

Université de Montréal

**Étude des facteurs de variation des globulines
sériques chez la vache laitière**

Par

Younès Chorfi

Département de Biomédecine vétérinaire

Faculté de Médecine vétérinaire

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures en vue de l'obtention du grade de
Philosophiæ Doctor (Ph. D.) en Sciences vétérinaires option Pathologie

Décembre, 2004

© Younès Chorfi



SF

607

U54

2005

v. 031

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.

Faculté des Études Supérieures

Cette thèse intitulée

**Étude des facteurs de variation des globulines
sériques chez la vache laitière**

Présentée par Younès Chorfi

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Président du jury : Dr Amer SILIM,

Directeur de recherche : Dr Armand TREMBLAY,

Codirectrice de recherche : Dre Anne LANEVSCHI,

Codirecteur de recherche : Dr Vincent GIRARD,

Membre du jury : Dr Christopher PRICE,

Examineur externe : Dre Hélène V. PETIT,

Représentant du doyen :

Résumé

Les objectifs spécifiques de cette étude étaient d'évaluer la concentration des globulines sériques et les sources préanalytiques et analytiques potentielles de leur variation, de corréler la concentration des globulines sériques avec le nombre d'embryons transférables chez des bovins laitiers après un traitement de superovulation et de distinguer statistiquement des groupes de bovins laitiers en se basant sur la concentration de leurs globulines sériques et d'établir des relations entre les paramètres biochimiques et hématologique et la concentration en globulines sériques.

Les concentrations sériques des globulines et de l'albumine ont été analysées par la technique colorimétrique et électrophorétique chez 86 vaches dont 34 étaient des vaches en lactation et 41 des vaches tarées. Sur des groupes additionnels, la concentration sérique des globulines a été analysée chaque heure pendant 24 heures chez 4 vaches en lactation et chaque semaine pendant 15 semaines chez 6 autres. Les concentrations sériques des globulines d'échantillons sanguins obtenus par la veine jugulaire et les vaisseaux coccygiens ont été comparées chez 4 vaches en lactation. Dans cette étude (article1) la concentration des globulines déterminée par colorimétrie montre une bonne corrélation avec la fraction γ -globuline ($r^2 = 0.87$) et la concentration en IgG ($r^2 = 0.91$). La variation journalière des globulines sériques est significative ($P = 0.01$). Cependant les globulines ne varient pas significativement durant une période de 15 semaines. La concentration en globulines sériques des échantillons pris dans la veine jugulaire était à 2.35 g/L plus élevée ($P < 0.0001$) que celle des échantillons pris dans vaisseaux coccygiens.

Quarante-neuf vaches (41 en lactation et 8 tarées) ont été utilisées pour vérifier la relation entre le nombre d'embryons transférables et les paramètres biochimiques. Ces derniers sont utilisés comme indicateur de l'état métabolique des vaches après un traitement de superovulation. Au moment de la récolte embryonnaire, des échantillons sanguins individuels ont été pris pour l'analyse biochimique. Des échantillons d'aliments ont été pris pendant 2 semaines avant la collecte des embryons pour l'analyse des mycotoxines (DON, Zéralénone et T-2). Dans cette expérience (article 2), la concentration des globulines sériques n'a pas été reliée significativement ($P=0.14$) au nombre d'embryons transférables.

Des échantillons sanguins de 5893 vaches Holstein adultes présentées à l'hôpital de la Faculté de Médecine Vétérinaire entre les années 1993 et 2003 pour des maladies infectieuses ou métaboliques ont été analysés pour différents paramètres biochimiques et hématologiques. Les valeurs de ces paramètres ont été normalisées par une transformation logarithmique et standardisées par la procédure *Stdsize* (SAS 2000). Ainsi, les valeurs de globulines supérieures à +1 et inférieures à -1 ont été groupées en catégories hyper et hypoglobulinémique (GLO^+ et GLO^-) et les valeurs entre +1 et -1 ont constitué la catégorie normale (GLO^0). Ensuite deux méthodes statistiques, centroïde et discriminante, ont été utilisées pour classifier les paramètres sanguins autre que les globulines. Dans cette étude (article 3) la méthode centroïde a été meilleure que la méthode discriminante pour classifier 2609 observations. Le taux d'erreur de la méthode discriminante est 49% par rapport à 39% pour la méthode centroïde. Cette dernière a montré que la concentration sérique du fibrinogène (Fb) et le nombre des neutrophiles (Neutro) et des lymphocytes (Lymp) de GLO^0 étaient significativement bas par rapport à GLO^+ ($p<.0001$, $p<.0001$ et $p=0.0019$

respectivement) et significativement élevés par rapport à GLO^- ($p = 0.014$, $p=0.0002$ et $p<.0001$ respectivement). Comparés à GLO^0 , les concentrations sériques en sodium (Na) et en chlorure (Cl) ont été significativement élevées ($p=0.0002$ et $p=0.0008$ respectivement) pour GLO^- et significativement basses pour GLO^+ ($p=0.05$ et $p= 0.0005$ respectivement). La concentration du phosphore (P) et le nombre de globule rouge (GR) ont été significativement élevés pour GLO^- par rapport à GLO^0 ($p<.0001$ et $p=0.007$ respectivement) et les concentrations sériques de la créatinine (Crea) et du calcium (Ca) ont été significativement basse pour GLO^+ par rapport à GLO^0 ($p=0.001$ et $p=0.02$ respectivement).

Ces études montrent que la méthode colorimétrique, très utilisée dans la routine des analyses de laboratoire, reste pratique dans la détermination des globulines sériques. Cependant, le moment de la prise sanguine et le site de prélèvement doivent être considérés dans l'interprétation des résultats. Les globulines sériques n'avaient pas d'effet significatif sur le nombre d'embryons transférables. Finalement, en utilisation l'écart type comme critère de normalité dans une population, la méthode centroïde permet une meilleure classification que la méthode discriminante. Cette classification a montré que la concentration en Fb, Na, Cl, P, Crea, Ca et le nombre de Neutro, Lymp et GR de GLO^0 ont été significativement différents de ceux de GLO^- et GLO^+ .

Mots clés : globulines sériques, bovin laitier, transfert embryonnaire, classification centroïde, paramètres biochimiques, paramètres hématologiques.

Abstract

The general aim of the thesis was to increase our knowledge of serum globulin and its relationship with various chemical and hematological parameters in dairy cows. Serum globulin as part of the immune system can reflect inflammation, infectious disease and nutritional status of dairy cow.

Specific objectives of this study were 1) to compare colorimetry-based total serum globulin values with electrophoretically-determined serum globulin fractions and with IgG concentration, and to evaluate diurnal and long-term physiological variation and the effects of lactation and venipuncture site on serum globulin concentrations in Holstein dairy cattle. 2) To verify the relationship between the number of transferable embryos (TE) and serum globulin concentrations of cows after superovulatory treatment. 3) To aggregate serum globulin observations into distinct groups using a classification method based on distance to cluster centroids and demonstrate that variations of serum globulin concentration can adequately predict variations of other parameters, which might be involved in globulin variation.

Serum total globulin and albumin concentrations were analyzed by colorimetry and electrophoresis in 86 lactating cows; IgG concentrations were determined by radial immunodiffusion test in 41 dry and 34 lactating cows. Serum globulins were analyzed hourly for 24 hours in 8 lactating cows and weekly for 15 weeks in 6 additional cows. Globulin concentrations were compared in samples obtained from jugular and coccygeal venipuncture sites in 4 cows. In this experiment (article 1) colorimetry-based total serum globulin concentrations correlated well with γ -globulin fractions ($r^2 = 0.87$) and IgG concentrations ($r^2 = 0.91$). Diurnal variation

of total serum globulin concentration was significant ($P = 0.01$); however, globulins did not vary significantly over a 15-week period. Mean serum globulin concentration in samples obtained from the jugular vein was 2.35 g/L higher ($P < 0.0001$) than that of samples obtained by coccygeal venipuncture.

Forty nine Holstein cows (41 lactating and 8 dry) were subjected to superovulatory treatment for commercial production of embryos. At the time of embryo harvest, individual blood samples were taken from each cow for analysis of biochemical parameters. Feed samples were collected daily during two weeks before embryo collection and they were analyzed for mycotoxins (vomitoxin, zearalenone and T2 toxin). In this experiment (article 2) serum globulin had no significant effect ($P= 0.14$) on the number of transferable embryos

Blood samples of 5893 adult Holstein cows presented to the hospital of the Faculté de Médecine Vétérinaire between 1993-2003, for evaluation of infectious or metabolic diseases were analyzed for biochemical and hematological parameters. Blood parameters were normalized through a log transformation and standardized using Stdsz procedure. Standardized globulin values higher than +1 and lower than -1 were grouped in hyper- or hypoglobulinemic categories (GLO^+ , GLO^-) and values between -1 and 1 were included in normal category (GLO^0). In this study (article 3), centroid method was more successful to classify 2609 observations than discriminant classification. Error rate of discriminant method was 49% compared to 39% for centroid method. This centroid classification revealed that serum concentration of Fb and Neutro and Lymp counts were significantly lower in GLO^0 than for the GLO^+ ($p<.0001$, $p<.0001$ and $p=0.0019$ respectively) and significantly higher than for GLO^- ($p = 0.014$, $p=0.0002$ and $p<.0001$). In comparison to GLO^0 , Na and Cl

concentrations were higher for GLO⁻ ($p=0.0002$ and $p=0.0008$ respectively) and lower for GLO⁺ ($p=0.05$ and $p=0.0005$ respectively). Serum concentration of P and RBC count were significantly higher in GLO⁻ than in GLO⁰ ($p<.0001$ and $p=0.007$ respectively) and serum concentrations of Crea and Ca were significantly lower in GLO⁺ than in GLO⁰ ($p=0.001$ and $p=0.02$ respectively).

These studies show that colorimetric method widely used in routine laboratory analyses remains a useful test for globulin determination in dairy cattle. However, sampling time and venipuncture site should be considered in the interpretation of serum globulins. Serum globulin was not associated with the number of transferable embryos, and finally, centroid method was more successful than linear discriminant function to describe how different blood parameters varied with high or low globulin concentration. Centroid classification showed that serum concentration of Fb, Na, Cl, P, Crea and Ca and Neutro, Lym and RBC counts of GLO⁰ were significantly different from GLO⁺ and GLO⁻ categories.

