupes de la phosphatémie, répétées au cours de la journée, peuvent permettre l'établissement d'écart de référence à des moments déterminés au cours de la journée. Le chronogramme de la phosphatémie chez les bovins laitiers permettrait peut-être la mise en évidence de variations relié à la biodisponibilité phosphore alimentaire (Piccione et al., 2002).

Pour certains paramètres biochimiques sanguins comme le calcium ionisé, le sodium, le potassium, les chlorures et le pH, les variations circadiennes sont faibles (Csaba et al., 1999), ce qui rend superflue la standardisation du moment des prélèvements pour des examens diagnostics de routine. Cependant, il peut être important de standardiser le moment du prélèvement pour des études comparées pour lesquelles les différences sont plutôt faibles (Csaba et al., 1999).

Les variations journalières du Pi et de plusieurs autres métabolites sanguins doivent être tenues en compte pour établir les valeurs de référence et pour réduire les sources potentielles d'erreur lors de l'interprétation (Coggins et Field, 1976; Downie, 1975; Lumsden, 1998 ; Manston et al., 1981; Whitaker, 2000).

## **Conclusion**

La valeur moyenne de la phosphatémie sur des échantillons de sang provenant de la jugulaire est de  $1.54 \pm 0.29 \text{ mmole}\cdot\text{L}^{-1}$  et elle est plus élevée le jour que la nuit. Même en regroupant les échantillons provenant de quatre vache et en les prélevant toujours au même moment par rapport à une variation de  $0.6 \text{ mmole}\cdot\text{L}^{-1}$  associée aux cycles exogènes, il semble impossible de réduire la variation ultradienne de la phosphatémie chez les bovins laitiers, en dessous de  $\pm 0.15 \text{ mmole}\cdot\text{L}^{-1}$ . En conséquence, il sera toujours nécessaire de tenir compte de cette imprécision lors de l'établissement des valeurs de limites de normalité.

## **Bibliographie**

- Bajcsy, C.A., J. Reiczigel, and O. Szenci. 1999. Circadian changes in blood ionized calcium, sodium, potassium, and chloride concentrations and pH in cattle. *Am J Vet Res.* 60:945-8.
- Borucki Castro, S.I., L.E. Phillip, V. Girard, and A. Tremblay. 2004. Altering dietary cation-anion difference in lactating dairy cows to reduce phosphorus excretion to the environment. *J Dairy Sci.* 87:1751-7.
- Coggins, C.R.E., and A.C. Field. 1976. Diurnal variations in the chemical composition of plasma from lactating beef cows on three dietary energy intakes. *J Ag Sci Camb.* 86:595-602.
- Csaba, A., J. Reiczigel, and O. Szenci. 1999. Circadian changes in blood ionized calcium, sodium, potassium, and chloride concentrations and pH in cattle. *Am J Vet Res.* 60:945-948.
- Deswysen, A.G., P.A. Dutilleul, and W.C. Ellis. 1989. Quantitative analysis of nycterohemeral eating and ruminating patterns in heifers with different voluntary intakes and effects of monensin. *J Anim Sci.* 67:2751-61.

- Dubreuil, P., and H. Lapierre. 1997. Biochemistry reference values for Quebec lactating dairy cows, nursing sows, growing pigs and calves. *Can J Vet Res.* 61:235-9.
- Forar, F.L., R.L. Kincaid, R.L. Preston, and J.K. Hillers. 1982. Variation of inorganic phosphorus in blood plasma and milk of lactating cows. *J Dairy Sci.* 65:760-3.
- Haus, E., G. Cornelissen, and F. Halberg. 1980. Introduction to chronobiology. In *Chronobiology: principles and applications to shifts in schedules*. L.E.a.H. Sheving, F., editor. Sijthoff and Noorhoff International Publishers, The Netherlands.
- Hewett, C. 1974. On the causes and effects of variations in the blood profile of Swedish dairy cattle. *Acta Vet Scand Suppl*:1-152.
- Hyman, J.W. 1990. *The light book: how natural and artificial light affect our health, mood, and behavior*. Tarcher Inc, Los Angeles, U.S.A.
- Lumsden, J.H. 1998. Normal or Reference Values: Questions and Comments. *Vet Clin Path.* 27:102-106.
- Manston, R., G.J. Rowlands, W. Little, and K.A. Collis. 1981. Variability of the blood composition of dairy cows in relation to time of day. *J Ag Sci Camb.* 96:593-598.
- Montiel Ramos, L.A., V. Girard, Y. Chorfi and A. Tremblay. 2006. Effect of anticoagulant, venipuncture site and time-related feeding on blood inorganic phosphorus in dairy cows. *J Clin Path.* Soumis.
- NRC. 1989. Nutrient Requirements of Dairy Cattle. National Academy Press, Washington, DC. 158 pp.
- Olfert, E.D. 1993. Guide to the care and use of experimental animals. Canadian Council on Animal Care, Ottawa. 232 pp.
- Pelletier, G., A. Tremblay, and P. Hélie. 1985. Facteurs influençant le profil métabolique des vaches laitières. *Can Vet J.* 26:306-311.
- Piccione, G., and G. Caola. 2002. Biological rhythm in livestock. *J Vet Sci.* 3:145-57.
- Portale, A.A., B.P. Halloran, and R.C. Morris, Jr. 1987. Dietary intake of phosphorus modulates the circadian rhythm in serum concentration of phosphorus. Implications for the renal production of 1,25 dihydroxyvitamin D. *J Clin Invest.* 80:1147-54.
- SAS Institute. 2000. *Data mining using Enterprise Miner software: a case study approach*. SAS Institute, Cary, U.S.A.
- Tremblay, A.V. 1996. Les bilans biochimiques chez les bovins laitiers du Québec. In

*Pathologie et Nutrition, Journées Nationales des G.T.V.*, Angers, France. p. 283-287.

Valk, H., L.B.J. Sebek, and A.C. Beynen. 2002. Influence of Phosphorus Intake on Excretion and Blood Plasma and Saliva Concentrations of Phosphorus in Dairy Cows. *J Dairy Sci.* 85:2642-2649.

Valtorta, S.E., P.E. Leva, D.C. Diaz, A.R. Saurit, and J.c. Boggio. 2000. Variacion Circadiana de las Concentraciones Sericas de Calcio Y Fosforo en Terneros Holando Argentino. *Revista FAVE.* 14:23-29.

Van Dongen, H.P., E. Olofsen, J.H. VanHarteveld, and E.W. Kruyt. 1999. Searching for biological rhythms: peak detection in the periodogram of unequally spaced data. *J Biol Rhythms.* 14:617-20.

Whitaker, D.A. 2000. Use and Interpretation of Metabolic Profiles. *In The Health of Dairy Cattle.* A.H. Andrews, editor. Blackwell Science Ltd, London. p. 89-107.

### **Article 3 :**

**Effects of type of carbohydrate supplementation and pattern of feed consumption on blood inorganic phosphorus in lactating dairy cows.**

Lisandro Atilio Montiel Ramos<sup>12</sup>, Vincent Girard<sup>2</sup>, Younes Chorfi<sup>2</sup>, Armand Tremblay<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Current Address : Universidad Autonoma Metropolitana  
Unidad Xochimilco, Mexico, D. F.

<sup>2</sup> Département de Biomédecine Vétérinaire, Faculté de Médecine Vétérinaire,  
Université de Montréal, 3200 Sicotte St-Hyacinthe, Québec J2S 7C6.

***Effects of type of carbohydrate supplementation and pattern of feed consumption on blood inorganic phosphorus in lactating dairy cows.***

Montiel Lisandro, Vincent Girard, Younes Chorfi, Armand Tremblay

***Résumé***

Six vaches en lactation ont été soumises à des traitements alimentaires avec l'infusion ruminale de sucrose et trois source d'hydrates de carbones dans la ration. Des prises de données horaires pour l'ingestion de MS et de sang ont été effectuées pour la détermination de la phosphatémie. Les données de production de lait ont été prises pour chacune des traites. L'analyse spectrale a été utilisée pour identifier la périodicité des variations observées. L'infusion ruminale de sucrose a entraîné une diminution significative de la phosphatémie, de la consommation volontaire et du taux de gras du lait chez les vaches traitées. La présence de maïs floconné, de maïs moulu ou de pulpe de betterave dans la ration de groupe de vaches n'a pas modifié les cycles biologiques de la phosphatémie.

## Introduction:

Lowering phosphorus intake by dairy cows can reduce phosphorus losses and increase efficiency for milk production (Wu et al., 2000), but diets must contain sufficient phosphorus to avoid hypophosphatemia (Valk et al., 2002), particularly if phosphorus bioavailability is variable (Bravo et al., 2003; Konishi, et al., 1999). In general, phosphorus bioavailability increases with increasing non-structural carbohydrates (National Research Council, 2001). Although phytase activity occurs in the rumen, the physical properties of the diet and ruminal transit rate may impede the total hydrolysis prevent phytate of in the rumen of lactating cows (Kincaid et al., 2005). Information is also scarce on the effect of phosphorus depletion on intestinal absorption (Schroder et al., 1995).

Plasma inorganic phosphorus (Pi) has been used to monitor hypophosphatemia (Valk et al., 2002). But changes of Pi appear to be related to an ultradian pattern of feed consumption and rumination (Forar et al., 1982), hence the use of a single daily Pi value as sole or primary means of determining nutritional phosphorus status of cows groups is limited (Wu et al., 2000). Therefore, our first objective is to study the relationships between ultradian Pi variations and dry matter intake or time spent ruminating.

Ruminal sucrose infusion (Wu et al., 1994; Kim et al., 1999) and intake of beet pulp (O'Mara et al., 1997) as been shown to increase milk protein production, which is the carrier of calcium phosphate in milk (Swaisgood, 1982). But substitution

of corn by beet pulp might decrease dry matter intake since beet pulp contains as much as 47% neutral detergent fiber (NDF), notwithstanding it is often considered to be concentrate-like (Van Soest, 1994). Our second objective was therefore to investigate how Pi variations induced by pattern of feeds consumption could relate to different non-structural carbohydrate sources.

## **Materials and methods**

### ***1- Animals, experimental design and diets***

The study was conducted at the Centre de Recherche en Science Animales de Deschambault (CRSAD) of the Institut de Recherche et de Développement en Agroenvironnement (IRDA) in Deschambault, Quebec. Animal care procedures followed guidelines of the Canadian Council on Animal Care (Olfert, 1993) and the protocol was approved by the Animal Care Committee of the CRSAD-IRDA. The experiment involved the use of 6 multiparous Holstein dairy cows (average  $630 \pm 50$  kg BW), three in early ( $80 \pm 10$  DIM) and three in late lactation ( $180 \pm 40$  DIM). Cows, that were fitted a ruminal cannule (Bar Diamond, Inc., Parma, ID), were housed in individual tie stalls and had ad libitum access to feed delivered in equal amounts at 07h00 and 18h00, i.e. at the beginning of morning and evening milking. Dry matter intake (DMI) and time spent ruminating (T-RUM) were continuously recorded (Girard and Labonte, 1993).

The study was conducted as a duplicated 3 x 3 Latin square design according to DIM, with three 28-d periods, each consisting of 20 d for adaptation followed by 8 d of daily sucrose infusions (SI).

Each period had two 24-hour data collections, one on day 21, before SI, and on day 28, at the end of SI. Based on the results of a preliminary experiment with increasing amounts of sucrose added to the diet, the maximum amount of sucrose with little as possible effect on voluntary feed intake was estimated to be 3 kg and the rate of infusion of the sucrose solution ( $0.3 \text{ kg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) was set to  $1.25 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$ . Sucrose infusions started at 10h00 and ended at 18h00.

Starting with a diet formulated to support  $30 \text{ kg}\cdot\text{d}^{-1}$  of 3.5% fat-corrected milk (FCM) with corn silage and flaked corn (FC), two more diets (Table 1) were created by either substituting corn grain by fine grinded corn grain (CC) or by dry beet pulp (BP). The BP diet was additionally supplemented with disodium phosphate to meet the NRC (2001) requirements for phosphorus, which was the case for the other diets (0.42% phosphorus). The amounts of feed offered and cover were recorded; samples of the diet and refusals were collected, then dried and pooled everyday in order to calculate daily DMI.