Key words: serum globulin, dairy cattle, embryo transfer, centroid classification, biochemical parameters, haematological parameters

Table des matières

Page titre	i
Page d'identification du jury	ii
Résumé	iii
Abstract	vi
Table des matières	ix
Liste des tableaux	xii
Liste des figures	xiii
Liste des abréviations	xiv
Remerciements	xvii
Dédicace	xviii
Chapitre 1	
I. Introduction	1
II. Recension de la littérature	4
1. Nutrition et système immunitaire	7
1.1. Équilibre énergétique et protéique	7
1.2. Micronutriments	16
1.2.1. Les vitamines	16
1.2.1.1 La vitamine A	16
1.2.1.2 La vitamine E	20
1.2.2 Le sélénium	22

1.2.3 Le cuivre	25
1.2.4 Le fer	30
1.2.5 Le zinc	34
1.3 Le pH	37
1.4 Le profil métabolique	40

Chapitre 2

ARTICLE # 1: Evaluation of variation in serum globulin concentrations in 51
dairy cattle

Introduction	54
Matériel et Méthodes	55
Résultats	59
Discussion	61
Références	65

Chapitre 3

ARTICLE # 2 : Metabolic balance and embryo production during 77
superovulatory treatment in dairy cattle

Introduction	80
Matériels et Méthodes	82
Résultats	86
Discussion	87
Références	92

Chapitre 4

ARTICLE # 3 : Centroid classification of blood parameters related to the
globulin concentration of lactating cows. 100

Introduction 103

Matériel et Méthodes 104

Résultats 108

Discussion 108

Références 111

Chapitre 5

III. Discussion et Conclusion générale 117

IV. Références 124

Liste des tableaux**Chapitre 3**

- Table 1.** Relationship between TE and biochemical blood parameters. 97
Significant variables (*) at the liberal alpha level of 0.15 were then included in a multivariate model.
- Table 2.** Biochemical blood parameters significantly associated with the number of TE. 98
- Table 3.** Relationship between TE and feed mycotoxins concentrations. 99

Chapitre 4

- Table 1.** Means \pm MSE of blood parameter concentrations in GLO categories. 116

Liste des figures

Chapitre 2

- Figure 1.** Regression analysis of colorimetry-based total globulins concentration (C.T.G.) and electrophoretically determined total globulins (E.T.G.) (A), α -globulins (E. α -G.) (B), β -globulins (E. β -G.) (C) and γ -globulins (E. γ -G.) (D) concentrations. 68
- Figure 2.** Regression analysis comparing colorimetry-based total globulins (C.T.G.) concentration with IgG concentration (g/L). 70
- Figure 3.** Diurnal variation in total serum globulin and albumin concentrations. Each point corresponds to the mean (\pm SEM) of 8 lactating cows sampled on 3 separate days at 3-week intervals. Morning (6 AM to 1 PM) total globulin concentrations (grayed zone of graph) were significantly higher than those obtained during the evening ($P = .04$) and at night ($P = .002$). 72
- Figure 4.** Long-term variation in total serum globulins concentration. Six lactating cows were sampled every 3 weeks for 15 weeks (6 samples each). There was no significant effect of time on serum globulins concentration ($P = .639$). 74

Chapitre 4

- Figure 1.** Observation dispersion in GLO categories: GLO⁻ (\square), GLO⁰ (\circ) and GLO⁺ (Δ). Each point corresponds to observation distance to cluster centroids and plotted against two canonical coordinates (CAN1, CAN2). 114

Liste des abréviations

AGL :	Acides Gras libres
ALB :	Albumine
ALP :	Alcaline Phosphatase
α -TTP :	alpha-Tocopherol transfer protein
ALT :	Amino alanine Transférase
AR :	Acide rétinoïque
AST :	Aspartate amino-Transférase
BHB:	Betahydroxybutyrate
Ca:	Calcium
Caro :	β -Carotène
CCS:	Comptage des Cellules Somatiques
Cd	Cadmium
Chol :	Cholestérol
CK:	Creatinine Kinase
Cl :	Chlorure
Con A :	Concanavaline A
Crea:	Creatinine
Cu :	Cuivre
CMH:	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CMS:	Consommation de Matière Sèche
CVMS:	Consommation Volontaire de Matière Sèche
DIM :	Day in Milk

Fb :	Fibrinogène
Fe :	Fer
GGT :	Gamma-Glutamyl Transferase
Glo:	Globulines sériques
Glu :	Glucose
GPXs :	Glutathione Peroxydase
HCO ₃ ⁻ :	Bicarbonates
HCT:	Hématocrite
INF :	Interféron
IL :	Interleukine
ICAM :	Intracellular Adhesion Molecule
K:	Potassium
Lymp :	Lymphocytes
Mg:	Magnésium
MO :	Molybdène
MS:	Matière Sèche
Na :	Sodium
Neutro :	Neutrophiles
NHE-1 :	Na ⁺ /H ⁺ Exchanger
NK:	Natural Killer
NO:	Nitric Oxide
P :	Phosphore
PG:	Prostaglandine
PHA:	Phytohémagglutinine

PLT:	Plaquettes
PUFA:	Polyunsaturated Fatty Acids
PWM:	Pokeweed Mitogen
RBC:	Red Blood Cell
S:	Soufre
Se :	Sélénium
TBil :	Total Bilirubine
TE:	Transferable Embryos
TNF:	Tumour Necrosis Factor
TP:	Total Proteins
UI :	Unité internationale
Zn :	Zinc

Remerciements

J'aimerais remercier toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à ce travail de doctorat, et plus particulièrement,

Dr Tremblay, sa capacité de travail est un exemple à suivre et ses connaissances scientifiques ont permis à ce travail d'aboutir.

Dre Anne Lanevski, sa rigueur scientifique, ses qualités d'organisation et son support scientifique et moral étaient nécessaires pour mener à terme ce travail

Dr Vincent Girard, son abstraction mathématique, sa capacité de travail et sa vision à long terme sont les balises que j'ai apprises durant l'accomplissement de ce travail.

Dr. Amer Silim dont les conseils et le support scientifique et moral ont beaucoup aidé dans les moments difficiles.

Manon Brunet-Sicotte et les techniciennes et techniciens des Laboratoires de Biochimie et Hématologie pour leur support.

Dédicace

À la mémoire de mon père, disparu durant l'accomplissement de travail

À Adam, mon fils qui est né durant l'accomplissement de travail

À Ghita, ma femme qui m'a supporté tout au long de ce travail

À ma famille et mes proches

CHAPITRE 1

I. Introduction

Des observations indiquent que les mécanismes de défenses innés et acquis sont affaiblis pendant la période peripartum. Cette diminution de la réponse inclut les aspects de l'immunité systémique et ceux de la glande mammaire, et est à l'origine de l'augmentation des incidences de maladies en période peripartum. Le stress physique et métabolique de la gestation, du vêlage et de la lactation contribuent de manière substantielle à la diminution de la résistance de l'animal et à l'augmentation de la fréquence des maladies (Mallard et al., 1998). L'immunodéficience constatée chez les bovins laitiers se traduit par une baisse des globulines sériques qui reflète une diminution de la réponse humorale (IgG et IgM) et une diminution de la réponse cellulaire des neutrophiles et des lymphocytes (Meirom et al., 1999). L'évaluation des globulines sériques est donc un moyen d'appréciation de l'état immunitaire chez le bovin laitier. Les fluctuations des globulines sériques apparaissent surtout durant la lactation, stade durant lequel plusieurs problèmes métaboliques se manifestent à la suite de la forte production laitière. Les facteurs comme la saison, l'âge et la gestation peuvent influencer les globulines sériques. Dans une étude de Kitchenham et al. (1975), une relation inversement proportionnelle a été trouvée entre la concentration des globulines sériques et la production laitière et une corrélation positive entre l'âge des animaux et les globulines sériques. Ainsi, plusieurs facteurs préanalytiques devraient être pris en considération dans l'interprétation des globulines sériques chez le bovin laitier.

Des études utilisant la mammite comme modèle expérimental de maladie infectieuse montrent que la forte activation du système immunitaire en dehors de

l'appareil reproducteur est parmi les causes de pertes embryonnaires (Soto et al., 2003). L'activité immunitaire humorale et cellulaire peut ainsi être reliée à une perte embryonnaire durant la pré-implantation (Hansen et al., 2004). Les globulines sériques représentent une partie de la réponse immunitaire humorale qui peut influencer la fertilité de la vache, le déroulement de la fécondation et de la gestation (Soto et al., 2003).

Dans une base de données à grand nombre d'observations, l'étude des globulines sériques représente un problème majeur : travailler avec un grand nombre de facteurs qui comportent des risques de multicollinéarité et d'interaction (Dohoo et al., 1997). Ces difficultés poussent à développer des approches statistiques adaptées à ce contexte pour mieux dégager les relations entre les globulines sériques et l'état nutritionnel des vaches. En effet, le statut alimentaire et nutritionnel des bovins laitiers peut être une source de stress métabolique qui est à l'origine de variations des globulines sériques. Les déficiences chroniques en énergie, en protéines, en minéraux ou en vitamines ont été souvent associées à une susceptibilité accrue aux maladies résultant d'un système immunitaire affaibli (Galyean et al., 1999).

Le but général de cette étude était d'améliorer les connaissances sur les globulines sériques et leurs interactions avec les paramètres biochimiques et hématologiques chez le bovin laitier. Étant une partie du système immunitaire, les globulines peuvent refléter des situations d'inflammation, d'infection et parfois de l'état nutritionnel de l'animal.

Les objectifs de cette étude étaient :

- Évaluer la concentration des globulines sériques et les sources préanalytiques et analytiques potentielles de leur variation.

- Corréler la concentration des globulines sériques avec le nombre d'embryons transférables chez des bovins laitiers après un traitement de superovulation.
- Distinguer statistiquement des groupes de bovin laitier en se basant sur la concentration de leurs globulines sériques et d'établir des relations entre les paramètres biochimiques et hématologiques et la concentration des globulines sériques.

II. Recension de la littérature

Les protéines ont un rôle incontournable dans plusieurs processus physiologiques et leurs fonctions sont innombrables. Elles forment la base de la structure des cellules, des organes et des tissus, elles maintiennent la pression oncotique, sont des catalyseurs (enzymes) des réactions biochimiques, elles sont des tampons pour le maintien de l'équilibre acido-basique, des régulateurs (hormones), agissent dans la coagulation et la réaction immunitaire, sont nutritives et transportent la majorité des constituants plasmatiques. L'activité biologique des protéines et des polypeptides dépend de leur structure, allant de la séquence acide aminé primaire qui détermine la fonction hormonale jusqu'à la macromolécule qui peut former la fibrine permettant la coagulation sanguine.

Le site majeur de la synthèse des protéines plasmatiques est le foie. Le deuxième site est le système immunitaire représenté par les lymphocytes et les plasmocytes. Les protéines structurales, fonctionnelles et enzymatiques synthétisées dans les tissus sont présentes dans le plasma mais à des quantités inférieures, le résultat du turnover cellulaire. En général, le plasma contient 5 à 7% (50-70g/L) de protéines. Si on considère l'hémoglobine, le sang total est constitué de plus de 20 % de protéines. Les protéines plasmatiques ont plusieurs fonctions. Elles permettent de maintenir l'intégrité de l'organisme, leur présence permet d'empêcher la diffusion du plasma au travers des parois des capillaires sanguins (en maintenant la pression oncotique du sang) et de stabiliser le pH du sang grâce à un certain pouvoir tampon. Elles sont impliquées dans le transport de diverses molécules comme les acides

gras, les hormones et le fer. Les transporteurs sont nombreux comprenant l'albumine et la transcortine, la transferrine, la thyroglobuline, la ceruloprotéines et les lipoprotéines. En tant qu'enzymes et hormones, les protéines plasmatiques régulent le métabolisme. Aussi, protègent-elles le corps contre les agressions externes (immunoglobulines, facteurs du complément) ou les lésions internes (fibrinogène, prothrombine, facteurs coagulants).