## **2- Sample Collection and Analysis**

On day 18 of each period, cows were fitted with two jugular catheters (30 cm, Micro-Renathane Tubing MRE-080, Braintree scientific, Braintree, MA). A heparin solution made of 50 ml of 0.9% NaCl, 1000 IU of Heparin (Organon Teknika, Toronto, ON, Canada) and  $10^6$  IU penicillin G (Sigma Chemical, Co., St. Louis, Mo), was used to maintain patency of the catheters during blood sampling. During the 24-hour collection periods, on days 21 and 28, 12 ml of blood were collected hourly into evacuated heparinized tubes, and centrifuged (2800 g, 4°C, 25 min). Plasma was stored at -20°C pending analysis. Inorganic phosphorus (Pi) was measured with a Synchron CX5 (Beckman Coulter, Brea., Calif.) and commercially available reagents (Beckman Coulter, Somerset, NJ).

Feed ingredient diets were sampled biweekly, dried, grounded in a Cyclotec sample mill (Perstorp Analytical, Silversprings, MD) to pass through a 1-mm screen and stored. At the end of each period, the samples were combined for nutrient analysis. All feed ingredients were analyzed by proximate analysis according to AOAC (AOAC International, 1990) prior to ration formulation. Phosphorus concentrations were measured by wet chemistry (ICAP PLASMA 9000, St-Paul, Missouri). Neutral detergent fiber (NDF) was analyzed using a procedure described by Van Soest et al. (1991).

Milk volume was recorded during the collection period using Tru-test™ meters (SURGE, Mississauga, ON). Samples from the morning and afternoon

milking were collected in proportion to milk yield and transferred into sample vials. Milk concentrations of fat, protein and lactose were analyzed with an infrared system using an electric Milk-O-Scan 4000 (Foss-Food Technology, Hillerød, Denmark). The instrument was calibrated with reference standards, as determined by Mojonnier and Kjeldahl methods (AOAC International and Cunniff, 1995).

### **3- Statistical analysis**

Data for milk yield and milk composition were analyzed as a double Latin square design with repeated observations (SI effect). The model included the effects of cows, square, cows within square, period, type of carbohydrate (TC) and, as repeated observations, interaction of main effects with the SI effect. Effects of TC and SI were obtained as contrast a priori estimates.

T-RUM, Pi and DMI represent individual time-series of equally spaced observations ( $y_t$ ;  $t = 1, \dots, 24$ ) where  $Y_t$  represents the value at hour  $t$ . These series were subjected to the spectral analysis of the SAS® System (SAS statistical software version 8, SAS Institute, Cary, NC, USA), a variance decomposition in which the total variance was partitioned among 12 independent rhythm components (RC) (Deswysen et al., 1993). Periodogram values were interpreted in terms of variance (sums of squares) of the data at the respective frequency and standardized by dividing each value by the time-series sum of square. Periodogram values were customarily plotted against RC frequencies. Factor effects on periodograms were analyzed as described above for daily milk productions.

In a sense, a time-series mean is a RC of frequency 0 (zero) per unit time; that is, it is a constant. RC 1 represents a sinusoidal circadian variation and the contribution to total variations of RC 2 - RC 12 is the ultradian variation. A main reason for problems in determining relations between chronological series is observational noise (Muller, et al., 2003), a source of variation in the input series not related to the output one. In this study, we propose a simple method for filtering noise: the predominant frequency components shared by both the input and output series were estimated at the end of a stepwise procedure involving the observed output  $P_i$  series and the DMI and T-RUM input series. RC not significantly related to  $P_i$  variations were then qualified as noise and subtracted from observations. Relative importance of noise-free series was calculated based on periodogram values.

The relationships between DMI, T-RUM series (covariables) and  $P_i$  values (dependent variable) were analyzed. The following model was used with the MIXED procedure of the SAS® System:

$$\text{Var1\_Rjk} = \mu + \text{TC}_{jk} + \text{SI}_{jk} + \text{Per}_j + \text{Cow}_k + \beta \text{Var2\_Rjk} + \beta_{jk} \text{ISerie}_{jk} + \epsilon_{jk}$$

with

Var1_Rjk	= Output series during the jth period ( 1-3 ) on kth cows (1-6) of the latin squares;
Var2_Rjk	= Input series (covariable) during the jth period ( 1-3 ) on kth cows (1-6) of the latin squares;
$\mu$	= overall mean;
$\text{TC}_{jk}$	= the fixed effect of the jk th type of carbohydrate ( jk=1-3 ) ;
$\text{SI}_{jk}$	= the fixed effect of sucrose infusion;
$\beta$	= mean slope of the relationship between the output and the input series (covariable);
$\beta_{jk}$	= variations of slope with fixed effects;
$\text{Per}_j$	= effect of the j th period;
$\text{Cow}_k$	= effect of the kth cow
$\epsilon_{jk}$	= random error on the jk th measurement.

Fixed effects were tested on the latin square error term, while slopes and contrasts used to test the equality of slopes were tested on  $\epsilon_{jk}$ , an error term containing linear and non-linear effects of time. The mixed model analysis estimation method was restricted maximum likelihood (REML) and the repeated measures procedure was applied to account for the repeated measurements before and during the sucrose infusion and to account for chronological series. The criterion for declaring an effect to be statistically significant was predetermined at the 5 % level; values at 10% level of probability were considered as expressing a tendency. The assumptions of normality and equality of variance in the duplicated latin-square design were checked by analysis of residuals.

## **Results and Discussion:**

### ***Voluntary feed intake, time spent ruminating, milk production and mean Pi.***

In average, cows spent  $18.8 \pm 0.5 \text{ min} \cdot \text{h}^{-1}$  ruminating (range 0-60 min) and ingested  $0.94 \pm 0.04 \text{ kg DM} \cdot \text{h}^{-1}$  (range 0-4.8 kg). Infusion of 3 kg of sucrose lead to a  $3.34 \pm 0.52 \text{ kg}$  ( $P < 0.01$ ) daily decrease of DMI and time spent ruminating, irrespective of carbohydrate source (Table 2). However, milk production and milk protein were not affected, in agreement with Kim observations (1999). As a consequence, Pi was significantly reduced by SI (Table 2). But the type of dietary carbohydrate did not affect Pi despite a significative reduction of DMI by beet pulp, probably because of a

concomitant lower demand for milk production (Table 2). There was a direct relationship between milk P output and the percentage of apparent P digestibility for individual animals (Valk et al., 2002). Spent ruminating time  $\cdot \text{kg}^{-1}$  DM was longer (24 min,  $P < 0.02$ ) with beet pulp than for corn diets (22 min), a difference caused by greater NDF concentration (Yang et al., 2001). It appears that most daily variations on Pi were the consequences of the treatments effects on intake rather than a more direct effect on Pi metabolism (Forar et al., 1982). Concentration of Pi could increase or decrease in the hour following feeding depending of the amount of ingested feed, intensity of rumination and of P bioavailability (Tomas, 1974). Underwood (1981) concluded that serum Pi was a satisfactory criterion, whereas the Netherlands Committee of Mineral Nutrition (NCMN, 1973) does not recommend its use due to its great variation and the poor understanding of the factors that cause this variation.

↑  
RUMIN

### ***Periodogram of independent rhythm components***

#### **Rhythm component**

Rhythm components correspond to the integer number of cycles occurring over 24 h. (Deswysen et al., 1993). Variance analysis results for rhythm components (RC) 1 to 12 are summarized in figure 1 for DMI, time spent ruminating, and plasma Pi. For Pi, the 10h00-18h00 SI increased ( $P < 0.02$ ) RC 1 from 12.2 to 22.1%, and RC 7 from 5.7 to 11.1%. For DMI, RC 2 remained the main rhythm with  $21.2 \pm 3.0\%$  of variance and SI made RC 4 decrease from 10.9 to 6.1%.

The amplitude is of biological interest and may vary with treatment and individual cow. The contribution of a rhythm component to the total dispersion of a 24 h plasma Pi series is represented by the magnitude of its squared amplitude, that is, a periodogram (Priestley, 1981). Neither SI nor TC modified ultradian variations of time spent ruminating (T-RUM). As a result, daily means variations caused by SI (Table 2) were either resulting of an increase in circadian rhythm, like for Pi, or almost evenly distributed among RC, like for T-RUM. Rhythm components (number of cycles/24 h) were characterized by the finite Fourier transform of hourly means of the 24 h mastication activities (Deswysen et al., 1990).

#### **Relationships between DMI, T-RUM series and Pi values**

The stepwise procedure identified DMI RC 2,3,4,5 and 7 or T-RUM RC 2, 3 and 4 as the best predictors of the observed Pi time-series. Noise-free series were obtained as the sum of these RC. They represented the 24 h dispersion from Table 2 means with 50%, 59% and 37% respectively of Pi, DMI and T-RUM sum of squares. Deswysen has observed rhythm components 1, 3 and 4 contributed considerably to explaining the total dispersion of 24 h eating and ruminating mastication series (Deswysen et al., 1990). In average, cows had ruminating and eating activities in the same 60 min interval. For example, in the first three hours following the morning meal, cows ingested  $1.7 \pm 0.1 \text{ kg DM} \cdot \text{h}^{-1}$  and spent in average  $9 \pm 1 \text{ min} \cdot \text{h}^{-1}$  ruminating (figure 2 A). For each 10 min spent ruminating, late lactating cows decreased their hourly intake by  $0.63 \pm 0.03 \text{ kg DM}$  (Figure 2 B). With early lactating cow, the effect

variation  
 on T-RUM  
 is positive  
 negative

on intake was  $0.15 \pm 0.03$  less ( $P < 0.01$ ). TC and SI factors had no effect on this relationship.

In the relationships between DMI series (covariable) and Pi (dependent variable), a tendency existed for TC effects on covariable's slope which observed series. It becomes significant with noise-free series and slopes' coefficients were  $+0.101 \pm 0.007$ ,  $+0.088 \pm 0.008$ ,  $+0.068 \pm 0.009$  mmol Pi for each intake of 1 kg of, respectively, flaked corn, fine grinded corn or beet pulp diet (figure 3). With noise-free T-RUM, Pi decreased by  $0.032 \pm 0.005$  mmol for each 10 min spent ruminating irrespectively of treatments. However, because of the close relationship between noise-free intake and rumination time-series (fig 2) slopes are underestimates of real values since both effects tend to nullified each other in the same 60 min interval.

## Conclusions

The use of Pi in blood serum or plasma as an adequate criterion for assessing P status in ruminants is still controversial. Some of these factors, which may increase blood Pi concentrations, include feed intake and rumination. Cows infused ruminally with sucrose decreased their DMI and time spent ruminating, irrespective of carbohydrate sources. Milk production and milk protein were not affected, but Pi was significantly reduced.. It appears that most Pi daily variations were the consequences of the treatments effect on intake rather than a more direct effect on Pi metabolism.

Factorial  
+ P650  
sucrose  
Cows  
Pi intake

P  
RUMINA?  
TRANSFERENCE  
SUCROSE

Neither SI nor TC modified ultradian variations of time spent ruminating. As a result, daily means variations caused by SI were either resulting of an increase circadian effect, like for Pi.

In the relationships between DMI series and Pi, a tendency existed for TC effects on covariable's slope which observed series. With noise-free time spent ruminating, Pi decreased by  $0.032 \pm 0.005$  mmol for each 10 min spent ruminating irrespectively of treatments.

### ***Bibliographie :***

AOAC International. 1990. Official Methods of Analysis of AOAC International. Association of Official Analytical (AOAC), Arlington, USA.

AOAC International, and P. Cunniff. 1995. Official methods of analysis of AOAC International. AOAC International, Arlington, USA 2 v. pp.

Bravo, D., D. Sauvant, C. Bogaert, and F. Meschy. 2003. II. Quantitative aspects of phosphorus absorption in ruminants. *Reprod Nutr Dev.* 43:271-84.

Deswysen, A.G., P. Dutilleul, J.P. Godfrin, and W.C. Ellis. 1993. Nycterohemeral eating and ruminating patterns in heifers fed grass or corn silage: analysis by finite Fourier transform. *J Anim Sci.* 71:2739-47.

Deswysen, A.G., P.A. Dutilleul, and J.P. Godfrin. 1990. [Quantitative analysis of the rythm of feeding and merycismal activities]. *Reprod Nutr Dev.* Suppl 2:209s-210s.

Forar, F.L., R.L. Kincaid, R.L. Preston, and J.K. Hillers. 1982. Variation of inorganic phosphorus in blood plasma and milk of lactating cows. *J Dairy Sci.* 65:760-3.

Girard, V., and J. Labonte. 1993. Dispositif d'enregistrement en continu du comportement alimentaire journalier et etude de la variabilite du comportement aliemntaire chez la vache laitiere. *Ann Zootech.* 42:49-59.

Kim, K.H., J.J. Choung, and D.G. Chamberlain. 1999. Effects of varing the degree of synchrony of energy and nitrogen release in the rumen on the synthesis of microbial

protein in lactating dairy cows consuming a diet of grass silage and a cereal-based concentrate. *J Sci Food Agri.* 79:1441-1447.

Kincaid, R.L., D.K. Garikipati, T.D. Nennich, and J.H. Harrison. 2005. Effect of grain source and exogenous phytase on phosphorus digestibility in dairy cows. *J Dairy Sci.* 88:2893-902.

National Research Council. 2001. Nutrient Requirement of Domestic Animals, Nutrient Requirement of Dairy Cattle, Washington, DC.

Netherlands Committee of Mineral Nutrition (NCMN). 1973. Tracing Mineral Disorders in Dairy Cattle., Centre for Agricultural Publishing, Wageningen, The Netherlands.

Olfert, E.D. 1993. Guide to the care and use of experimental animals. Canadian Council on Animal Care, Ottawa. 232 pp.

O'Mara, F.P., G.K. Stakelum, P. Dillon, J.J. Murphy, and M. Rath. 1997. Rumen fermentation and nutrient flows for cows fed grass and grass supplemented with molassed beet pulp pellets. *J Dairy Sci.* 80:2466-2474.

Schroder, B., H. Kappner, K. Failing, E. Pfeffer, and G. Breves. 1995. Mechanisms of intestinal phosphate transport in small ruminants. *Br J Nutr.* 74:635-648.

Swaigood, H.D. 1982. *Developments in dairy chemistry I : proteins.* P.F. Fox, Editor, Applied Science Pub., London. pp 1-59, 409 p

Tomas, F.M. 1974. Phosphorus Homeostasis in Sheep. II : Influence of Diet on the Pathway of Excretion of Phosphorus. *Aust J Agric Re.* 25:485-493.

Underwood, E.J. 1981. The mineral nutrition of livestock. Commonwealth Agricultural Bureau, London, UK. 205 pp.

Valk, H., L.B.J. Sebek, and A.C. Beynen. 2002. Influence of Phosphorus Intake on Excretion and Blood Plasma and Saliva Concentrations of Phosphorus in Dairy Cows. *J Dairy Sci* 85:2642-2649.

Van Soest, P.J. 1994. Nutritional Ecology of the Ruminant. Cornell University Press, Ithaca, New York. 528 pp.

Van Soest, P.J., J.B. Robertson, and B.A. Lewis. 1991. Methods for Dietary Fiber, Neutral Detergent Fiber, and Nonstarch Polysaccharides in Relation to Animal Nutrition. *J Dairy Sci* 74:3583-3597.

Wu, Z., L.D. Satter, and R. Sojo. 2000. Milk production, reproductive performance, and fecal excretion of phosphorus by dairy cows fed three amounts of phosphorus. *J Dairy Sci.* 83:1028-41.

Wu, Z., F.T. Sleiman, C.B. Theurer, F. Santos, J.M. Simas, M. Francolin, and J.T. Huber. 1994. Effect of isocaloric infusion of glucose in the rumen or propionate in the duodenum. *J Dairy Sci.* 77:1556-62.

**Article 3, Table 1: Ingredients and analysis of diets used as treatments**

<u>Ingredients (% of MS)</u>	<u>Type of carbohydrate</u>		
	<u>Flaked corn (FC)</u>	<u>Fine grinded corn (CC)</u>	<u>Beet Pulp (BP)</u>
Alfalfa silage	33.19	33.45	33.70
Corn silage	30.63	30.87	31.17
Soybean meal	7.21	6.98	6.98
Top-dressing <sup>1</sup>	4.60	4.41	4.40
Corn grain	23.66	23.62	0.00
Beet pulp	0.00	0.00	23.00
NaCl	0.29	0.28	0.28
Mineral supl. <sup>2</sup>	0.38	0.38	0.47
<u>Analysis</u>			
NE <sub>L</sub> (Mcal•kg <sup>-1</sup> MS)	1.55	1.54	1.43
NDF (%)	24.6	24.8	27.0
ADF (%)	21.9	22.0	26.6
CP (%)	18.4	18.2	18.6
P (%)	0.42	0.42	0.42

<sup>1</sup> Top-dressing : 44.4 % BP, 3.33 % Ca and 1.67 % P (Coopérative Fédérée du Québec)

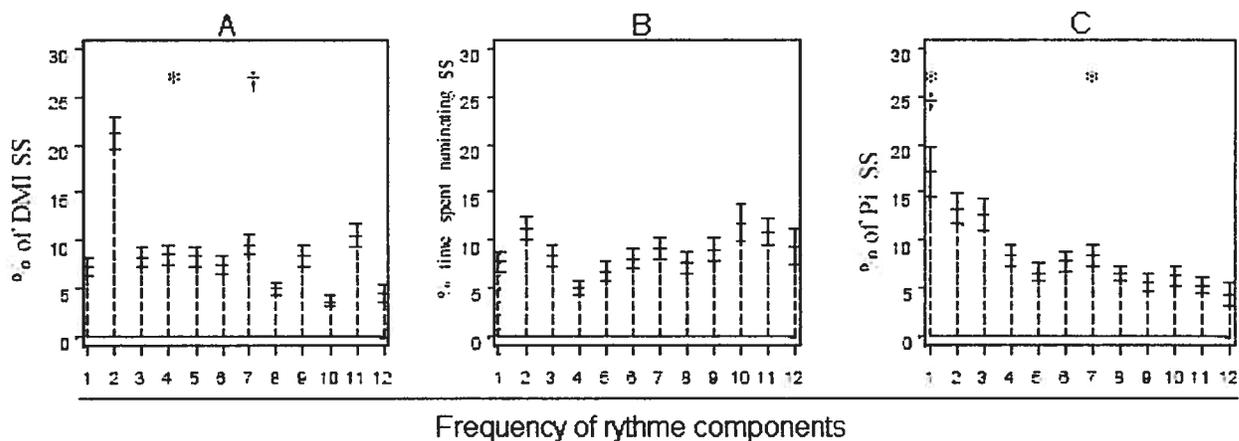
<sup>2</sup> Mineral supl : VitarauX 3-13 (Coopérative Fédérée du Québec) : 3 % Ca and 13 % P

**Article 3, Table 2:** Least square means of daily milk productions, daily time spent ruminating, daily dry matter intake and mean daily

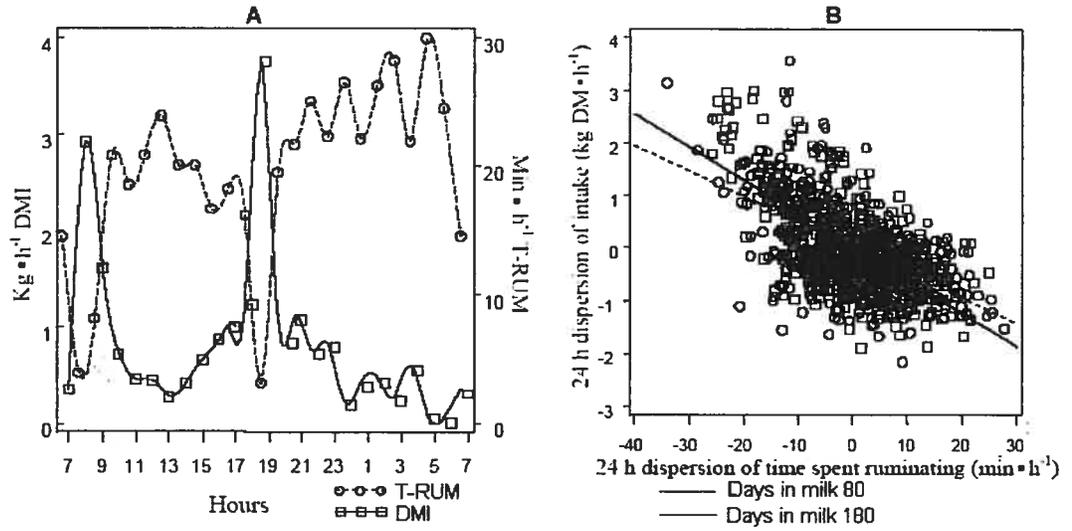
plasma Pi (A=Flaked corn B=Fine grinded corn C=Beet pulp)

	Least square means of factors						Probabilities				
	Sucrose (SI)		Carbohydrate (TC)			SI	TC	TCxSI	A vs C		A vs B
	without	with	A	B	C				B vs C	A vs C	
Milk production (kg•d <sup>-1</sup> )	28.66	28.18	29.89	28.57	27.30	0.42	0.01	0.17	0.01	0.29	0.03
Protein (%)	3.49	3.58	3.51	3.54	3.56	<0.00	0.37	0.48	0.18	0.67	0.36
Fat (%)	4.35	4.69	4.46	4.52	4.58	0.01	0.69	0.72	0.40	0.66	0.68
Milk protein (kg•d <sup>-1</sup> )	1.01	1.00	1.05	1.01	0.96	0.87	0.03	0.34	0.01	0.11	0.18
Time spent ruminating (min•d <sup>-1</sup> )	493.3	453.7	485.2	462.5	472.7	0.02	0.46	0.75	0.49	0.57	0.23
DMI (kg MS•d <sup>-1</sup> )	22.39	19.05	21.50	21.34	19.31	<0.00	0.02	0.87	0.01	0.01	0.81
Plasma Pi (mmol•L <sup>-1</sup> )	1.60	1.40	1.54	1.50	1.47	0.01	0.59	0.19	0.32	0.66	0.57

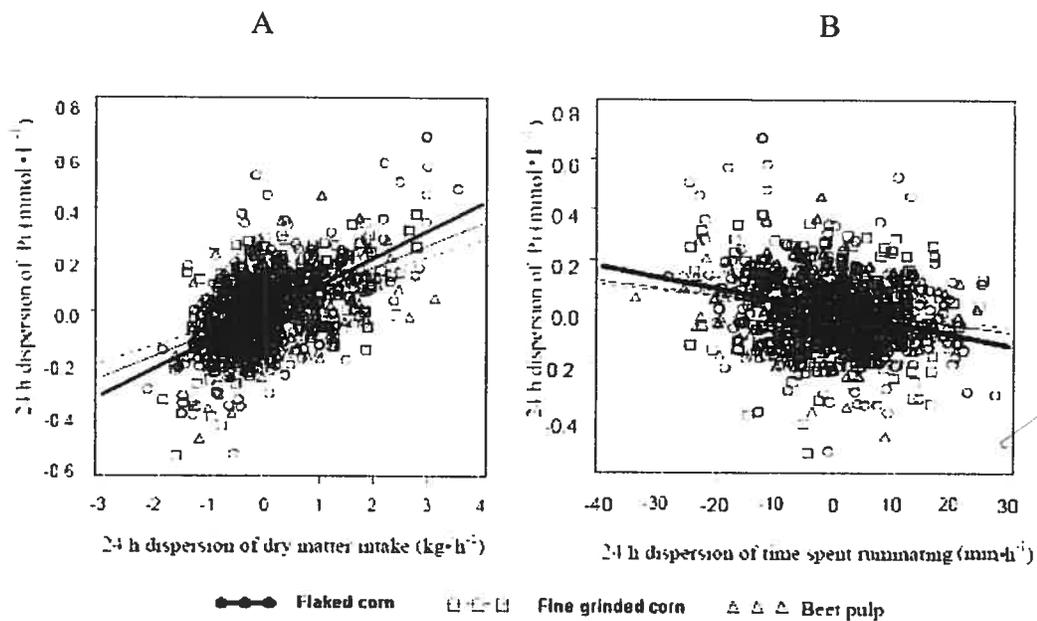
**Article 3, Figure 1:** Periodograms plot (estimate $\pm$ SE) of 24 h chronological series for DMI (A), time spent ruminating (B), or Pi (C). Values are percentage of series sum of squares (SS). Frequencies significantly ( $P < 0.05$ ) modified by SI or TC are marked respectively with a \* or a †



Article 3, Figure 2: Relationships between mean observed DMI and T-RUM (A) and individual noise-free time series (B)



Article 3, Figure 3 : Effect of intake (A) and rumination (B) on Pi values. Data are 24 h noise-free time-series representing ultradian dispersions



## Discussion générale

Les préoccupations actuelles reliées au phosphore inorganique plasmatique ou phosphatémie sont surtout orientées vers une meilleure connaissance des facteurs biologiques de variations en vue d'augmenter la précision de cet indicateur potentiel de l'état nutritionnel en phosphore chez les bovins laitiers (Valk, Sebek et al. 2002; Knowlton and Herbein 2002; Herdt 2000). Une évaluation rapide de l'utilisation digestive du phosphore des aliments deviendrait un élément important de régie alimentaire pour les producteurs laitiers (Lopez et al., 2004; Valk et al., 2002).