Les facteurs qui influencent les protéines plasmatiques sont l'âge, le statut hormonal, la gestation et la lactation. L'animal nouveau-né a des valeurs basses en immunoglobulines et en albumine mais qui augmentent avec l'immunocompétence et la capacité du foie adulte à synthétiser l'albumine. Certaines hormones (testostérone, oestrogènes et GH) peuvent augmenter la concentration des protéines plasmatiques grâce à leur effet anabolisant mais d'autres hormones comme la thyroxine et le cortisol peuvent la réduire à cause de leur effet catabolique. Durant la gestation et la lactation, les protéines plasmatiques sont réduites à cause d'une baisse de la synthèse de l'albumine. Pour les vaches en période peripartum, des travaux antérieurs rapportent un dysfonctionnement immunologique à la suite de changements dans les taux des protéines sériques et principalement en globulines (immunoglobulines, complément et conglutinines). Cette hypoglobulinémie peut compromettre l'habileté des vaches à combattre les infections subcliniques et conduit au développement des maladies cliniques (Detilleux et al., 1995).

Les globulines sériques des bovins incluent des protéines dont le poids moléculaire varie de 40 000 à plusieurs millions de Dalton. Les globulines constituent une fraction protéique importante regroupant les immunoglobulines ou anticorps qui

sont impliquées dans les mécanismes de la défense de l'organisme. Les gammaglobulines sont synthétisées par les plasmocytes dans les nœuds lymphatiques, la rate et la moelle osseuse. Chez les ruminants en général et la vache en particulier l'électrophorèse des protéines sériques normales révèle cinq fractions : l'albumine et les globulines α_1 , α_2 , β et γ -immunoglobuline (Kaneko, 1997).

Chez les ruminants, les globulines alpha migrent en fraction α_1 (rapide) et en fraction α_2 (lente). La majorité des globulines de ce groupe est synthétisée par le foie. Les protéines importantes de cette fraction sont les α -lipoprotéines (HDL) qui migrent comme α_1 et pré- β -lipoprotéines (VLDL) qui migrent dans la position α_2 . Ces deux lipoprotéines, avec α_2 -macroglobuline, contribuent à l'augmentation relative des α_2 -globulines observée lors des syndromes néphrotiques. La α_2 -macroglobuline, une haptoglobine (transporteur d'hémoglobine), la céruloplasmine (transport du Cu) et l'améloïde A (SSA) sont des protéines impliquées dans la phase aiguë de l'inflammation et utilisées à des fins de diagnostic (Kaneko, 1997).

Chez les ruminants, les β -globulines migrent en une seule fraction qui est formée par les protéines du complément (C3, C4), l'hémopexine (transport de l'hème), la transferrine (transport du Fe), la ferritine (transport du Fe) et la protéine C-réactive.

Chez la plupart des animaux, la fraction γ -globuline est observée en deux fractions, γ_1 (rapide) et γ_2 (lente). Parmi les immunoglobulines observées chez les animaux domestiques, IgA, IgM et IgE sont trouvés dans la région γ_1 et IgG dans la

région γ_2 . Cependant, ces subdivisions ne sont pas distinguées à l'électrophorèse chez les bovins.

Chez les vaches adultes, la concentration en protéines du plasma varie de 60 à 75 g/l. L'albumine représente 60 % du total, une bonne part du reste, soit près de 40 %, étant représentée par des globulines (α_1 -globulines, 4 %; α_2 -globulines, 8 %; β -globulines, 12 % et les γ -globulines, 16 %) et différents facteurs intervenant dans la coagulation du sang.

L'albumine est synthétisée par le foie à partir des acides aminés disponibles. Elle est essentielle aux échanges hydriques entre les compartiments comme tampons sanguins et comme réserves protéiques de l'organisme. En outre, l'albumine assume le rôle de transporteur et a la faculté de pouvoir se lier de manière réversible à de nombreuses substances (acides gras libres, bilirubine, calcium, médicaments). Chez les vaches cliniquement saines, la valeur sérique de l'albumine est très stable et les variations s'observent après deux à trois semaines à la suite de carences en acides aminés.

1. Nutrition et système immunitaire

1.1 Équilibre énergétique et protéique

Les principaux nutriments, tels que l'énergie et la protéine, jouent un rôle important dans la susceptibilité de l'animal aux maladies. Les besoins en énergie des vaches laitières changent considérablement selon les stades de lactation. Les besoins en énergie sont plus élevés pendant le début de la lactation (NRC, 2001). L'apport recommandé d'énergie du régime alimentaire a été récemment augmenté afin de

satisfaire les besoins des vaches laitières (NRC, 2001). Une considération spéciale doit être accordée aux besoins en énergie des génisses pendant la période de transition. Cependant, une diète énergétique très élevée n'est pas recommandée pendant le tarissement car elle peut avoir un effet négatif sur l'activité ruminale et la consommation de la matière sèche (NRC, 2001). L'augmentation de l'apport d'énergie pourrait être justifiée chez les vaches laitières éprouvant souvent une baisse de la consommation volontaire avant parturition (Van Saun et Sniffen, 1996). Une baisse de 2 à 4 kilogrammes de la consommation de matière sèche est significative en termes de prise nutritive nette. Les besoins en protéines de la vache laitière ne sont pas aussi clairement définis que ceux de l'énergie. Cependant, il y a une différence dans les besoins en protéine entre les génisses et les vaches laitières, et entre les vaches en lactation et les vaches tarées. Les besoins en protéines des vaches laitières en fin de lactation et pendant le tarissement sont de 12-13% alors qu'en début de lactation, elles nécessitent 15-18% de matière sèche (MS) (NRC, 2001). Le besoin en protéines des génisses est plus élevé pour leur propre croissance et celle de la glande mammaire. Un apport en protéine alimentaire au-dessus des recommandations ne confère aucun avantage (Doepel et al., 2002), ou peut réduire la consommation de la matière sèche (CMS) et affecter la reproduction, car la capacité de détoxifier l'ammoniaque est réduite de 40% autour de la parturition (Strang et al., 1998). L'interaction ruminale entre l'énergie et les protéines doit être équilibrée afin d'optimiser les fonctions microbiennes du rumen. L'équilibre entre les hydrates de carbone et les protéines dégradables optimisent la production des acides gras volatils, le taux de passage des aliments, et la production microbienne de protéines (Hutjens, 1996). La période peripartum est le moment le plus difficile pour les vaches laitières.

La période de tarissement est considérée comme une étape de repos entre deux lactations avec des besoins nutritifs réduits, mais au fur et à mesure que la gestation avance il se produit des changements hormonaux pour préparer la parturition et la lactogénèse (Smith et al., 1973; Wettemann, 1980; Bell, 1995). Généralement, une réduction de CMS se produit sept à dix jours avant le vêlage, mais les besoins nutritifs pour entretenir le développement foetal et le déclenchement de la production laitière augmentent en même temps (Grummer, 1995). Comme conséquence de ce déséquilibre, de grands changements métaboliques peuvent émerger. Ceci s'associe à une incidence plus élevée des maladies métaboliques, comme la cétose et les maladies infectieuses (mammite et métrite) qui se produisent en début lactation (Rukkwamsuk et al., 1999; Stabel et al., 2003). Ainsi, la période de transition doit être soigneusement surveillée concernant des facteurs tels que la gestion, la composition proportionnée des aliments, par exemple l'équilibre entre l'énergie et les protéines et une supplémentation proportionnée de micronutriments pour que la transition du tarissement à la lactation se fasse dans les meilleurs apports.

Les vaches laitières sous-alimentées ou suralimentées ont une incidence plus élevée des maladies que les animaux normalement alimentés (Rukkwamsuk et al., 1999). Une carence en énergie pendant la période de fin de la gestation a des conséquences négatives sur la reproduction, tels que l'intervalle vêlage - premier oestrus et le taux de gestation (Randel, 1991).

Le glucose est un élément essentiel de l'apport énergétique pour tous les tissus, et les besoins élevés pendant le début de la lactation excède souvent la quantité de glucose disponible (Ropstad et al., 1989; Holtenius et Holtenius, 1996). Les

besoins en glucose peuvent augmenter 4 fois chez des vaches laitières hautes productrices en début de la lactation par rapport aux vaches tarées (Bell et Bauman, 1997).

Le substrat principal pour la synthèse du glucose est le propionate issu de la fermentation microbienne des hydrates de carbone alimentaires. Cependant, durant le début de la lactation, la consommation volontaire est insuffisante et, pour rencontrer leur besoin élevé en glucose, les vaches sont également dépendantes des substrats endogènes, principalement les acides aminés glucogéniques (glutamine, alanine) obtenus à partir de la dégradation des protéines, et le glycérol à partir de la mobilisation du tissu adipeux (Bell et Bauman, 1997). Par suite de la lipomobilisation importante durant le début de la lactation il y a une élévation de la concentration plasmatique des acides gras libres (Pullen et al., 1989; Holtenius et al., 2003)

Le foie joue un rôle important dans le métabolisme lipidique, en transformant les acides gras libres du sang. Chez les vaches en début lactation, environ 50% de acides gras libres sont oxydés en corps cétoniques ou re-estérifiés en triglycérides dans le foie (Bell, 1995). Cependant, parce que les ruminants n'exportent pas bien les triglycérides en tant que lipoprotéines de faible densité, des quantités significatives sont stockées dans le foie (Kleppe et al., 1988; Rukkwamsuk et al., 1999). En raison de ces dépôts de triglycérides, des perturbations métaboliques telles que la lipidose hépatique et la cétose qui apparaissent avec la production des corps cétoniques, peuvent avoir des effets négatifs sur le système immunitaire. Une faible prolifération des lymphocytes T stimulés par des mitogènes, une réduction de la capacité chimiotactique et une réduction de la phagocytose et de la flambée respiratoire des

neutrophiles ont été rapportées chez des ruminants avec des niveaux élevés en corps cétoniques (Targowski et Klucinski, 1983; Sartorelli et al., 1999; Suriyasathaporn et al., 1999). D'autres études épidémiologiques indiquent une association entre une balance énergétique négative durant le début lactation et l'augmentation de la susceptibilité aux infections comme la mammite (Grohn et al., 1989, Erb et Grohn, 1988). Chez le jeune animal, des veaux acétonémiques (provoqués expérimentalement) ont montré une susceptibilité aux infections respiratoires par rapport à des veaux non acétonémiques (Targowski et al., 1985). Un bilan énergétique négatif provoque une lipomobilisation et une augmentation de la synthèse des corps cétoniques par le foie. Il se manifeste par l'augmentation de la concentration du β -hydroxybutyrate > 1.4 mmol/L. Les mécanismes par lesquels la cétose conduit à une susceptibilité accrue aux infections sont mal connus (Kremer et al., 1993). Les relations entre le glucose, les corps cétoniques et la fonction des cellules immunitaires ont été étudiées. Klucinski et al. (1988), ont décrit chez la vache un effet inhibiteur des corps cétoniques sur l'activité phagocytaire des macrophages et des polymorphonucléaires du lait et du sang. Le métabolisme oxydatif de cellules polymorphonucléaires humaines a été inhibé *in vitro* par des concentrations sériques de β -hydroxybutyrate semblables à celles retrouvées chez les patients acétonémiques atteints de diabète (Sato et al., 1992). La fonction de prolifération *in vitro* des lymphocytes, provenant de vaches avec une acétonémie clinique est inhibée sous l'effet des corps cétoniques (Klucinski et al., 1988). Les concentrations en acétate associées à la cétose affectent la prolifération lymphocytaire *in vitro*. Par ailleurs, Nonnecke et al. (2003) ont étudié l'effet d'une ration riche en