Cependant, pour obtenir une lecture fiable de la phosphatémie, il est d'abord nécessaire d'évaluer l'importance des variations liées à certains facteurs analytiques et à celles du moment de la prise d'échantillons. On effectue les analyses biochimiques normalement sur les sérums pour des raisons de coût et de sécurité (Weiser 2004), mais beaucoup de données de recherche utilisent les plasmas héparinés pour des raisons d'efficacité.

La valeur de la phosphatémie du sérum de  $1.85 \pm 0.32 \text{ mmole} \cdot \text{L}^{-1}$  est légèrement supérieure ( $P < .02$ ) à celle du plasma  $1.82 \pm 0.31 \text{ mmole} \cdot \text{L}^{-1}$  ( $n=28$  sérums). Ces observations sur la phosphatémie sérique et du plasma hépariné sont conforme aux résultats rapportés par d'autres chercheurs (Williams et al., 1991; Rogers et al., 1986; Lane et al., 1968; Littell et al., 1971; Lopez et al., 2004). Cette valeur plus élevée de la phosphatémie sérique par rapport à la plasmatique s'explique

par de l'hémolyse et l'augmentation de la perméabilité de la membrane des globules (Kaneko et al., 1997; Weiser, 2004). La teneur en phosphore inorganique des globules rouges est de 6 à 8 fois supérieure à celle du sérum. Il est donc très important de bien standardiser les procédures liées au délai entre le moment du prélèvement et de la centrifugation et des températures de conservation et de centrifugation des échantillons de sang (Weiser, 2004). Les laboratoires de biochimie clinique effectuent les analyses surtout sur des sérums mais dans des conditions expérimentales ou en clinique vétérinaire d'urgence les analyses biochimiques sont réalisées principalement sur des plasmas héparinés.

Les variations analytiques liées à la méthodologie du laboratoire expliquent moins de 3.5% de la variation totale de la phosphatémie qui est estimée à 17% vaches en lactation et hautes productrices. Les mécanismes spécifiques du contrôle du taux de phosphore inorganique dans le sang expliquent en partie un coefficient de variation modéré (< de 20%). La calcémie et la natrémie ont des coefficients de variation très faibles (< de 10%) comparativement celle de l'azotémie uréique qui peut se situer à de plus de 30% (Farver, 1997). Les autres variations analytiques sont contrôlées en utilisant systématiquement la même méthode d'analyse du phosphore et en appliquant un contrôle de qualité sur la procédure du laboratoire (Kaneko et al., 1997).

La phosphatémie sérique moyenne de  $1.85 \text{ mmole}\cdot\text{L}^{-1}$ , de ces 28 vaches, se peut se comparé aux valeurs limites de référence de banques de données. Elle se situe

à l'intérieur d'un étendu de 1.70 à 1.95 mmole•L<sup>-1</sup> (Hewett, 1974 ; Lee et al., 1978 ; Payne et al., 1987 ; Kaneko et al., 1997), elle est en dessous pour l'étendu de 1.96 à 2.10 mmole•L<sup>-1</sup> (Jones et al. 1982 ; Tremblay, 1996) et au dessus de l'étendu de 1.50 à 1.70 mmole•L<sup>-1</sup> pour les échantillons dont la provenance des jugulaires est spécifiée (Dubreuil et al., 1997 ; Parker and Blowey, 1974). Il est important de souligner que la phosphatémie, au moment du vèlage, est inférieure à 1.30 mmole•L<sup>-1</sup> (Larsen et al., 2001; Bigras-Poulin et al., 1998).

Les valeurs de plusieurs paramètres du profil métabolique plasmatiques coccygiens montrent des variations importantes par rapport à celles provenant d'échantillons prélevés par ponction de la jugulaire. La phosphatémie et la kaliémie diminuent de manière significative, soit de 19% et de 17% respectivement dans les échantillons de la jugulaire par rapport aux coccygiens (Montiel et al., 2001). Une diminution de l'ordre de 20% pour la phosphatémie a déjà été observée par Parker et Blowey, (1974); et Teleni et al. (1976). Selon des travaux plus récents (Whitaker, 2000), le phosphore inorganique et le potassium sont les deux seuls paramètres sanguins significativement plus faibles dans les échantillons de la jugulaire par rapport ceux des vaisseaux coccygiens. La composition du sang veineux dépend en grande partie des fonctions physiologiques des tissus qu'il draine. Ainsi le sang des veines jugulaires draine les glandes salivaires et ces dernières excrètent des quantité importante de Pi, de potassium (cations) par la salive (Valk et al., 2002 ; Mansfeld et al., 1996). Le travail métabolique des glandes salivaires entraîne une baisse de la phosphatémie et un état d'hémoconcentration du sang des veines jugulaires par

rapport aux vaisseaux coccygiens. Il est possible de confirmer l'hémoconcentration par l'augmentation des valeurs plasmatique de protéines totales et de l'albumine pour les échantillons de la jugulaire. La production de salive chez les bovins varie entre 2 et 227 L par jour et l'intensité de l'activité des glandes salivaires a un effet important sur la phosphatémie (Maekewa et al., 2002 ; Riad et al., 1987).

La valeur de la phosphatémie des échantillons du sang provenant des jugulaires est plutôt  $1.51 \pm 0.29 \text{ mmole} \cdot \text{L}^{-1}$ . Des valeurs de la phosphatémie coccygienne inférieures à  $1.70 \text{ mmole} \cdot \text{L}^{-1}$  peuvent être indicatrices d'un état d'hypophosphatémie selon le concept des valeur normale minimales et maximales. Il devient nécessaire de bien identifier le site de prélèvement des échantillons de sang (coccygien ou jugulaire) avant de déclarer un état d'hypophosphatémie, parce que chez les vaches hautes productrices, il se traduit par une réduction de la production laitière (Satter et al., 2000 ; Valk et al., 1999 ; Kida, 2003).

La valeur  $P_i$  plasmatique varie selon l'état physiologique des bovins laitiers, elle diminue de  $0.13 \text{ mmole} \cdot \text{L}^{-1}$  par année en fonction de l'âge (Hewett, 1974). Le taux de  $P_i$  dans le sérum varie de manière inversement proportionnelle à la production laitière (Forar et al., 1982). La phosphatémie est plus élevée en fin de lactation et en période de tarissement qu'en début de lactation (Shaffer et al., 1981). En période d'été, la phosphatémie des vaches est plus faible par qu'en hiver (Payne et al., 1964).

Nous avons réalisé d'autres études pour vérifier la présence de cycle biologique journalier de la phosphatémie chez des vaches en lactation et d'identifier l'origine de ces cycles. Plusieurs travaux de recherche soulignent des effets importants, chez les bovins laitiers, du moment du repas sur la phosphatémie (Forar et al., 1982; Hewett, 1974; Littell et al., 1971; Valk et al., 2002). Nos résultats, sur seulement 4 vaches, ne montrent pas d'effet du moment du prélèvement par rapport à la période de repas sur la phosphatémie. Nous avons démontré ultérieurement que l'utilisation d'un nombre plus grand de vaches et des prélèvements de sang, aux deux heures ou à toutes les heures au cours de la journée, sont nécessaires pour mettre en évidence de faibles variations de la phosphatémie (Montiel et al., 2001).

Une phosphatémie moyenne de  $1.54 \pm 0.29 \text{ mmole} \cdot \text{L}^{-1}$  est obtenue avec six vaches chez qui des prélèvements sont effectués à toutes les deux heures au cours d'une période de 48 heures et pour trois répétitions. Cette donnée se compare avec celle d'études précédentes (Montiel, et al. 2006; Borucki Castro, et al., 2004; Dubreuil et al., 1997) où des échantillons sont prélevés par ponction de la jugulaire mais diffère des valeurs de la phosphatémie obtenue à partir d'échantillons coccygiens (Hewett., 1974; Pelletier et al., 1985; Tremblay, 1996).

Les valeurs maximales ( $1.70 \pm 0.29 \text{ mmole} \cdot \text{L}^{-1}$ ) et minimales ( $1.30 \pm 0.25 \text{ mmole} \cdot \text{L}^{-1}$ ) de la phosphatémie s'observent respectivement vers 18:00 heures (au moment du repas du soir) et vers 2:00h (au milieu de la nuit). La phosphatémie semble obéir à des variations cycliques, et ces résultats sont différents de ceux déjà rapportés (Manston et al., 1981).

La variation de la phosphatémie entre le jour et la nuit est de  $0.6 \text{ mmole} \cdot \text{L}^{-1}$ . Les effets des facteurs synchronisateurs comme la fréquence des repas ou de la traite (Deswysen et al., 1989) sont beaucoup moins importants. On distingue une première augmentation vers 14h puis vers 22h, soit quatre heures après la distribution d'aliment dans les deux cas. Les valeurs les plus proches de la phosphatémie moyenne se trouvent au moment du repas du matin. Un prélèvement quatre heures après un repas surévalue la phosphatémie moyenne d'environ  $0.20 \text{ mmole} \cdot \text{L}^{-1}$ . Cette valeur est semblable à celle trouvée par Forar et al., (1982).

Les données montrent que même en regroupant les échantillons et en les prélevant toujours au même moment par rapport aux cycles exogènes, la variation ultradienne de la phosphatémie est de  $\pm 0.15 \text{ mmole} \cdot \text{L}^{-1}$ . En conséquence, il sera toujours nécessaire de tenir compte de cette imprécision lors de l'établissement des valeurs de limites de référence.

On constate que les variations ultradiennes diminuent rapidement avec le nombre de vaches par groupe. À partir de quatre vaches, ces variations ne représentent que 26% de la variation standardisée de la série de phosphatémies. Peu de travaux ont étudié l'importance du nombre d'échantillons à prélever dans un groupe pour réduire au minimum les effets des variations ultradiennes sur les valeurs de référence des paramètres sanguins et la phosphatémie en particulier des bovins laitiers (Lumsden, 1998 ; Piccione et al., 2002 ; Whitaker, 2000).

Le périodogramme d'un groupe de quatre vaches indique la présence d'un cycle circadien important, c'est-à-dire une fréquence de deux cycles dans une série de 48h. La variation de 72 %, expliquée par des cycles exogènes, est la somme des variations de cycles de 8 à 24h. Une étude, faite avec des ruminants privés de nourriture, a démontré la persistance d'un cycle nyctéméral en l'absence d'influences exogènes. Dans cette étude, les valeurs de la phosphatémie sont plus élevées le jour que la nuit et ce malgré la privation de nourriture (Valtorta et al., 2000). Il semblerait donc que le cycle nyctéméral soit bien endogène, donc exempt des influences de la traite et de l'alimentation.

Pour certains paramètres biochimiques sanguins comme le calcium ionisé, le sodium, le potassium, les chlorures et le pH, les variations circadiennes sont faibles (Csaba et al., 1999). Les variations journalières du Pi et de plusieurs autres métabolites sanguins doivent être tenues en compte pour établir les valeurs de référence et pour réduire les sources potentielles d'erreur lors de l'interprétation (Coggins et Field, 1976; Lumsden, 1998 ; Manston et al., 1981; Whitaker, 2000).

Une des approches, visant la réduction de l'excrétion du phosphore, est l'utilisation de rations pour les bovins laitiers avec une forte teneur en concentré. Ces rations ont permis une réduction de 30% de l'ingestion de matière sèche en même temps qu'une augmentation de 15% de la digestibilité du phosphore (Driedger et al., 1999 ; Guyton et al., 2000).

On observe un temps de rumination moyen de  $18.8 \pm 0.5$  minutes par heure et de l'ingestion de  $0.94 \pm 0.04$  kg matière sèche par heure pour un groupe de 6 vaches soumis à trois rations différentes par la source d'hydrate de carbone (Yang et al., 2001). Lorsque les vaches reçoivent une infusion de 3 kg de sucrose, la consommation de matière sèche est réduite significativement de  $3.34 \pm 0.52$  kg ( $P < 0.01$ ) de même que le temps de rumination et ce indépendamment du type d'hydrates de carbone. La réduction s'observe avec différentes formes d'hydrates de carbone: amidon (Knowlton, 1998) d'une part chez la vache laitière et avec du sirop de glucose (Rooke, 1987) d'autre part chez le bovin, et le sucrose en raison de la facilité à préparer une solution homogène.

La production laitière journalière et le taux de protéines du lait sont maintenus chez les vaches recevant l'énergie apporté par l'infusion ruminale de sucrose comme les observations de Kim et al. (1999). On observe au contraire une réduction significative de la phosphatémie. L'infusion intra-ruminale de sucrose provoque une réduction de consommation de matière sèche (CMS) tout en reproduisant l'apport

énergétique d'une fermentation horaire de fibre. Les vaches sont soumises à une restriction de tous les nutriments sauf de l'énergie. Le type d'hydrates de carbone n'a pas d'effet significatif sur la phosphatémie et ce même avec une réduction significative de l'ingestion de matière sèche pour la ration avec la pulpe de betterave. Ce résultat s'explique par la réduction de la demande de la production laitière. Il existe une relation directe entre la teneur en phosphore du lait et le pourcentage de biodisponibilité du phosphore de la ration chez les vaches (Valk et al., 2002).

L'augmentation du temps de rumination par kg de matière sèche (24 minutes) pour la ration avec la pulpe de betteraves par rapport au ration avec du maïs (22 minutes) s'explique par une concentration plus grande de fibre (Yang et al., 2001).

Il semble que les variations quotidiennes de la phosphatémie chez les vaches en lactation sont des conséquences aux effets des traitements plus tôt qu'un effet direct sur le métabolisme du phosphore (Forar et al., 1982). La phosphatémie peut augmenter ou diminuer selon l'heure du repas selon la quantité d'aliments ingérée, le temps de rumination et la biodisponibilité du phosphore (Thomas, 1974). Dans une expérience, Girard et al. (2002) met en évidence que 31% des vaches présentent un bilan négatif en phosphore malgré le fait que les concentrations en P alimentaire ont été augmentées considérablement (140 et 160% des besoins calculés). Il apparaît donc que la présence de bilans négatifs dans un troupeau est indépendante de la concentration en P de la ration et de la phosphatémie.

Nous avons vérifié les effets des rations, avec trois formes d'hydrates de carbone, à l'aide de l'analyse spectrale des cycles biologiques (Deswysen et al., 1993). Les données des analyses de variance des cycles biologiques (1 à 12) pour la consommation de matière sèche, le temps de rumination et la phosphatémie ont permis d'obtenir la significations des variations liées aux trois traitements alimentaires et à l'infusion ruminale de sucre. Cette dernière modifie significativement le cycle circadien de la phosphatémie (fréquence 1) et celui de la consommation de matière sèche (fréquence 2) et l'amplitude de ces cycles a un intérêt biologique (Priestley et al., 1981). L'infusion de sucre et les hydrates de carbone des rations ne modifient pas les variations ultradiennes du temps de rumination. Deswysen a observé que les composants des cycles 1, 3 et 4 contribuent d'une manière importante à expliquer la dispersion totale sur une période de 24 heures des séries de la prise alimentaire et du temps de rumination (Dewysen et al., 1990). Dans les trois heures après le repas du matin les vaches ingèrent  $1.7 \pm 0.1$  kg de M.S. par heure et vont ruminer pendant 9.1 minutes par heure.

L'étude de la relation entre les séries de la consommation de M.S. et de la phosphatémie montre une tendance des effets des types d'hydrates de carbone de la ration. La phosphatémie augmente de  $0.101 \pm 0.007$ ,  $0.088 \pm 0.008$  et  $0.068 \pm 0.009$  mmole $\cdot$ L<sup>-1</sup> pour chaque kg de ration avec respectivement du maïs cassé, du maïs moulu et de pulpe de betteraves. L'augmentation de l'efficacité de la digestibilité de l'amidon est responsable de changements dans l'environnement ruminal. Ainsi l'incorporation d'hydrates de carbone facilement fermentescible provoque une diminution du pH ruminal (Yang et al. 2001). La relation entre le temps de

rumination et la phosphatémie est caractérisée par une réduction  $0.032 \pm 0.005$  mmole $\cdot$ L<sup>-1</sup> de la phosphatémie pour chaque 10 minutes de rumination et ce indépendamment des hydrates de carbone de la ration.

Les séries chronologiques ont été utilisées pour obtenir un périodogramme dans le temps (Sokolove et Bushell, 1978). Le périodogramme nous a permis étudier les rythmes biologiques reliés à la consommation d'aliments, au temps de rumination et à la phosphatémie. Ces périodogramme donnent des mesures de l'intensité des rythmes dans une série chronologique pour une période de temps donnée. Le pic du périodogramme indiquent la dominance relative pour des périodes de 24 et 48 heures (Van Dongen et al., 1999).

## Conclusions

Au début de cette étude, il existait une grande controverse sur l'utilisation de la phosphatémie chez les bovins laitiers comme indicateur de l'état nutritionnel en phosphore. Nos travaux visaient à mieux connaître les facteurs analytiques, biologiques et alimentaires à l'origine des variations de la phosphatémie chez les vaches laitières et d'établir les modalités de l'interprétation à donner aux valeurs de la phosphatémie déterminées entre 9 et 12 AM. **Nous avons démontré** qu'il est possible d'utiliser les données de la phosphatémie provenant indifféremment d'échantillons de plasma hépariné ou de sérum. La valeur de la phosphatémie sérique provenant des vaisseaux coccygiens est de  $1.85 \pm 0.35 \text{ mmole} \cdot \text{L}^{-1}$  chez 28 vaches laitières hautes productrices. Cette valeur chute significativement de 19% si les échantillons sont prélevés dans la jugulaire. Il est nécessaire d'identifier le site du prélèvement, pour éviter l'interprétation erronée de la phosphatémie chez les bovins.

La valeur moyenne de la phosphatémie est de  $1.54 \pm 0.29 \text{ mmole} \cdot \text{L}^{-1}$  pour la jugulaire et elle est plus élevée le jour que la nuit. En regroupant les échantillons provenant de quatre vaches et en les prélevant toujours au même moment une variation de  $0.6 \text{ mmole} \cdot \text{L}^{-1}$  de la phosphatémie est associée aux cycles exogènes. Il semble donc impossible de réduire la variation ultradienne de la phosphatémie chez les bovins laitiers en dessous de  $\pm 0.15 \text{ mmole} \cdot \text{L}^{-1}$ . Les effets des facteurs synchronisateurs comme la fréquence des repas ou de la traite sont beaucoup moins

importants. On distingue une première augmentation vers 14h puis vers 22h, soit quatre heures après la distribution d'aliment. Un prélèvement quatre heures après un repas surévalue la phosphatémie moyenne d'environ  $0.20 \text{ mmole}\cdot\text{L}^{-1}$ .

Les variations de la phosphatémie au cours des périodes de 48 ou de 24 heures montrent la présence d'un cycle circadien et de variations ultradiennes de moins de 8 heures. À partir de quatre vaches, ces variations ne représentent que 26% de la variation standardisée de la série de phosphatémies. L'établissement de valeurs de référence de la phosphatémie implique l'identification de l'origine des échantillons et aussi le moment des prélèvements après le repas, car un échantillonnage fait entre deux et quatre heures après l'heure de repas surévalue la phosphatémie et rend difficile une interprétation valable des résultats.

L'infusion ruminale de sucre modifie significativement le cycle circadien de la phosphatémie et celui de la consommation de matière sèche. Nous démontrons que l'infusion ruminale de sucrose provoque des réductions significatives de l'ingestion, du temps de rumination et de la phosphatémie mais sans affecté la production de lait et de protéines du lait. La phosphatémie augmente de  $0.101 \pm 0.007$ ,  $0.088 \pm 0.008$  et  $0.068 \pm 0.009 \text{ mmole}\cdot\text{L}^{-1}$  pour chaque kg de ration avec respectivement du maïs cassé, du maïs moulu et de pulpe de betteraves. On observe une réduction  $0.032 \pm .005$  de la phosphatémie pour chaque 10 minutes de rumination et ce indépendamment des types d'hydrates de carbone de la ration.

Nous devons trouver des réponses à encore plusieurs questions avant l'utilisation de la valeur de la phosphatémie des bovins laitiers, comme indicateur biologique de l'état nutritionnel en phosphore et de la biodisponibilité du phosphore alimentaire. Pour répondre à l'une de ces questions un autre protocole expérimental devrait être axé sur la relation entre la phosphatémie et le bilan alimentaire du phosphore des bovins laitiers alimentés avec des rations contenant différentes concentrations en phosphore.

## Bibliographie

Abdelrahman, M.M., R.L. Kincaid, and E.A. Elzubeir. 1998. Mineral deficiencies in grazing dairy cattle in Kordofan and Darfur Regions in Western Sudan. *Trop Anim Health Prod.* 30:123-135.

AFRC. 1991. A reappraisal of the calcium and phosphorus requirements of sheep and cattle. *Nutr Abstr and Rev (Series B)*. Vol. 61. T.C.R. Nutrients, editor. Agricultural and Food Research Council. 573-612.

Agricultural Research Council, A. 1980. *The Nutrient Requirements of Ruminant Livestock*. C.A. Bureaux, editor. Agricultural Research Council, Slough, England.

Ammerman, C.B., D.H. Baker, and J.L. Austin. 1995. *Bioavailability of nutrients for animals : amino acids, minerals, and vitamins*. Academic Press, San Diego, California. 441 pp.

Ammerman, C.B., R.M. Forbes, U.S. Garrigus, A.L. Neumann, H.W. Norton, and E.E. Hatfield. 1957. Ruminant utilization of inorganic phosphates. *J Anim Sci.* 16:796-810.

Angel, R., N.M. Tamim, T.J. Applegate, A.S. Dhandu, and L.E. Ellestad. 2002. Phytic acid chemistry : Influence on phytin-phosphorus availability and phytase efficacy. *J Appl Poult Res.* 11:471-480.

Arieli, A., S. Abramson, S.J. Mabjeesh, S. Zamwel, and I. Bruckental. 2001. Effect of site and source of energy supplementation on milk yield in dairy cows. *J Dairy Sci.* 84:462-470.

Bajcsy, C.A., J. Reiczigel, and O. Szenci. 1999. Circadian changes in blood ionized calcium, sodium, potassium, and chloride concentrations and pH in cattle. *Am J Vet Res.* 60:945-958.

Barlet, J.P., M.J. Davicco, and V. Coxam. 1995. Physiologie de l'absorption intestinale du phosphore chez l'animal. *Reprod Nutr Dev.* 35:475-489.

Bauer, M.L., D.L. Harmon, K.R. McLeod, and G.B. Huntington. 1995. Adaptation to small intestinal starch assimilation and glucose transport in ruminants. *J Anim Sci.* 73:1828-1838.

Bell, N.H. 1985. Vitamin D-endocrine system. *J Clin Invest.* 76:1-6.

Bergendahl, M., M.L. Vance, A. Iranmanesh, M.O. Thorner, and J.D. Veldhuis. 1996. Fasting as a metabolic stress paradigm selectively amplifies cortisol secretory burst mass and delays the time of maximal nyctohemeral cortisol concentrations in healthy men. *J Clin Endocrinol Metab.* 81:452-459.

Bigras-Poulin, M., and A. Tremblay. 1998. An epidemiological study of calcium metabolism in non-paretic postparturient Holstein cows. *Prev Vet Med.* 35:195-207.

Borucki Castro, S.I., L.E. Phillip, V. Girard, and A. Tremblay. 2004. Altering dietary cation-anion difference in lactating dairy cows to reduce phosphorus excretion to the environment. *J Dairy Sci.* 87:1751-1757.

Braithwaite, G.D. 1983. Calcium and phosphorus requirements of the ewe during pregnancy and lactation. 2. Phosphorus. *Br J Nutr.* 50:723-736.

Braithwaite, G.D. 1984. Some observations on phosphorus homeostasis and requirements of sheep. *J Agric Sci Camb.* 102:295-306.

Bravo, D., F. Meschy, C. Bogaert, and D. Sauvant. 2000. Ruminal phosphorus availability from several feedstuffs measured by the nylon bag technique. *Reprod Nutr Dev.* 40:149-162.