énergie et en protéine sur les capacités fonctionnelles des leucocytes mononucléaires sanguins chez les veaux. Dans cette étude, le nombre total des leucocytes sanguins, la composition des leucocytes mononucléaires, la prolifération des lymphocytes par les mitogènes et la sécrétion des IgM n'ont pas été affectés par le changement de la ration. Cependant, les leucocytes mononucléaires des veaux traités avec la ration riche en énergie et en protéine produisent moins d'INF γ et induisent plus d'oxyde nitrique, suggérant que ce type de diète affecte la fonction leucocytaire associée avec l'immunité à médiation cellulaire.

Selon Woodward et al. (1999), l'équilibre alimentaire entre l'énergie et les protéines influencerait l'immunité à médiation cellulaire, la production des cytokines, le système du complément, la fonction phagocytaire et la concentration des IgA sécrétoires. Dans une étude antécédente, Wu et Greene (1992), ont montré que le glucose est la source d'énergie majeure pour les lymphocytes des bovins contrairement aux lymphocytes du rat qui utilisent plutôt la glutamine. À l'opposé, Perkins et al. (2001) ont démontré que la balance énergétique négative chez le bovin n'affecte pas l'expression des molécules d'adhésion CD62L, CD11b ou CD18 par les leucocytes. Elle n'affecte pas non plus l'expression des CMH classe I mais augmente légèrement l'expression des CMH classe II. Les résultats de cette recherche suggèrent que l'immunosuppression associée à la malnutrition ne semble pas altérer l'expression basale de ces protéines.

Stabel et al. (2003) ont démontré qu'une augmentation du niveau d'énergie a amélioré la réponse immunitaire chez des vaches en peripartum atteintes de la maladie de Johne ou de la paratuberculose. En effet, des vaches infectées

naturellement ont reçu des aliments correspondant à 2% de leurs poids corporel, plus des aliments refusés placés manuellement dans le rumen par le biais d'une fistule ruminale. Ces vaches ont montré une réduction de la prolifération des lymphocytes T suite à une stimulation par les mitogènes, mais une augmentation de la sécrétion *in vitro* des IgG et IgM par rapport à des vaches contrôles non infectées qui ne recevaient que des aliments correspondant à 2% de leurs poids corporel.

L'effet de la supplémentation en protéine sur le transfert passif des immunoglobulines du colostrum, pendant les 100 derniers jours de la gestation, chez des génisses de boucherie a été étudié par Blecha et al. (1981). Il n'y avait aucune corrélation significative entre la consommation de protéine brute prénatale et la concentration en immunoglobulines (IgM, IgG1 et IgG2) du sérum ou du colostrum des vaches.

L'utilisation des suppléments alimentaires qui amplifient la réponse immunitaire a suscité beaucoup d'attention, en tant que moyen non-pharmaceutique pour optimiser la compétence immunitaire (Gill et al., 2001). Mais relativement peu d'attention a été prêtée à l'utilisation des suppléments protéiques en tant qu'immunomodulateurs, bien qu'on ait cru pendant plusieurs années qu'une alimentation appropriée en protéine pouvait amplifier la compétence immunitaire (Bounous et al., 1982). Chez les humains, le lait bovin contient des protéines potentiellement utiles pour l'immunomodulation alimentaire puisque plusieurs des polypeptides des fractions de la caséine sont connus pour avoir un effet sur le système immunitaire, en forme intacte ou par le biais de biopeptides immunologiquement actifs après hydrolyse intestinale (Cross et Gill 2000). Low et al. (2003), ont identifié

des propriétés immunomodulatrices uniques des caséines du lait de vache. Après 12 semaines d'alimentation avec des protéines du lait, des souris ont montré des réponses d'anticorps intestinales nettement élevés après une sensibilisation orale à l'ovalbumine.

Par ailleurs, la relation entre les acides aminés plasmatiques et la défense contre la mammite a été peu étudiée. Des acides aminés comme la glutamine, l'arginine et le tryptophane auraient des propriétés qui influencent des composants du système immunitaire (Newsholme, 2001; Efron et Barbul, 1998; Thomas et Stocker, 1999). La glutamine est utilisée par les lymphocytes, les macrophages et les neutrophiles à un taux élevé. Pendant l'inflammation, la consommation de glutamine par les tissus et les cellules immunitaires augmente et, par conséquence, la concentration dans le sang et les muscles baisse (Newsholme, 2001). L'arginine tient une position principale dans les fonctions cellulaires et les interactions qui se produisent pendant l'inflammation et les réactions immunitaires. La concurrence entre la NO synthétase et l'arginase pour l'arginine comme substrat semble être au noyau du contrôle du processus inflammatoire (Efron et Barbul, 1998). Il a été montré que le NO est libéré pendant les mammites endotoxiques (Bouchard et al., 1999) et il a été confirmé que la production de NO dans des monocytes bovins dépend de l'arginine (Boulangier et al., 2001). Les effets du tryptophane sur les fonctions immunitaires ont été récemment passés en revue (Thomas et Stocker, 1999). Une dégradation élevée de tryptophane a été démontrée chez l'homme souffrant des maladies inflammatoires, et on a suggéré que l'épuisement de cet acide aminé pourrait être une manière de réduire la réponse immunitaire (Meyer et al., 1995; Hwu et al., 2000).

Holtenius et al. (2004), ont montré que les concentrations plasmatiques du tryptophane, de la glutamine et de l'arginine étaient significativement inférieure chez des vaches qui proviennent de troupeau avec une forte incidence de mammite comparés à des vaches provenant de troupeaux avec une faible incidence de mammite. Les résultats de cette étude suggèrent que durant l'infection bactérienne il y a un stress métabolique qui consiste en une utilisation accrue du tryptophane, de la glutamine et de l'arginine par les cellules de l'immunité ce qui explique leurs faibles concentrations sériques chez les vaches avec l'incidence annuelle élevée de mammite.

Les acides gras alimentaires peuvent influencer la réponse immunitaire par la production des cytokines et des molécules impliquées dans la régulation de la réponse immunitaire. Les omega-3 et omega-6 poly-insaturés sont des immunomodulateurs importants de la réponse immunitaire (Miles et Calder, 1998). En effet, les études chez les animaux et les humains ont prouvé que l'utilisation dans l'alimentation de l'huile végétale ou de l'huile de poissons (riches en omega-3) change la production des cytokines et les propriétés fonctionnelles des macrophages et des lymphocytes (Calder et al., 2002; Yaqoob et Calder, 1995). Une explication possible du mécanisme est liée à la synthèse des éicosanoïdes tels que les prostaglandines et les leucotriènes. L'omega-6 tel que l'acide linoléique (C18:2n6) et l'omega-3 comme l'acide linoléique (C18:3n3) mènent à la formation de l'acide arachidonique et de l'acide éicosapentaénoïque, respectivement. Les éicosanoïdes synthétisés à partir de l'acide éicosapentaénoïque n'ont pas une activité biologique aussi forte que ceux produits à partir de l'acide arachidonique (Yaqoob et Calder, 1995). En conséquence, les huiles de végétales ou de poisson riche en omega-3 diminuent généralement les

réactions inflammatoires en réduisant la production des interleukines IL-1, IL-6 et le TNF chez différentes espèces animales, y compris l'humain (Calder et Grimbale, 2002).

Chez le bovin laitier, les graines de lin, qui sont une bonne source d'omega-3, ont réduit la sécrétion de prostaglandines (PG) et amélioré la fertilité (Petit et al., 2002). Ceci suggère que les graines de lin pourraient également avoir un effet sur le système immunitaire par l'intermédiaire de la sécrétion de PG. Cependant chez la vache peu est connu sur les effets des acides gras alimentaires sur le système immunitaire humoral et cellulaire.

Lessard et al. (2003), ont montré que les acides gras alimentaires en période post-partum chez des vaches n'avait aucun effet sur la réponse anticorps après vaccination avec l'ovalbumine ou sur la production *in vitro* de l'interféron γ et de la prostaglandine E2. Leurs résultats suggèrent toutefois que les changements des acides gras, de la progestérone, et des concentrations en PGE2 dans le sérum dû au traitement alimentaire et au statut physiologique influencent l'immunité systémique en donnant une prolifération lymphocytaire réduite.

1.2. Micronutriments

1.2.1. Les vitamines

1.2.1.1. La vitamine A

La vitamine A, ou le rétinol (la forme active de vitamine A), est essentielle pour tous les vertébrés. Le rétinol ne se trouve pas dans les plantes contrairement à ses précurseurs, les caroténoïdes. Parmi ceux-ci, la β -carotène a l'activité biologique

la plus élevée comme provitamine A (Bendich, 1993). Une UI de vitamine A correspond à 0.3 µg de rétinol et 1 mg de β-carotène correspond à 400 UI de vitamine A (NRC, 2001).

Chez les bovins, la β-carotène est le précurseur principal de la vitamine A. Elle échappe à la dégradation ruminale et elle est métabolisée dans la muqueuse intestinale en rétinol, absorbée et transportée au foie (Chew, 1987; NRC, 2001). Chez des vaches laitières en peripartum, on rapporte que vitamine A joue un rôle dans la résistance aux maladies infectieuses, en particulier les mammites (NRC, 2001). Chez les bovins en particulier, de grandes quantités de β-carotène sont également absorbées sans modification, ceci pourrait indiquer que la β-carotène a également une fonction indépendante de celle d'être un précurseur de la vitamine A (Bendich, 1993; Bendich, 2004).