Breves, G., and B. Schorder. 1991. Comparative aspects of gastrointestinal phosphorus metabolism. *Nutr Res Reviews.* 4:125-140.

Bryant, M.P., I.M. Robinson, and H. Chu. 1959. Observations on the nutrition of bacteroides succinogenes- a ruminal cellulolytic bacterium. *J Dairy Sci.* 42:1831-1847.

Call, J.W., J.E. Butcher, J.L. Shupe, R.C. Lamb, R.L. Boman, and A.E. Olson. 1987. Clinical effects of low dietary phosphorus concentrations in feed given to lactating dairy cows. *Am J Vet Res.* 48:133-136.

Callison, S.L., J.L. Firkins, M.L. Eastridge, and B.L. Hull. 2001. Site of nutrient digestion by dairy cows fed corn of different particle sizes or steam-rolled. *J Dairy Sci.* 84:1458-1467.

Care, A.D. 1994. The absorption of phosphate from the digestive tract of ruminant animals. *Br Vet J.* 150:197-205.

Care, A.D., J.P. Barlet, and H.M. Abdel-Hafeez. 1980. Calcium and phosphate homeostasis in ruminants and its relationship to the aetiology and prevention of parturient paresis. In *Digestive Physiology and Metabolism in Ruminants*. Y. Ruckebusch and P. Thivend, editors. MTP Press, Lancaster, England. p, 429-446.

Challa, J., and G.D. Braithwaite. 1988. Phosphorus and calcium metabolism in growing calves with special emphasis on phosphorus homeostasis : 2. Studies of the effect of different levels of phosphorus, infused abomasally, on phosphorus metabolism. *J Ag Sci Camb.* 110:583-589.

Challa, J., and G.D. Braithwaite. 1988. Phosphorus and calcium metabolism in

growing calves with special emphasis on phosphorus homeostasis :1. Studies of the effect of changes in the dietary phosphorus intake on phosphorus and calcium metabolism. *J Ag Sci Camb.* 110:573-581.

Challa, J., G.D. Braithwaite, and M.S. Dhanoa. 1989. Phosphorus homeostasis in growing calves. *J Ag Sci Camb.* 112:217-226.

Chambers, T.J., and A. Moore. 1983. The sensitivity of isolated osteoclasts to morphological transformation by calcitonin. *J Clin Endocrinol Metab.* 57:819-824.

Cheryan, M. 1980. Phytic acid interactions in food systems. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 13:297-335.

Clark, R. 1953. A study of the water-soluble phosphate concentration of ruminal contents in normal and phosphorus deficient animals. *Onderstepoort J Vet Res.* 26:137.

Clark, R.C., O.E. Budtz-Olsen, R.B. Cross, P. Finnamore, and P.A. Bauert. 1973. The importance of the salivary glands in the maintenance of phosphorus homeostasis in the sheep. *Austr J Ag Res.* 24:913-919.

Coggins, C.R.E., and A.C. Field. 1976. Diurnal variations in the chemical composition of plasma from lactating beef cows on three dietary energy intakes. *J Ag Sci Camb.* 86:595-602.

Cohen, R.D.H. 1973a. Phosphorus nutrition of beef cattle : 2. Relation of pasture phosphorus to phosphorus content of blood, hair and bone of grazing steers. *Aust J Exp Agric Anim Husb.* 13:5-8.

Cohen, R.D.H. 1973b. Phosphorus nutrition of beef cattle: 3. Effect of supplementation on the phosphorus content of blood and on the phosphorus and calcium contents of hair and bone of grazing steers. *Aust J Exp Agric Anim Husb.* 13:625-629.

Cohen, R.D.H. 1974. Phosphorus nutrition of beef cattle : 4. The use of fecal and blood phosphorus for the estimation of phosphorus intake. *Aust J Exp Agric Anim Husb.* 14:709-715.

Committee on Mineral Nutrition. 1973. *Tracing and treating mineral disorders in dairy cattle.* Cente for Agric. Publ. and Documentation, editor, The Hague, Wageningen, The Netherlands. p. 19-23.

CPAQ. 1998. *Estimation des rejets d'azote et de phosphore par les animaux d'elevage.* C. Comite ad hoc sur l'agroenvironnement editor. Ministere de l'Agriculture, des Pecheries et de l'Alimentation, Quebec.

Deswysen, A.G., P.A. Dutilleul, and W.C. Ellis. 1989. Quantitative analysis of

nycterohemeral eating and ruminating patterns in heifers with different voluntary intakes and effects of monensin. *J Anim Sci.* 67:2751-2761.

Driedger, L.J., and S.C. Loerch. 1999. Limit-feeding corn as an alternative to hay reduces manure and nutrient output by Holstein cows. *J Anim Sci.* 77:967-972.

Dubreuil, P., and H. Lapierre. 1997. Biochemistry reference values for Quebec lactating dairy cows, nursing sows, growing pigs and calves. *Can J Vet Res.* 61:235-239.

Durand, M., and S. Komisarczuk. 1988. Influence of major minerals on rumen microbiota. *J Nutr.* 118:249-260.

Eicher, R., E. Bouchard, and A. Tremblay. 1999. Cow level sampling factors affecting analysis and interpretation of milk urea concentrations in 2 dairy herds. *Can Vet J.* 40:487-492.

Eicher, R., E. Fuschini, M. Wanner, and P. Rusch. 1998. Multifactorial effect of intrinsic animal factors, season and herd effect on the parameter of metabolic profile in dairy cows: energy and protein metabolism. *Dtsch Tierarztl Wochenschr.* 105:261-265.

Field, A.C., J. Kamphues, and J.A. Woolliams. 1983. The effect of dietary intake of calcium and phosphorus on the absorption and excretion of phosphorus in chimaera-derived sheep. *J Ag Sci Camb.* 101:597-602.

Forar, F.L., R.L. Kincaid, R.L. Preston, and J.K. Hillers. 1982. Variation of inorganic phosphorus in blood plasma and milk of lactating cows. *J Dairy Sci.* 65:760-763.

Forbes, R.S., and J.J.W. Erdeman. 1983. Bioavailability of trace mineral elements. *Annu Rev Nutr.* 3:213.

Fraser, D.T., G. Jones, S.W. Kooh, and I.C. Radde. 1987. Calcium and phosphate metabolism. In *Fundamentals of Clinical Chemistry*. N.W. Tietz, editor. Saunders, Philadelphia, Pennsylvania. p. 705-728.

Gartner, R.J., G.M. Murphy, and W.A. Hoey. 1982. Effects of induced, subclinical phosphorus deficiency on feed intake and growth of beef heifers. *J Ag Sci Camb.* 98:23-29.

Georgievski, V.I. 1982. The physiological role of macroelements. *Mineral nutrition of animals*. V.I. Georgievskki, editor. Butterworths, London. p. 91-171.

Giduck, S.A., and J.P. Fontenot. 1987. Utilization of magnesium and other macrominerals in sheep supplemented with different readily-fermentable carbohydrates. *J Anim Sci.* 65:1667-1673.

- Girard, V., and A. Tremblay. 2002. Problématique de l'application des normes alimentaires minimales pour réduire les rejets de phosphore du troupeau laitier. *Agrosol*. 13:81-85.
- Glenn, B.P., T.E. Dawson, A.M. Lefcourt, and F. Wilkerson. 1998. Effect of level of high moisture corn in alfalfa based rations on starch digestion by mid lactation cows. *J Anim Sci*. 76:336.
- Goff, J. 1998. Phosphorus deficiency. In *Current Veterinary Therapy 4: Food Animal Practice*. W.B. Saunders, editor, Philadelphia. p. 218.
- Goff, J.P. 2000. Pathophysiology of calcium and phosphorous disorders. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*. 16:319-337.
- Grace, N.D., M.J. Ulyatt, and J.C. McRae. 1974. Quantitative digestion of fresh herbage by sheep. 3. Movement of Mg, Ca, P, K, and Na in digestive tract. *J Agric Sci Camb*. 82:321.
- Guyton, A.D., K.F. Knowlton, D.P. Casper, and B.P. Glenn. 2000. Starch source affects phosphorus digestion and excretion by lactating dairy cows. *J Anim Sci*. 78:288.
- Haus, E., G. Cornelissen, and F. Halberg. 1980. *Introduction to chronobiology. In Chronobiology: principles and applications to shifts in schedules*. L.E.a.H. Sheving, F., editor. Sijthoff and Noorhoff International Publishers, The Netherlands.
- Herd, T.H. 2000. Variability characteristics and test selection in herd-level nutritional and metabolic profile testing. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*. 16:387-403.
- Hewett, C. 1974. On the causes and effects of variations in the blood profile of Swedish dairy cattle. *Acta Vet Scand Suppl*:1-152.
- Huntington, G.B. 1997. Starch utilization by ruminants: from basics to the bunk. *J Anim Sci*. 75:852-867.
- Hyman, J.W. 1990. *The light book: how natural and artificial light affect our health, mood, and behavior*. Tarcher Inc, Los Angeles.
- Jones, G.M., E.E. Wildman, H.F. Troutt, Jr., T.N. Lesch, P.E. Wagner, R.L. Boman, and N.M. Lanning. 1982. Metabolic profiles in Virginia dairy herds of different milk yields. *J Dairy Sci*. 65:683-688.
- Journet, M., G. Huntington, and J.L. Peyraud. 1995. Le bilan des produits terminaux de la digestion. In *Nutrition des Ruminants Domestiques Ingestion et Digestion*. R. Jarrige, editor. INRA, Paris. p. 671-720.

Joy, M.T., E.J. DePeters, J.G. Fadel, and R.A. Zinn. 1997. Effects of corn processing on the site and extent of digestion in lactating cows. *J Dairy Sci.* 80:2087-2097.

Kaneko, J.J., J.W. Harvey, and M.L. Bruss. 1997. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. Academic Press, San Diego, CA. 932 pp.

Karn, J.F. 1997. Phosphorus supplementation of range cows in the northern great plains. *J Range Manag.* 50:2-9.

Karn, J.F. 2001. Phosphorus nutrition of grazing cattle: a review. *Anim Feed Sci Techn.* 89:133-153.

Katzenberg, G. D, T. Young, L. Finn, L.Lin, D.P. King.1998. A clock polymorphism associated with human diurnal preference. *Sleep.* 21 : 569-576.

Kelly, J.M. 1997. The use of metabolic profiles in dairy cows. *Irish Vet J.* 50(8):494-496.

Khorasani, G.R., R.A. Janzen, W.B. McGill, and J.J. Kennelly. 1997. Site and extent of mineral absorption in lactating cows fed whole-crop cereal grain silage of alfalfa silage. *J Anim Sci.* 75:239-248.

Kida, K. 2003. Relationships of metabolic profiles to milk production and feeding in dairy cows. *J Vet Med Sci.* 65:671-677.

Kim, K.H., J.J. Choung, and D.G. Chamberlain. 1999. Effects of varying the degree of synchrony of energy and nitrogen release in the rumen on the synthesis of microbial protein in lactating dairy cows consuming a diet of grass silage and a cereal-based concentrate. *J. Sci. Food Agric.* 79:1441-1447.

Kleiber, M., A.H. Smith, N.P. Ralston, and A.L. Black. 1951. Radiophosphorus (P32) as tracer for measuring endogenous phosphorus in cow's feces. *J Nutr.* 45:253-263.

Knowlton, K.F., T.E. Dawson, B.P. Glenn, G.B. Huntington, and R.A. Erdman. 1998. Glucose metabolism and milk yield of cows infused abomasally or ruminally with starch. *J Dairy Sci.* 81:3248-3258.

Knowlton, K.F., and J.H. Herbein. 2002. Phosphorus partitioning during early lactation in dairy cows fed diets varying in phosphorus content. *J Dairy Sci.* 85:1227-1236.

Komisarcsuk-Bony, S., and M. Durand. 1991. Effects of minerals on microbial metabolism. In *Rumen microbial metabolism and rumen digestion*. J.P. Jouany, editor. INRA, Paris.

Kornegay, E.T. 2001. Digestion of phosphorus and other Nutrients: the Role of Phytases and Factors Influencing Their Activity. In *Enzymes in Farm Animal*

*Nutrition*. M.R. Bedford and G.G. Partridge, editors. CABI Publishing, Wallingford, UK. p.406.

Lane, A.G., J.R. Campbell, and G.F. Krause. 1968. Blood mineral composition in ruminants. *J Anim Sci*. 27:766-770.

Larsen, T., G. Moller, and R. Belliot. 2001. Evaluation of Clinical and Clinical Chemical Parametrers in Peripartum Cows. *J Dairy Sci*. 84:1749-1758.

Lee, A.J., A.R. Twardock, R.H. Bubar, J.E. Hall, and C.L. Davis. 1978. Blood metabolic profiles: their use and relation to nutritional status of dairy cows. *J Dairy Sci*. 61:1652-1670.

Leeson, S., and J.D. Summers. 1997. *Commercial poultry nutrition*. University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada. 283 pp.

Lemosquet, S., N. Rideau, H. Rulquin, P. Faverdin, J. Simon, and R. Verite. 1997. Effects of a duodenal glucose infusion on the relationship between plasma concentrations of glucose and insulin in dairy cows. *J Dairy Sci*. 80:2854-2865.

Littell, D.A., P.J. Robinson, M.J. Playne, and K.P. Haydock. 1971. Factors affecting blood inorganic phosphorus determinations in cattle. *Aust Vet J*. 47:153-156.

Lofgreen, G.P., and M. Kleiber. 1953. The availability of the phosphorus in alfalfa hay. *J Anim Sci*. 12(2):366-371.

Lofgreen, G.P., and M. Kleiber. 1954. Further studies on the availability of phosphorus in alfalfa hay. *J Anim Sci*. 13(1):258-264.

Lomba, F., R. Paquay, V. Bienfet, and A. Lousse. 1969. Statistical Research on the fate of dietary mineral elements in dry and lactating cows. *J Ag Sci Camb*. 73:453-458.

Lopez, H., F.D. Kanitz, V.R. Moreira, M.C. Wiltbank, and L.D. Satter. 2004. Effect of dietary phosphorus on performance of lactating dairy cows: milk production and cow health. *J Dairy Sci*. 87:139-145.

Lotscher, M., P. Wilson, S. Nguyen, B. Kaissling, J. Biber, H. Murer, and M. Levi. 1996. New aspects of adaptation of rat renal Na-Pi cotransporter to alterations in dietary phosphate. *Kidney Int*. 49:1012-1018.

Lucas, H.L. 1964. *Stochastic Models in Medicine and Biology*. Univ. Wisconsin Press. 355 pp.

Lumsden, J.H. 1998. "Normal or Reference Values: Questions and Comments. *Vet Clin Path*. 27:102-106.

- Maekewa, M., K.A. Beauchemin, and D.A. Christensen. 2002. Chewing Activity, Saliva Production, and Ruminant pH of Primiparous and Multiparous Lactating Dairy Cows. *J Dairy Sci.* 85:1176-1182.
- Maenz, D.D., C.M. Endle-Schaan, R.W. Newkirk, and H.L. Classen. 1999. The effect of minerals and mineral chelators on the formation of phytase-resistant and phytase susceptible forms of phytic acid in solution and in a slurry of canola meal. *Feed Sci Techn.* 81:177-192.
- Manas-Almendros, M., R. Ross, and A.D. Care. 1982. Factors Affecting the Secretion of Phosphate in Parotid Saliva in the Sheep and Goat. *Q J Exp Physiol.* 67:269-280.
- Mansfeld, R., W. Gruneberg, E. Thiemann, and E. Grunert. 1996. Statistical analysis of metabolic profiles of blood and saliva samples used as a tool for herd diagnostic procedures. *Zuchtingkunde.* 68:325-345.
- Manston, R., G.J. Rowlands, W. Little, and K.A. Collis. 1981. Variability of the blood composition of dairy cows in relation to time of day. *J Ag Sci Camb.* 96:593-598.
- Martz, F.A., A.T. Belo, M.F. Weiss, R.L. Belyea, and J.P. Goff. 1990. True absorption of calcium and phosphorus from alfalfa and corn silage when fed to lactating cows. *J Dairy Sci.* 73:1288-1295.
- Matsui, T., N. Kuramitsu, H. Yano, and R. Kawashima. 1983. Suppressive effect of calcitonin on intestinal absorption of calcium and phosphorus in sheep. *Endocrinol Jpn.* 30:485-490.
- McAdam, P.A., and G.D. O'Dell. 1982. Mineral profile of blood plasma of lactating dairy cows. *J Dairy Sci.* 65:1219-1226.
- McAllister, T.A., R.C. Phillippe, L.M. Rode, and K.J. Cheng. 1993. Effect of the protein matrix on the digestion of cereal grains by ruminal microorganisms. *J Anim Sci.* 71:205-212.
- McDowell, L.R. 1992. *Minerals in animal and human nutrition.* Academic Press, San Diego, California. 524 pp.
- McDowell, L.R. 1996. Feeding minerals to cattle on pasture. *Anim Feed Sci Techn.* 60:247-271.
- McLean, R.W., and J.H. Ternouth. 1994. The growth and phosphorus kinetics of steers grazing a subtropical pasture. *Aust J Agric Res.* 45:1831-1845.
- Monke, D.R., G.J. Kociba, M. DeJarnette, D.E. Anderson, and W.H. Ayars, Jr. 1998. Reference values for selected hematologic and biochemical variables in Holstein

bulls of various ages. *Am J Vet Res.* 59:1386-1391.

Montiel, L.A.R., et A. Tremblay. 2001. Étude des variations du phosphore inorganique (Pi) sérique chez la vaches laitière. Compte-rendu du 69e Congrès de l'ACFAS, Sherbrooke.

Montiel Ramos, L.A., V. Girard, Y. Chorfi and A. Tremblay. 2006. Effect of anticoagulant, venipuncture site and time-related feeding on blood inorganic phosphorus in dairy cows. *J Clin Path.* Soumis.

Morse, D. 1996. Impact of environmental regulations on cattle production. *J Anim Sci.* 74:3103-3111.

Morse, D., H.H. Head, C.J. Wilcox, H.H. van Horn, C.D. Hissem, and B. Harris, Jr. 1992. Effects of concentration of dietary phosphorus on amount and route of excretion. *J Dairy Sci.* 75:3039-3049.

Morse, D., R.A. Nordstedt, H.H. Head, and H.H. Vanhorn. 1994. Production and characteristics of manure from lactating dairy cows in florida. *Transactions of the ASAE.* 37:275-279.

Mylrea, P.J., and R.F. Bayfield. 1968. Concentrations of some components in the blood and serum of apparently healthy dairy cattle. 1. Electrolytes and minerals. *Aust Vet J.* 44:565-569.

National Research Council, N. 1989. *Nutrient Requirements of Dairy Cattle.* Natl. Acad. Sci., Washington, DC. 158 pp.

National Research Council, N. 2001. *Nutrient Requirements of Dairy Cattle.* Natl. Acad. Sci., Washington, DC. 382 pp.

Noller, C.H., A.G. Castro, W.E. Wheeler, D.L. Hill, and N.J. Moeller. 1977. Effect of phosphorus supplementation on growth rate, blood minerals, and conception rate of dairy heifers. *J Dairy Sci.* 60:1932-1940.

Otto, F., F. Vilela, M. Harun, G. Taylor, P. Baggasse, and E. Bogin. 2000. Biochemical Blood Profil of Angoni Cattle in Mozambique. *Israel Vet Med Ass.* 55.

Parker, B.J., and R.W. Blowey. 1974. A comparison of blood from the jugular vein and coccygeal artery and vein of cows. *Vet Rec.* 95:14-18.

Parra, O., A. Ojeda, J. Combellas, L. Gabaldon, A. Escobar, N. Martinez, and M. Benezra. 1999. Blood metabolites and their relationship with production variables in dual-purpose cows in Venezuela. *Prev Vet Med.* 38:133-145.

Payne, J.M., S.M. Dew, R. Manston, and M. Faulks. 1970. The use of a metabolic profile test in dairy herds. *Vet Rec.* 87:150-158.

Payne, J.M., and S. Payne. 1987. *The Metabolic Profile Test*. Oxford University Press, Oxford. 179 pp.

Payne, J.M.a.F.B.L. 1964. Factors Affecting Plasma Calcium and Inorganic Phosphorus Concentrations in the Cow with Particular Reference to Pregnancy, Lactation and age. *Brit vet J.* 120:385-388.

Pelletier, G., A. Tremblay, and P. Hélie. 1985. Facteurs influençant le profil métabolique des vaches laitières. *Can Vet J.* 26:306-311.

Philippeau, C., C. Martin, and B. Michalet-Doreau. 1999. Influence of grain source on ruminal characteristics and rate, site, and extent of digestion in beef steers. *J Anim Sci.* 77:1587-1596.

Piccione, G., and G. Caola. 2002. Biological rhythm in livestock. *J Vet Sci.* 3:145-157.

Powers, W.J., and H.H. Van Horn. 2001. Nutritional implications for manure nutrient management planning. *Appl Eng Agric.* 17:27-39.

Radomski, M.W., A. Buguet, A. Montmayeur, P. Bogui, L. Bourdon, F. Doua, A. Lonsdorfer, P. Tapie, and M. Dumas. 1995. Twenty-Four-hour plasma cortisol and prolactin in human African trypanosomiasis patients and healthy African controls. *Am J Trop Med Hygiene.* 52:281-286.

Rajaratne, A.A., D. Scott, and W. Buchan. 1994. Effects of a change in phosphorus requirement on phosphorus kinetics in the sheep. *Res Vet Sci.* 56:262-264.

Ravindran, V., W.L. Bryden, and E.T. Kornegay. 1995. Occurrence, bioavailability and implications in poultry nutrition. *Poult Avian Biol. Rev.* 6:125-143.

Reed, W.D., R.C. Elliott, and J.H. Topps. 1965. Phosphorus excretion of cattle fed on high-energy diets. *Nature.* 208:953-954.

Reinberg, A., Y. Touitou, A. Restoin, C. Migraine, F. Levi, and H. Montagner. 1985. The genetic background of circadian and ultradian rhythm patterns of 17-hydroxycorticosteroids: a cross-twin study. *J Endocrinol.* 105:247-253.

Reinhardt, T.A., R.L. Horst, and J.P. Goff. 1988. Calcium, phosphorus, and magnesium homeostasis in ruminants. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 4:331-350.

Riad, F., J. Lefaivre, and J.P. Barlet. 1987. 1,25-Dihydroxycholecalciferol regulates salivary phosphate secretion in cattle. *J Endocrinol.* 112:427-430.

Rodehutsord, M., A. Pauen, P. Windhausen, R. Brintrup, and E. Pfeffer. 1994.

Effects of Drastic Changes in P Intake on P Concentrations in Blood and Rumen Fluid of Lactating Ruminants. *J Vet Med - Series A*. 41:611-619.

Rogers, P.P., EP Poole, DBR. Phosphorus status of cattle blood and forage in the Munster area. *Irish Vet J*. 40,:176-182.

Rooke, J.A., N.H. Lee, and D.G. Armstrong. 1987. The effects of intraruminal infusions of urea, casein, glucose syrup and a mixture of casein and Glucose syrup on nitrogen digestion in the rumen of cattle receiving grass-silage diets. *Brit J Nutr*. 57:89-98.

Rosol, T.J., and C.C. Capen. 1997. Calcium-Regulating Hormones and Diseases of Abnormal Mineral (Calcium, Phosphorus, Magnesium) Metabolism. In *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. J.J. Kaneko, J.W. Harvey, and M.L. Bruss, editors. Academic Press, San Diego, California. p. 619-702.

Rotz, C.A., A.N. Sharpley, L.D. Satter, W.J. Gburek, and M.A. Sanderson. 2002. Production and Feeding Strategies for Phosphorus Management on Dairy Farms. *J Dairy Sci*. 85:3142-3153.

Russell, R.W., and S.A. Gahr. 2000. Glucose Availability and Associated Metabolism. In *Farm Animal Metabolism and Nutrition*. J.P.F. D'Mello, editor. CABI Publishing. p. 121-147.

Sato, H. 1975. The effect of bilateral ligation of the parotid duct on phosphorus, sodium and potassium metabolism and acid-base balance in the goat. *Nippon Juigaku Zasshi*. 37:155-164.

Satter, L.D., and Z.G. Wu. 2000. Balancing the animal's nutritional needs with environmental stewardship. *Adv Dairy Tech*. 12:43-57.

Sauberlich, H.E. 1987. Vitamins-How much is for keeps. *Nutrition Today*. 22:20.