L'importance de la vitamine A et de la β-carotène dans la prévention des maladies infectieuses est bien documentée. La vitamine A est nécessaire pour la division et la différenciation cellulaire (Herdt et Stowe, 1991) et elle joue un rôle important dans l'inhibition de la kératinisation. Ainsi, un déficit provoquerait une kératinisation excessive de l'épithélium sécrétoire avec une susceptibilité aux infections (Reddy et Frey, 1990). Le β-carotène, et à un moindre mesure la vitamine A, a des activités antioxydantes, neutralisant les radicaux libres normalement produits pendant le métabolisme cellulaire (Bendich, 1993). En raison de ces effets, les caroténoïdes peuvent avoir une activité immunomodulatrice (Michal et al., 1994).

Les concentrations sanguines de vitamine A et de β -carotène chez la vache laitière commencent à diminuer approximativement 15 jours avant le vêlage, atteignant leurs plus bas niveau à la parturition (Johnston et Chew, 1984; Oldham et al., 1991). Cette baisse est principalement due à une consommation volontaire réduite et au transfert dans le colostrum (Weiss, 1998). Cependant, la dégradation ruminale de vitamine A peut changer selon l'alimentation. En effet, une diète riche en concentré pendant le début de la lactation, peut accentuer la dégradation ruminale de vitamine A et ce jusqu'à 67% (Rode et al., 1990; Weiss et al., 1995). Les carences en β -carotène et en vitamine A autour du vêlage ont été associées à une incidence élevée des rétentions placentaires, des métrites et des infections intra-mammaires (Johnston et Chew, 1984; Michal et al., 1994). Johnston et Chew (1984) ont constaté une réduction du comptage des cellules somatiques du lait (CCS) en début de lactation chez des vaches ayant des concentrations plasmatiques élevées en vitamine A. Cependant, d'autres études, basée sur le CCS, n'indiquent aucun effet de la supplémentation en vitamine A et en β -carotène pendant le tarissement et le début de la lactation sur la santé de la mamelle (Bindas et al., 1984; Oldham et al., 1991). Une raison possible de cette variation pourrait être due aux différences dans le statut en vitamine A et en β -carotène au début des expériences. Jukola et al. (1996) ont proposé que la supplémentation avec le β -carotène a un effet sur la santé de la mamelle seulement quand le niveau plasmatique en β -carotène est inférieur à 3.0 mg/l.

La vitamine A est nécessaire dans la synthèse du mannosyl retinyl phosphate un sucre qui est impliqué dans la synthèse des glycoprotéines (Rosso et al., 1977;

DeLuca, 1977). Une carence réduirait la synthèse de nombreuses glycoprotéines impliquées dans la réaction immunitaire notamment l'intégrine, la fibronectine et les globulines (Wolf, 1984). Le rôle de la vitamine A dans la prolifération lymphocytaire se produit probablement par l'activation du récepteur acide rétinoïque (RAR)- α . En effet, il a été montré que l'acide rétinoïque (AR) augmente l'expression mRNA des RAR- α sur les lymphocytes T (Friedman et al., 1993, Halevy et al., 1994). De plus, l'AR inhibe la synthèse d'IFN- γ au niveau de sa transcription favorisant ainsi le développement d'une réponse immunitaire type T-helper-2 (Th-2) par rapport à une réponse type Th-1 (Cantorna et al., 1995; Carman et Hayes, 1991).

Nonnecke et al. (2003), ont étudié l'effet de la supplémentation en vitamine A chez des veaux nouveaux-nés. Les animaux ont été nourris avec trois rations différentes : sans vitamine A (contrôle), avec suppléments de retinyl palmitate (équivalent de 32,000 UI de vitamine A/jour) et avec la β -carotène (équivalent de 20,000 UI de vitamine A/jour). Les populations leucocytaires des veaux qui ont reçu un complément du retinyl palmitate étaient semblables à celles d'animaux adultes plutôt qu'à celles des veaux contrôle, suggérant que la supplémentation avec le retinyl palmitate comme source de vitamine A affecte la maturation et par conséquence la compétence du système immunitaire chez le nouveau-né. Dans une autre étude, Rajaraman et al. (1998) ont évalué *in vitro* les effets des vitamines A et E sur la capacité des leucocytes mononucléaires de veaux à produire de l'oxyde nitrique (NO). Ils ont comparé les résultats avec ceux de vaches adultes n'ayant pas reçu de supplément vitaminique. Les veaux nourris avec un substitut de lait ont reçu 0, 1700, 34000, ou 68000 UI/j de retinyl acétate comme source de vitamine A et 100 UI/j de

vitamine E. Les leucocytes des veaux ayant reçu 0 et 68 000 UI ont produit *in vitro* des quantités plus élevées de NO que ceux des adultes. La forte production de NO par les leucocytes de jeunes veaux peut être typique d'un système immunitaire néonatal immature. Ceci suggère que des quantités optimales de vitamines A et E sont nécessaires dans la maturation des leucocytes en ce qui concerne la production du NO et par conséquent la compétence du système immunitaire.

1.2.1.2 La vitamine E

La vitamine E est le nom générique d'un groupe de composés liposolubles connus sous le nom de tocophérols et tocotrienols. Dans la nature, ils se présentent sous différentes formes, les α -, β -, γ - et δ - tocophérols, et les α -, β -, γ - et δ - tocotrienols (Kayden et Traber, 1993). Le α -tocophérol est le principal stéréo-isomère trouvé dans les produits alimentaires et dans le sang des animaux, représentant jusqu'à 95% de la vitamine E totale du sérum (Pehrson et Hakkarainen, 1986).

À la différence de la vitamine A, l'activité ruminale n'a aucune influence sur le métabolisme de la vitamine E (Weiss et al., 1995). La vitamine E est absorbée dans l'intestin et transportée au foie dans les chylomicrons par l'intermédiaire du système lymphatique. Ensuite seulement le α -tocophérol apparaît préférentiellement dans le plasma, tandis que les β -, γ - et δ -tocophérol sont sécrétés dans la bile (Drevon, 1991).

Une UI de la vitamine E est égale à 1 mg d'acétate de α -tocophéryl, alors que 1 mg de α -tocophérol est égal à 1.49 UI de la vitamine E (NRC, 2001). Ces facteurs de conversion sont basés sur des études chez des animaux de laboratoire, et aucune étude n'a été faite pour confirmer si ces valeurs sont représentatives également chez

les ruminants. Les résultats des épreuves chez l'homme, le porc et le bovin comparant l'effet de l'administration des formes normales et synthétiques de la vitamine E indiquent que la disponibilité biologique du α -tocophérol est presque deux fois celle de la vitamine E synthétique (Hidirolou et al., 1988; Burton et al., 1998; Lauridsen et al., 2002).

Le rôle le plus connu de la vitamine E en santé animal est celui d'antioxydant biologique des membranes de cellules mammifères, assurant la protection contre les radicaux libres (Bendich, 1993; Brigelius-Flohé et Traber, 1999). La vitamine E, aussi bien que le Se, ont des rôles importants et complémentaires dans la prévention des dommages oxydatifs. La molécule de α -tocophérol est en liaison avec les membranes cellulaires, et attire les acides gras polyinsaturés (PUFA) avec lesquels elle forme les complexes chimiques qui vont être métabolisés pendant la respiration de cellules (Putnam et Comben, 1987). Les PUFA sont instables et facilement attaqués par les radicaux libres. Le α -tocophérol agit en tant que neutralisateur des radicaux libres, empêchant la production d'hydroperoxyde (Putman et Comben, 1987; Bendich, 1993). La vitamine E module également la synthèse de l'acide arachidonique et de ses métabolites, les prostaglandines et le thromboxanes (McDowell et al., 1996) qui sont importants dans la fonction des neutrophiles et dans l'amplification de la réponse inflammatoire après invasion par des microbes pathogènes (Smith et al., 1997).

La supplémentation avec vitamine E chez des vaches en lactation (Hogan et al., 1990) et des jeunes veaux nourris avec un substitut de lait est associée à une activité bactéricide élevée des neutrophiles (Eicher et al., 1994). Encore chez des

jeunes veaux, la supplémentation avec la vitamine E a augmenté la réponse blastogénique des lymphocytes suite à une stimulation avec la PHA (Reddy et al., 1986). Des concentrations élevées (1000 ou 2000 mg/d) de vitamine E dans les suppléments alimentaires donnés à des taurillons ont également augmenté la réponse des lymphocytes à la stimulation de la Concanavalin A (Con A) (Garber et al., 1996). La supplémentation avec la vitamine E a augmenté la réponse cutanée de l'hypersensibilité type IV, la prolifération de lymphocyte et la production IL-2 après stimulation avec des mitogènes et a amélioré les réponses anticorps aux vaccins, tout en diminuant la synthèse de l'éicosanoïde immunosuppresseur PGE2 (Meydani et al., 1990, Meydani et al., 1997). De même, alimenter des vieux rats avec la vitamine E a réduit l'affaiblissement relatif à l'âge de la production IL-2 et de la prolifération des lymphocytes (Sakai et Moriguchi, 1997). Chez les humains, donner la vitamine E à des individus en bonne santé augmente le rapport CD4/CD8, la prolifération des cellules T, et réduit le dommage oxydatif (Lee et al., 2000). En outre, la vitamine E influence la maturation des lymphocytes T, probablement en stabilisant les membranes et en augmentant la capacité des cellules présentatrices de l'antigène à exprimer la molécule d'adhésion intercellulaire ICAM-1 (Moriguchi et al., 1997).

1.2.2 Le sélénium

Le sélénium est un oligoélément essentiel dont la différence entre le taux pour combler les besoins alimentaires et celui de la toxicité est réduite comparativement aux autres oligoéléments. Les humains et les animaux ont besoin du sélénium pour assurer l'activité d'un certain nombre d'enzymes sélénium-dépendantes ou sélénoprotéines comme par exemple la glutathion peroxydase (GSH-px) (Burk et

Levander, 1999; NRC, 2001). Le sélénium est un composant de la iodothyronine-5'-diiodinase type I, l'enzyme qui convertie l'hormone T4 à T3 (Berry et Larsen, 1992). La carence en sélénium est à l'origine de plusieurs conditions pathologiques dont une myopathie dépigmentaire qui touche les bovins et les petits ruminants (NRC, 2001), la rétention placentaire, les kystes ovariens et l'œdème de la mamelle chez la vache (Harrison et al., 1984; Miller et al., 1993).

Chez les bovins l'apport alimentaire recommandé en Se varie de 0.1 à 0.3 mg/Kg MS, mais seulement 40% de Se administré oralement est absorbé (Harrison et Conrad 1984). Cependant, les sources organiques de Se, telles que les levures enrichies en Se et les aliments avec des concentrations élevées en Se, augmentent habituellement la teneur sanguine et des tissus en Se par rapport à des sources inorganiques (NRC, 2001). Le rumen avec sa forte capacité de réduction, permet la conversion des sélénates en Se élémentaire le rendant biologiquement non disponible (Van Saun, 1990). Une ration riche en hydrates de carbone facilement fermentescibles, favorise la réduction ruminale du Se (Gerloff, 1992). De plus, un apport important en soufre (S) peut diminuer la digestibilité du Se (Ivancic et Weiss, 2001) en réduisant le pH ruminal, avec comme conséquence la conversion du Se disponible en formes non disponibles, ou encore en réduisant l'incorporation du Se dans les structures moléculaire des bactéries ruminales (Cummings et al., 1995; Van Ryssen et al., 1998). L'absorption du Se se produit principalement dans le duodénum mais de petite quantité peuvent être absorbées au niveau le rumen et l'abomasum (Wright et Bell, 1966).

La concentration sérique du Se reflète son statut alimentaire et elle est sensible aux changements à court terme du Se de la ration (Ullrey, 1987). En revanche, le Se du sang total représente principalement l'apport alimentaire des 30 à 60 jours précédents, car le Se est incorporé à la GSH-px dans les globules rouges au cours du processus de l'érythropoïèse (Gerloff, 1992; Underwood et Suttle, 1999). Étant un constituant de la GSH-px, le Se joue un rôle d'antioxydant cytosolique empêchant les dommages oxydatifs par les radicaux libres (Reddy et Frey, 1990; Underwood et Suttle, 1999). Le Se est particulièrement important pour les cellules phagocytaires, il prévient les processus d'auto-oxydations au cours des très fortes activités microbicides et métaboliques liées aux fonctions biologiques de ces types cellulaires (Larsen, 1993).

La carence en Se a un effet négatif sur les fonctions de neutrophiles chez les bovins, soit la migration, la phagocytose, l'activité microbicide intracellulaire et la production des facteurs chimiotactiques comme le leucotriène B4 (Boyne et Arthur, 1979; Aziz et al., 1984, Gyang et al., 1984; Aziz et Klesius, 1986). Cao et al. (1992) ont rapporté que la carence en Se chez le bovin laitier explique une réduction de la réponses proliférative des lymphocytes après stimulation avec la Con A. Ils ont suggéré que cette altération pourrait être liée à un changement de l'activité de la 5-lipo-oxygenase., une enzyme de la voie d'oxydation de l'acide arachidonique des lymphocytes. Une fois stimulés, les lymphocytes issus de vaches carencées en Se ont donné moins de produits d'oxydation d'acide arachidonique, spécifiquement l'acide 5-hydroxyeicosatetraenoic et le leucotriène B4. Chez les ovins, la carence en Se peut compromettre la réponses proliférative des lymphocytes après stimulation avec les mitogènes (Turner et al., 1985), et la supplémentation *in vitro* de lymphocytes de

bovin avec le Se a augmenté la production d'IgM (Stabel et al., 1991). Cependant, des teneurs élevés de Se sanguin, au-dessus de 0.5 mg/l, peuvent avoir des effets secondaires négatifs sur le système immunitaire (Larsen et al., 1988a; Larsen et al., 1988b).

1.2.3 Le cuivre :

Le Cu est un oligoélément essentiel qui se trouve dans le corps sous deux formes, cuivreux (Cu^+) et cuprique (Cu^{++}). La capacité du Cu à accepter et donner facilement des électrons explique son rôle important dans des réactions d'oxydation/réduction (redox) et la neutralisation des radicaux libres (Linder et al., 1996; Turnlund et al., 1999).

Le Cu est absorbé au niveau de l'intestin par deux mécanismes, un saturable (transport actif) et l'autre insaturable (diffusion simple) (Bronner et Yost, 1985). Dans des conditions alimentaires normales, on pense que la majorité du Cu est absorbée par l'intermédiaire du transport actif tandis que la diffusion se produit quand les concentrations élevées de Cu sont présentes. Dans les cellules de la muqueuse, le transfert du Cu vers la circulation portale est en partie réglé par des concentrations intracellulaires de métallothionéine (Cousins, 1985). On a rapporté que des niveaux élevés de molybdate, de sulfate, de phytate, d'acide ascorbique, de zinc, et de cadmium réduisent tous la disponibilité biologique du Cu alimentaire (Mason, 1979; Cousins, 1985). L'absorption de Cu est plus élevée chez le nouveau-né que chez l'adulte (Lonnerdal et al., 1985).

Le Cu joue un rôle biochimique important à plusieurs niveaux. C'est un cofacteur de nombreuses réactions d'oxydoréduction impliquant l'oxygène moléculaire. Les enzymes concernés au premier plan par le Cu sont :

- La superoxyde dismutase, enzyme à Zn et Cu, qui protège les érythrocytes, les cellules du foie, du cerveau et de la peau des effets toxiques des radicaux libres et de la peroxydation lipidique.
- La cytochrome oxydase qui est un maillon de la chaîne respiratoire cellulaire.
- La tyrosinase cutanée impliquée dans la synthèse de la mélanine.
- La céruloplasmine qui, en plus de son rôle de transport du Cu, présente une activité ferroxidase importante (maintien du Fe à l'état 3+) et peut de plus fonctionner comme une histaminase (dégradation de l'histamine) et participer au contrôle des réactions allergiques.
- La lxyloxydase impliquée dans le processus de maturation des réseaux de collagène et d'élastine
- L'histaminase impliquée dans la dégradation de l'histamine qui a un rôle de neurotransmetteur en plus de son implication dans la réaction allergique.
- La dopamine-bêta-hydroxylase qui catalyse la transformation de dopamine en noradrénaline.

Ceci explique la participation du Cu, avec le Zn, dans le contrôle des réactions inflammatoires et allergiques, notamment au niveau cutané et explique l'action connue de longue date du Cu et du Zn en application locale dans les réactions inflammatoires cutanées ainsi que dans les infections (Kleczkowski et al., 2003).

La carence en Cu chez les ruminants est généralement provoquée par les antagonistes présents dans le fourrage qui réduisent l'absorption du Cu. Les concentrations alimentaires élevées de Mo, de S et de Fe réduisent la charge corporelle en Cu chez les ruminants (Suttle, 1991). Les besoins alimentaires du bovin laitier en Cu varie en 12 et 15.7 mg/Kg de MS selon le poids de l'animal, le stade de la lactation et la production laitière. Ces besoins changent selon le S et le Mo présents dans la ration (NRC, 2001).

L'étude du rôle du Cu dans la réponse immunitaire et la résistance aux maladies est complexe en raison des nombreuses interactions qui se produisent entre le Cu et d'autres minéraux. Dans plusieurs études sur l'immunité, la carence en Cu a été induite en alimentant les animaux avec des concentrations élevées de Mo ou de Fe. Dans ces études, il était impossible de séparer les effets de la carence en Cu des effets directs possibles du Mo ou de Fe alimentaire sur des composantes immunitaires.

Les neutrophiles isolés chez des veaux nourris avec une ration carencée en Cu, présentaient une réduction dans leur faculté à tuer les *Candida albicans* ingérés, en comparaison avec des veaux recevant une alimentation en Cu équilibrée (Boyne et Arthur, 1981). Le même résultat a été constaté suite à une carence indirecte en Cu, provoquée en alimentant des vaches avec 5 mg Mo ou 500 mg disponibles/kg (Boyne et Arthur, 1986).

Un certain nombre d'études chez les rats et les souris a indiqué que l'immunité à médiation cellulaire et humorale est considérablement diminuée suite à une carence

en Cu (Prohaska et Failla, 1993). Cependant, les études chez le bovin n'ont pas montré d'effets constants de la carence en Cu sur la réponse immunitaire cellulaire ou humorale. Chez les veaux, une carence en Cu (veaux alimentés avec une ration contenant 1 mg Cu/kg) n'a pas affecté la blastogenèse *in vitro* des lymphocytes induite par les mitogènes (Stabel et al., 1993; Ward et al., 1997). Dans ces deux études, la concentration du Cu dans le plasma était < 0.3 mg/l et dans le foie < 10 mg/kg MS au moment des analyses blastogéniques. En outre, l'addition 5 mg Mo/kg pour produire une insuffisance grave en Cu n'a pas réduit la réponse blastogénique des lymphocytes à PHA ou au PWM (Ward et al., 1997). Cependant, dans une étude récente chez de jeunes veaux, la carence en Cu a été associée à une prolifération réduite des lymphocytes T en présence de PHA ou de Con A (Wright et al., 2000). L'immunité cellulaire *in vivo*, évaluée en mesurant la réponse à une injection intradermique de PHA, était plus élevée chez des veaux recevant un complément de 10 mg Cu/kg comparé à celle de veaux nourris avec une ration carencée en Cu (1.1 mg Cu/kg) pendant 126 jours (Ward et al., 1997).

Peu de recherche suggère que le Cu alimentaire pourrait affecter la production de cytokine chez le bovin. Les cellules mononucléaires de vaches laitières recevant un niveau marginal de Cu (régime de 6-7 mg/kg) ont produit moins d'IFN- γ une fois stimulées avec la Con A par rapport à des vaches recevant une ration équilibrée en Cu (régime de 10-15 mg/kg) (Torre et al., 1995). La production d'IL-2 par les cellules mononucléaires n'a pas été affectée par le Cu dans cette étude. Par ailleurs, la production monocytaire de TNF- α et IL-1 était basse chez des veaux nourris avec une

ration carencée en Cu et complétée avec 5 mg de Mo/kg comparée à celle de veaux recevant une ration équilibrée en Cu (Gengelbach et al., 1997).

De son côté, la réponse humorale (IgM et IgG) après une première inoculation avec des érythrocytes porcins, a été significativement inférieure chez des veaux alimentés avec une ration carencée en Cu (1.1 mg Cu/kg) comparé à des veaux recevant 10 mg Cu/kg (Gengelbach et Spears, 1998). Dans une autre étude, l'addition de 5 mg Cu/kg à une ration marginalement déficiente en Cu (5 mg/kg) a augmenté la réponse anticorps contre d'ovalbumine chez des veaux en croissance (Ward et Spears, 1999).

Dans deux études, Cerone et al. (2000) ont testé l'activité de plusieurs cuproenzymes dans le sérum et les cellules immunitaires (lymphocytes, neutrophiles, et macrophages) chez des vaches ayant une carence en Cu causée par une supplémentation avec le Mo. Les animaux ont reçu 30 ppm de Mo pour induire une carence secondaire en Cu. Chez les animaux carencés en Cu, l'activité de la céruloplasmine sérique a diminué de moitié par rapport au contrôle. Les activités de la Cu-Zn superoxyde dismutase et de la cytochrome c oxydase des leucocytes ont subi une réduction significative. La carence en Cu est donc un facteur qui peut affecter l'activité de plusieurs enzymes qui assurent la défense antioxydante et la formation de l'ATP. Par conséquent, la carence en Cu peut compromettre le fonctionnement normal des cellules immunitaires, réduisant la capacité bactéricide et rendant les animaux plus susceptibles à l'infection.