Scott, D., and W. Buchan. 1988. The effects of feeding pelleted diets made from either coarsely or finely ground hay on phosphorus balance and on the partition of phosphorus excretion between urine and faeces in the sheep. *Q J Exp Physiol*. 73:315-322.

Scott, D., A.F. McLean, and W. Buchan. 1984a. The effect of variation in phosphorus intake on net intestinal phosphorus absorption, salivary phosphorus secretion and pathway of excretion in sheep fed roughage diets. *Q J Exp Physiol*. 69:439-452.

Scott, D., A.F. McLean, and W. Buchan. 1984b. The effects of intravenous phosphate loading on salivary phosphorus secretion, net intestinal phosphorus absorption and pathway of excretion in sheep fed roughage diets. *Q J Exp Physiol*. 69:453-461.

Shaffer, L., J.D. Roussel, and K.L. Koonce. 1981. Effects of age, temperature-season,

and breed on blood characteristics of dairy cattle. *J Dairy Sci.* 64:62-70.

Shaver, R., and W.T. Howard. 1995. Are we feeding too much phosphorus? *Hoard's Dairyman.* 140.

Sheperd, A.C., and D.K. Combs. 1998. Long-term effects of acetate and propionate on voluntary feed intake by midlactation cows. *J Dairy Sci.* 81:2240-2250.

Shirazi-Beechey, S.P., J.I. Penny, J. Dyer, I.S. Wood, P.S. Tarpey, D. Scott, and W. Buchan. 1996. Epithelial phosphate transport in ruminants, mechanisms and regulation. *Kidney Int.* 49:992-996.

Shupe, J.L., J.E. Butcher, J.W. Call, A.E. Olson, and J.T. Blake. 1988. Clinical signs and bone changes associated with phosphorus deficiency in beef cattle. *Am J Vet Res.* 49:1629-1636.

Smith, A.M., G.L. Holck, and H.B. Spafford. 1966. Re-evaluation of nutrient allowances for high-producing cows. Calcium, phosphorus, and vitamin D. *J Dairy Sci.* 49:239-246.

Soares, J.H. 1995. Phosphorus Bioavailability. *In Bioavailability of Nutrients for Animals : Amino Acids, Minerals and Vitamins.* C.B. Ammerman, D.H. Baker, and A.J. Lewis, editors. Academic Press, San Diego, California. p. 257-294.

Sokolove, P.G., and W.N. Bushell. 1978. The chisquare periodogram: Its utility for analysis of circadian rhythms. *J Theor Biol.* 72:131-160.

Southgate, D.A.T. 1988. AFRC Institute of Food Research. A. Report, editor, Shinfield, Reading. Spiekers, H., R. Brintrup, M. Balmelli, and E. Pfeffer. 1993. Influence of dry matter on faecal phosphorus losses in dairy cows fed rations low in phosphorus. *J Anim Physiol Anim Nutr.* 69:37-43.

Stampfli, G., J. Anetzhorfer, and J. Stirnimann. 1980. Der Einfluss der Tageszeit auf hanatologische und klisnisch-chemische Parameter bei der Milchkuh. *Schweiz Arch Tierheilk.* 122:327-340.

Steevens, B.J., L.J. Bush, J.D. Stout, and E.I. Williams. 1971. Effects of varying amounts of calcium and phosphorus in rations for dairy cows. *J Dairy Sci.* 54:655-661.

Sullivan, T.W., J.H. Douglas, N.J. Gonzalez, and P.L. Bond, JR. 1992. Correlation of Biological Value of Feed Phosphates with Their Solubility in Water, Dilute Hydrogen Chloride, Dilute Citric Acid, and Neutral Ammonium Citrate. *Poult Sci.* 71:2065-2074.

Swingle, R.S., T.P. Eck, C.B. Theurer, M. De la Llata, M.H. Poore, and J.A. Moore. 1999. Flake density of steam-processed sorghum grain alters performance and sites of

digestibility by growing-finishing steers. *J Anim Sci.* 77:1055-1065.

Tamminga, S. 1996. A review on environmental impacts of nutritional strategies in ruminants. *J Anim Sci.* 74:3112-3124.

Teleni, E., H. Dean, and R.M. Murray. 1976. Some factors affecting the measurement of blood inorganic phosphorus in cattle. *Aust Vet J.* 52:529-533.

Thomas, F.M., R.J. Moir, and M. Somers. 1967. Phosphorus turnover in sheep. *Aust J Agric Res.* 18:635.

Tomas, F.M. 1974a. Phosphorus Homeostasis in Sheep. II Influence of Diet on the Pathway of Excretion of Phosphorus. *Aust J Agric Res.* 25:485-493.

Tomas, F.M., and M. Somers. 1974b. Phosphorus Homeostasis in Sheep. I Effects of Ligation of Parotid Salivary Ducts. *Aust J Agric Res.* 25:475-483.

Toops, J.H., W.D. Reed, and R.C. Elliott. 1966. Studies on the metabolism of cattle given high concentrate diets. *J Ag Sci Camb.* 66:233-240.

Touitou, Y. 1998. *Biological clocks: mechanisms and applications.* Elsevier. 584 pp.

Tremblay, A.V. 1996. Les bilans biochimiques chez les bovins laitiers du Québec. Dans: *Pathologie et Nutrition, Journées Nationales des G.T.V., Angers, France:*p. 283-287.

Underwood, E.J., and N.F. Suttle. 1999. *The Mineral Nutrition of livestock.* Cabi Publishing, Wallingford, Oxon, UK. 614 pp.

Unshelm, J., and W.H. Rapen. 1968. Individuelle, tages-, und tageszeitabhängige Schwankungen von Blutbestandteilen beim Rind : 1. Mitteilung: Das Verhalten der Mineralstoffe Natrium, Kalium, Kalzium, Magnesium und anorganischer Phosphor. *Zentralbl Veterinarmed A.* 15:418-437.

Valk, H., J.A. Metcalf, and P.J.A. Withers. 2000. Prospects for minimizing phosphorus excretion in ruminants by dietary manipulation. *J Environ Qual.* 29:28-36.

Valk, H., and L.B. Sebek. 1999. Influence of long-term feeding of limited amounts of phosphorus on dry matter intake, milk production, and body weight of dairy cows. *J Dairy Sci.* 82:2157-2163.

Valk, H., L.B. Sebek, and A.C. Beynen. 2002. Influence of phosphorus intake on excretion and blood plasma and saliva concentrations of phosphorus in dairy cows. *J Dairy Sci.* 85:2642-2649.

Van Dongen, H.P., E. Olofsen, J.H. VanHartvelt, and E.W. Kruyt. 1999. Searching

for biological rhythms: peak detection in the periodogram of unequally spaced data. *J Biol Rhythms*. 14:617-620.

Van Horn, H.H., G.L. Newton, and W.E. Kunkle. 1996. Ruminant nutrition from an environmental perspective: factors affecting whole-farm nutrient balance. *J Anim Sci*. 74:3082-3102.

Van Horn, H.H., A.C. Wilkie, W.J. Powers, and R.A. Nordstedt. 1994. Components of dairy manure management systems. *J Dairy Sci*. 77:2008-2030.

Walstra, P., and R. Jenness. 1984. *Dairy Chemistry and Physics*. John Wiley and Sons, New York, USA. 467 pp.

Whitaker, D.A. 1997. Interpretation of metabolic profiles in dairy cows. *Irish Vet J*. 50:8:498-501.

Whitaker, D.A. 2000. Use and Interpretation of Metabolic Profiles. In *The Health of Dairy Cattle*. A.H. Andrews, editor. Blackwell Science Ltd, London. p. 89-107.

Williams, S.N., L.A. Lawrence, L.R. McDowell, N.S. Wilkinson, P.W. Ferguson, and A.C. Warnick. 1991a. Criteria to evaluate bone mineralization in cattle :1- Effect of dietary phosphorus in chemical, physical and mechanical properties. *J Anim Sci*. 69:1232-1242.

Williams, S.N.M., L.R. Warnick, A.C. Wilkinson, N.S. Lawrence, L.A. 1991b. Phosphorus concentrations in blood, milk, feces, bone and selected fluids and tissues of growing heifers as affected by dietary phosphorus. In *Livestock Research for Rural Development 3*,. <http://www.cipav.org.co/lrrd/lrrd3/2/florida4.htm>.

Winks, L., F.C. Lamberth, and P.K. O'Rourke. 1977. The effect of a phosphorus supplement on the performance of steers grazing Towsville stylo-based pasture in north Queensland. *Aust J Exp Agric Anim Husb*. 17:357-366.

Winter, W.H. 1988. Supplementation of steers grazing *Stylosanthes hamata* pastures at Katherine, Northern Territory. *Aust J Exp Agric*. 28:669-682.

Wise, A. 1995. Phytate and zinc bioavailability. *Int J Food Sci Nutr*. 46:53-63.

Wu, Z., and L.D. Satter. 2000a. Milk production and reproductive performance of dairy cows fed two concentrations of phosphorus for two years. *J Dairy Sci*. 83:1052-1063.

Wu, Z., L.D. Satter, A.J. Blohowiak, R.H. Stauffacher, and J.H. Wilson. 2001. Milk production, estimated phosphorus excretion, and bone characteristics of dairy cows fed different amounts of phosphorus for two or three years. *J Dairy Sci*. 84:1738-1748.

Wu, Z., L.D. Satter, and R. Sojo. 2000b. Milk production, reproductive performance, and fecal excretion of phosphorus by dairy cows fed three amounts of phosphorus. *J Dairy Sci*. 83:1028-1041.

Yang, W.Z., K.A. Beauchemin, and L.M. Rode. 2001. Effects of grain processing, forage to concentrate ratio, and forage particle size on rumen pH and digestion by dairy cows. *J Dairy*

*Sci.* 84:2203-2216.

Yano, F., H. Yano, and G. Breves. 1991. Calcium and phosphorus metabolism in ruminants. *In Physiological aspects of digestion and metabolism in ruminant Physiol.* T. Tsuda, editor. Academic Press, Sendai, Japan. p. 277-296.

Zinn, R.A. 1990. Influence of steaming time on site of digestion of flaked corn in steers. *J Anim Sci.* 68:776-781.

# ACCORD ET PERMISSION DES COAUTEURS D'UN ARTICLE<sup>1</sup>

## IDENTIFICATION DE L'ÉTUDIANT

<b>Nom de l'étudiant</b> Lisandro Atilio Montiel Ramos		<b>Code permanent</b> [REDACTED]
<b>Sigle du programme</b> Ph.D.	<b>Titre du programme</b> Sciences vétérinaires	<b>Option</b>

## DESCRIPTION DES ARTICLES

<b>Auteurs</b> L. Montiel, A. Tremblay, V. Girard	
<b>Titre</b> Effet de la modalité de prélèvement sur les valeurs de référence de la phosphatémie des bovins laitiers cliniquement sains	
<b>Revue</b> Veterinary Clinical Pathology	<b>Date de publication</b> Soumis le 05/10/2005

<b>Auteurs</b> L. Montiel, A. Tremblay, V. Girard	
<b>Titre</b> Variations circadiennes et ultradiennes de la phosphatémie chez les bovins laitiers	
<b>Revue</b> Journal of Circadian Rhythms	<b>Date de publication</b> Soumis le 20/10/2005

<b>Auteurs</b> L. Montiel, A. Tremblay, V. Girard	
<b>Titre</b> Effets des sources d'hydrate de carbone de la ration sur la phosphatémie des bovins laitiers	
<b>Revue</b> Canadian Journal of Animal Science	<b>Date de publication</b> Soumis le 10/12/2005

## DÉCLARATION DES COAUTEURS

<b>Déclaration</b> <i>À titre de coauteurs des articles identifiés ci-dessus, nous autorisons le microfilmage de la thèse et nous sommes d'accord que Lisandro Atilio Montiel Ramos inclut ces articles dans sa thèse de doctorat qui a pour titre : . Les variations de la phosphatémie chez les bovins laitiers.</i>		
<b>Coauteur</b> A. Tremblay	<b>Signature</b> [REDACTED]	<b>Date</b> 2005/09/14
<b>Coauteur</b> V. Girard	<b>Signature</b> [REDACTED]	<b>Date</b> 2005/09/14
<b>Coauteur</b>	<b>Signature</b> [REDACTED]	<b>Date</b>
<b>Coauteur</b>	<b>Signature</b>	<b>Date</b>
<b>Coauteur</b>	<b>Signature</b>	<b>Date</b>