1.2.4 Le Fer

Le Fe est un élément principal dans le métabolisme de presque toute la matière organique. Chez l'homme, le Fe est un composant essentiel d'une centaine de protéines et d'enzymes (Fairbanks, 1999; Beard et al., 1997).

Fonction :

- Transport et stockage de l'oxygène :

L'hème est un composé contenant du Fe qu'on trouve dans un certain nombre de molécules biologiquement importantes. L'hémoglobine et la myoglobine contiennent l'hème, et elles sont des protéines impliquées dans le transport et le stockage de l'oxygène. L'hémoglobine est la protéine primaire trouvée dans les globules rouges et elle contient environ les 2/3 du Fe du corps. Le rôle essentiel de l'hémoglobine, qui est de transporter l'oxygène des poumons aux tissus, est dérivé de sa capacité unique d'acquérir l'oxygène rapidement pendant le court temps qu'il passe en contact avec les poumons et de libérer l'oxygène nécessaire aux tissus lors de sa circulation dans le sang. La myoglobine est impliquée dans le transport et l'entreposage à court terme de l'oxygène dans les cellules musculaires, approvisionnant les muscles en oxygène à la demande (Yip et al., 1996; Brody, 1999).

- Transport d'électrons et métabolisme énergétique :

Les cytochromes contiennent l'hème et sont essentiels pour la production énergétique cellulaire et donc pour la vie, par leurs rôles dans le transport mitochondrial d'électrons. Ils servent de porteurs d'électrons pendant la synthèse du triphosphate d'adénosine (ATP), le composé primaire de stockage d'énergie dans les

cellules. Les autres enzymes qui contiennent le Fe comme la déshydrogénase (NADH) et le succinate déshydrogénase, sont également essentielles pour le métabolisme énergétique. Le cytochrome P-450 est une famille de cytochromes qui fonctionnent dans le métabolisme d'un certain nombre de molécules biologiques importantes, aussi bien que la désintoxication et le métabolisme des drogues et des polluants (Yip et al., 1996).

- Fonctions anti-oxydante et pro-oxydante bénéfique :

La catalase et la peroxydase sont des enzymes qui contiennent l'hème qui les protègent contre l'accumulation du peroxyde d'hydrogène en le convertissant en eau et en oxygène. En tant qu'élément de la réponse immunitaire, les leucocytes phagocytaires tuent les bactéries en les exposant aux oxydants. La synthèse d'un tel oxydant, acide hypochloreux, par les neutrophiles est catalysée par la myéloperoxydase, une enzyme contenant aussi l'hème (Yip et al., 1996; Brody, 1999).

- Synthèse d'ADN :

La ribonucléotide réductase est une enzyme dépendante du Fe qui est nécessaire pour la synthèse d'ADN (Fairbanks, 1999; Brody, 1999).

Ainsi, le Fe est nécessaire pour un certain nombre de fonctions essentielles, y compris la croissance, la reproduction et la fonction immunitaire.

Le Fe dans le plasma est lié dans l'état ferrique (Fe^{+++}) à une protéine spécifique appelée la transferrine. La transferrine est le porteur du Fe dans le sang et est saturée seulement à 30-60% de sa capacité à lier le Fe (Kaneko, 1997).

Chez la majorité des espèces, les bovins entre autres, le duodénum est le lieu d'absorption principal du Fe. Cependant, seulement 5% à 10% du Fe consommé est absorbé et seulement s'il est à l'état ferreux (Fe^{++}). Une fois absorbé, le corps retient le Fe pour sa réutilisation. Par exemple, la majeure partie du Fe libéré après la mort des globules rouges est employée dans la synthèse de nouvelle hémoglobine (Kaneko, 1997). Les besoins alimentaires du bovin laitier en Fe varient entre 12 et 50 mg/Kg de MS selon le poids de l'animal, le stade de la lactation et la production laitière (NRC, 2001).

Chez le bovin adulte, une carence en Fe se produit rarement à moins qu'il n'y ait une perte de sang provoquée par une infection ou une maladie parasitaire. La carence en Fe provoque une anémie, une réduction du gain de poids, une nonchalance, une respiration laborieuse après peu d'exercice, un appétit réduit, une faible résistance aux infections et une couleur pâle évidente des muqueuses et du muscle (Reid 1993; Hidiroglou 1992).

Il est bien documenté que le Fe règle la fonction des lymphocytes T, et dans la plupart des études (*in vivo* et *in vitro*), une carence provoque une baisse de l'immunité à médiation cellulaire (Beard, 2001; Oppenheimer 2001; Kuvibidila et al., 2001; Walker et Walker, 2000). Les cellules immunitaires diffèrent dans leur capacité de synthèse et d'utilisation des protéines porteurs du Fe et dans la quantité de Fe qu'elles utilisent et stockent, ceci suggère que le Fe peut avoir des effets différents selon les fonctions immunitaires (Kemp, 1993).

Une carence modérée en Fe donne une réponse proliférative normale des lymphocytes T aux mitogènes et a un effet limité sur d'autres fonctions immunitaires chez l'homme et les animaux (Beard, 2001). Ceci suggère que la réponse immunitaire n'est pas altérée par des changements de disponibilité du Fe. En effet, les lymphocytes comblent leurs besoins en Fe pendant la prolifération en augmentant la synthèse et l'expression des récepteurs extérieurs de transferrine (Seligman et al., 1992). Les données cliniques et expérimentales montrent que les cellules T peuvent séquestrer le Fe mieux que d'autres cellules quand le Fe est limité, et c'est seulement dans les cas de carence sévère que l'effet sur les lymphocytes T est évident. L'immunité humorale est moins affectée par la carence en Fe que l'immunité cellulaire, car la production d'anticorps après immunisation a été préservée chez la plupart des animaux et des humains avec un statut faible en Fe (Beard, 2001, Oppenheimer 2001). Par contre, la fonction neutrophilique (activité bactéricide et myéloperoxydase) et l'activité des cellules Natural Killer (NK) sont altérées avec une carence en Fe (Oppenheimer 2001). Il a été suggéré que le rôle d'immunosurveillance des macrophages peut être dû en partie à la modulation du statut en Fe cellulaire (Weinberg 1992). À la différence des autres cellules, les macrophages acquièrent le Fe pour l'usage métabolique par l'intermédiaire de la phagocytose des érythrocytes, qui est plus tard déversé dans la circulation, où il est lié à la transferrine pour être disponible aux autres cellules (Beard, 2001, Brock, 2000). Cette séquestration de Fe dans les macrophages peut être bénéfique pendant l'infection, parce qu'elle limiterait la disponibilité le Fe aux micro-organismes (en particulier micro-organismes intracellulaires) cependant, elle limiterait également la disponibilité du Fe aux cellules immunitaires (Oppenheimer, 2001; Brock, 2000; Patruta et Horl, 1999).

Les mécanismes moléculaires et cellulaires responsables des changements immunitaires pendant la carence en Fe sont complexes et demeurent peu clairs, parce que le Fe est impliqué dans plusieurs voies métaboliques des cellules de l'immunité. Dans une étude, Gygax et al. (1993), ont étudié l'effet du Fe sur la fonction immunitaire chez des veaux nourris avec un lait de remplacement contenant 10 ou 50 mg Fe/kg. L'incidence des pneumonies, l'hyperthermie et le traitement aux antibiotiques étaient significativement élevés chez les veaux nourris avec 10 mg Fe/kg par rapport à ceux nourris avec 50 mg Fe/kg. L'immunité à médiation cellulaire (mesurée par la réaction d'hypersensibilité cutanée au dinitrofluorobenzène), le nombre de neutrophiles et leur capacité phagocytaire, l'activité de la myéloperoxydase, la concentration en IgG sérique et nombre des lymphocytes B (mesuré dans des noeuds lymphatiques superficiels cervicaux) des veaux nourris avec 10 mg Fe/kg ont été significativement réduits en comparaison avec ceux recevant 50 mg Fe/kg. Les chercheurs ont conclu qu'une carence grave en Fe peut causer une incidence importante aux infections en raison de l'effet du Fe sur la réponse immunitaires humorale et cellulaire.

1.2.5 Le zinc

Des aspects nombreux du métabolisme cellulaire sont dépendants du Zn. Le Zn joue un rôle important dans la croissance et le développement, la réponse immunitaire, les fonctions neurologiques et la reproduction. Une perturbation de la disponibilité du Zn va affecter à tous les échelons du maintien de l'homéostasie. Le Zn intervient depuis le maintien de la structure de la double hélice d'ADN jusqu'à la synthèse des molécules les plus diverses. Au niveau cellulaire, la fonction du Zn peut

être divisée en trois catégories catalytique, structurale et de normalisation (Cousins, 1996).

1-Catalytique : Presque 100 enzymes différentes dépendent du Zn pour leurs effets catalytiques et leurs réactions chimiques essentielles. Les enzymes dépendantes du Zn peuvent être trouvées dans toutes les classes connues des enzymes (King et al., 1999).

2- Structurale : Le Zn joue un rôle important dans la structure des protéines et des membranes cellulaires. Par exemple, le Cu fournit l'activité catalytique pour l'enzyme superoxyde dismutase (CuZnSOD), alors que le Zn joue un rôle structural critique (King et al., 1999; O'Dell, 2000). La perte de Zn des membranes biologiques augmente leur susceptibilité aux dommages oxydants et altère leurs fonctions (O'Dell, 2000).

3- De normalisation : Des protéines associées au Zn se sont avérées des régulateurs de l'expression génétique agissant en tant que facteurs de transcription (se liant à l'ADN et influençant la transcription de gènes spécifiques). Le Zn joue un rôle également dans la communication cellulaire et influence la sécrétion hormonale et la transmission de l'influx nerveux. Récemment la carence en Zn s'est avéré jouer un rôle important dans l'apoptose chez les animaux et les humains (Truong-Tran, 2000).

Le Zn est absorbé dans le petit intestin (Suttle et al., 1982; NRC, 2001), mais l'absorption est influencée par la teneur en Zn de la ration. Deux protéines se concurrencent pour le transport du Zn, la CRIP (cysteine rich intestinal protein) et la métallothionéine. La CRIP transporte le Zn à travers l'entérocyte pour le libérer au niveau du sang où il sera lié à la transferrine et l'albumine. Par contre le Zn qui se lie

à la métallothionéine reste dans l'entérocyte et sera évacué dans les fèces après la mort de l'entérocyte (NRC, 2001). La composition chimique de la source de Zn peut également influencer son absorption. L'absorption est plus élevée chez des animaux supplémentés avec des formes organiques du Zn, telles que la Zn-méthionine et la Zn-lysine, que chez les animaux supplémentés avec des sources inorganiques, comme l'oxyde de Zn et le sulfate de Zn (Rojas et al., 1995; Kincaid et al., 1997). Comme processus physiologique normal, le niveau de Zn sanguin diminue autour du vêlage (Goff et Stabel 1990) en raison d'une CVMS réduite et du transfert du Zn dans le colostrum. Les facteurs de stress tels que la parturition et les infections microbiennes diminuent les concentrations en Zn sanguin dues à la redistribution du Zn du sang aux tissus, particulièrement au foie (Spears et al., 1991; Underwood et Suttle, 1999).

Les besoins alimentaires du bovin laitier en Zn varient entre 22.8 et 33 mg/Kg de MS selon le poids de l'animal, le stade de la lactation et la production laitière. Ces quantités peuvent changer selon les concentrations de Cu, de Cd et de Ca de la ration (NRC, 2001).

La recherche chez les humains et les animaux de laboratoire a indiqué que la carence en Zn affecte le système immunitaire et la résistance aux maladies (Chesters, 1997). Chez les bovins étonnamment peu de recherche a été effectuée pour examiner le rapport entre le Zn alimentaire et la fonction immunitaire. Cependant, chez des veaux en croissance, l'addition de 25 mg de Zn/kg à une ration contrôle de 33 mg Zn/kg n'a pas augmenté la réponse lymphocytaire *in vitro* à la stimulation par PHA ou PWM, la réponse cellulaire *in vivo* à l'administration intradermique de PHA ou la réponse d'anticorps après la vaccination contre l'IBRV. Chez les jeunes veaux,

l'addition de 150 ou 300 mg Zn/kg à une ration de base contenant 65 mg Zn/kg n'a pas affecté la blastogenèse induite par les mitogènes, la cytotoxicité et la production IL-2 par des lymphocytes, ou encore l'activité phagocytaire et bactéricide des neutrophiles (Kincaid et al., 1997). Encore chez de jeunes veaux, l'addition de 150 ou 300 mg Zn/kg à une ration de base contenant 65 mg Zn/kg n'a pas affecté la blastogenèse induite par les mitogènes, la cytotoxicité et la production IL-2 par des lymphocytes, ou encore l'activité phagocytaire et bactéricide des neutrophiles (Kincaid et al., 1997). Pourtant, une maladie génétique, lethal trait A46, induisant une réduction importante de l'absorption du Zn, provoque une atrophie du thymus et une prolifération réduite des lymphocytes à la stimulation par des mitogènes (Perryman et al., 1989). En outre, pendant la mammite à *Escherichia coli*, la concentration sanguine du Zn diminue, suggérant un mécanisme antibactérien qui rend le Zn moins disponible pour la croissance bactérienne (Erskine et Bartlett, 1993).

Malgré que l'effets de la carence en Zn sur la fonction immunitaire chez les bovins n'est pas évident, on a suggéré que l'augmentation du niveau de Zn alimentaire de 30 à 100 mg/kg a légèrement réduit la morbidité des maladies respiratoires due aux stress du transport chez les veaux (Galyean et al., 1995). De même, L'addition du Zn sous forme de Zn-méthionine à une ration de base contenant approximativement 30 mg de Zn/kg réduit la température rectale et augmente la prise alimentaire chez des veaux inoculés avec IBRV (Chirase et al., 1991).

1.3. Le pH

L'importance de l'homéostasie acido-basique dans l'entretien des réponses cellulaires normales et de l'intégrité physiologique a été longtemps discutée.

Beaucoup de réponses cellulaires sont diminuées avec un pH extracellulaire bas, y compris les activités enzymatiques du cytosol et de la membrane, l'activité de transport d'ion dont le Ca, la synthèse des protéines, d'ADN et d'AMPc. L'activité des enzymes hydrolytiques, qui sont libérées dans le milieu extracellulaire pendant l'activation des cellules, s'est également avérées sensibles au pH (DeChatelet, 1979; Busa et Nuccitelli, 1984).

À propos du système immunitaire, des changements du micro-environnement aux emplacements de l'infection et de l'inflammation ont été étudiés depuis les années 40 (Menkin, 1956; Rotstein et al., 1987). Par exemple, une caractéristique du lieu inflammatoire est une acidose locale, qui est attribuée à l'augmentation locale de la production de l'acide lactique par l'activité anaérobie et glycolytique des neutrophiles infiltrant et à la présence d'acides gras à courte chaîne qui sont des produits du métabolisme bactérien (Grinstein et al., 1991). Le fluide interstitiel des tumeurs et des abcès également a montré des valeurs de pH inférieur à 6.0, plus bas de 0.2- 0.6 unité par rapport au pH extracellulaire des tissus normaux (Kraus et al., 1996). On a suggéré que les microenvironnements acides peuvent inhiber la fonction immunitaire dans certaines conditions respiratoires telles que la fibrose kystique (Bidani et al., 1988) et pendant la croissance et la métastase néoplasiques (Kraus et al., 1996, Helmlinger et al., 1997). Par conséquent, il y a relativement peu d'études sur l'effet du pH extracellulaire sur les cellules immunitaires et leur fonction.

En revanche, le rôle du pH intracellulaire dans le règlement de diverses activités cellulaires a été bien étudié. Par exemple, une augmentation du pH cytosolique est responsable de l'augmentation de la synthèse d'ADN et de protéine, du

métabolisme des oocytes pendant la fertilisation, et de la prolifération et de la mitose de cellules en général (Mahnensmith et al., 1985). En outre, certaines activités des neutrophiles et des lymphocytes ont été liées à l'alcalinisation cytoplasmique (Gerson et Kiefer, 1983; Naccache et al., 1977)

L'entretien d'un pH intracellulaire au repos de 6.8 -7.3 et des changements du pH intracellulaire accompagnant les événements cellulaires sont considérés comme étant principalement le résultat d'une perte énergétique et d'une activation de la pompe à protons (Mahnensmith et al., 1985). Un mécanisme important de l'échange membranaire actif de H^+ dans plusieurs cellules est l'échangeur Na^+/H^+ (NHE-1) qui catalyse l'échange du sodium pour l'hydrogène (Mahnensmith et al., 1985; Noel et al., 1995). Cet échangeur Na^+/H^+ constitue une forme de transport secondaire et active, dépendant du gradient Na^+ extracellulaire fourni par la pompe primaire Na^+/K^+ ATPase pour expulser un ion d'hydrogène du cytosol en échange de l'entrée d'un Na^+ (Mahnensmith et al., 1985).

Des études chez les humains montrent que le pH acide altère la structure tertiaire des protéines C5 et C6 impliquées dans la voie classique du complément (Hammer et al., 1983). Par contre, un pH acide permet à la voie alternative du complément une lyse plus importante des globules rouges chez le mouton (Fishelson et al., 1987).

Des sérums d'individus tuberculeux traités à l'acide entraînent une augmentation significative du titre anticorps contre *Mycoplasma tuberculosis* et une grande affinité à lier l'antigène (Udaykumar, 1992). Et ceci parce que les récepteurs

Fc des IgG ont une plus grande affinité à un pH acide de 6-6.5 (Raghavan et al., 1995). Lopez et al. (1999) ont montré qu'un pH acide permet une grande affinité des IgG humains pour lier les neutrophiles, monocytes et cellules NK. Certaines études ont montré qu'un pH acide peut réduire la production du superoxyde et du TNF α par les macrophages (Nakagawara et al., 1981; Baud et al., 1997).

En raison de la fréquence de la cétose clinique chez les bovins, il y a un certain nombre d'études sur l'effet des acides cétoniques sur la fonction des lymphocytes bovins. Sato et al. (1995) ont montré une inhibition de la prolifération des lymphocytes en présence des concentrations variables de corps cétoniques. La prolifération des lymphocytes en réponse à PHA de vaches ou de veaux avec une cétose a une valeur sensiblement plus basse d'indice de consommation de glucose comparée aux animaux sains (Targowski et al., 1985; Sato et al., 1995). Cependant, une étude a prouvé que des concentrations élevées en butyrate ont empêché la prolifération lymphocytaire (Franklin et al., 1991). De même, Kandefér-Szerszen et al. (1992) ont trouvé une corrélation négative entre la concentration en acides cétoniques sanguins chez les vaches et la production, *in vitro*, d'INF γ par les leucocytes après une stimulation avec PHA, Con A et le virus de la maladie de NewCastle. D'autres études sur l'effet de l'acidose et de l'alcalose sur la production d'interférons sont nécessaires pour supporter ces conclusions.

1.4 Le profil métabolique (PM)

Le PM se base sur l'utilisation d'une batterie d'analyses sanguines pour surveiller l'état métabolique du troupeau, pour aider dans le diagnostic des maladies nutritionnelles et métaboliques subcliniques et pour identifier les vaches

métaboliquement supérieures (Van Saun, 1997). Les modalités de réalisation d'un PM impliquent l'échantillonnage de 5 à 7 animaux par groupe bien défini de production. Les échantillons sanguins sont centrifugés et les sérums sont utilisés pour l'analyse de différents paramètres biochimiques (Ingraham et Kappel, 1988). L'automatisation des analyses de laboratoire et la facilité de prendre des échantillons sanguins ont rendu le PM facilement réalisable par les cliniciens. On note cependant, un certain nombre de contraintes, comme par exemple le choix des animaux, les paramètres biochimiques à effectuer, les actions régulatrices des mécanismes homéostatiques et la difficulté liée à interpréter les résultats (Herdt, 2000).

L'utilisation du PM sur toutes les fermes et toutes les vaches n'est pas justifiée et il aura comme conséquence un impact économique sur le coût de production, une valeur prédictive faible voir même erronée dans certains cas. Le PM est un outil efficace lorsqu'il fait parti d'un objectif spécifique dans le programme de contrôle des maladies métaboliques du troupeau (Adams et al., 1978). L'évaluation de l'état nutritionnel ou métabolique d'un groupe de bovins devient nécessaire pour évaluer l'efficacité de la digestion et de l'assimilation des nutriments sur l'équilibre métabolique des vaches au cours des périodes de tarissement, peripartum et au pic de la lactation (Jones et al., 1982). Enfin, le PM est très souvent employé avec d'autres procédures appropriées, soit des examens cliniques de l'état corporel des vaches, de la qualité du fumier et l'évaluation de qualité de la ration, du programme et de la régie alimentaire.

Le PM permet une évaluation de l'état de plusieurs équilibres métaboliques :

- Évaluation du bilan énergétique :

L'état de l'équilibre énergétique est de loin le facteur alimentaire le plus critiques ayant un impact sur la santé, la lactation et la reproduction des animaux (Cameron et al., 1998). Traditionnellement les changements du bilan énergétique étaient évalués par l'intermédiaire des variations du poids corporel et de l'état de chair. Ce procédé est peu sensible surtout quand il s'agit de vache en transition. Les paramètres utiles dans l'évaluation du statut énergétique sont le glucose, le bêta-hydroxybutyrate (BHB) et les acides gras libres (AGL). La valeur du glucose sérique peut renseigner sur l'apport énergétique de la ration, principalement sur la quantité de précurseur du glucose produit par la biomasse ruminale. Le BHB, un corps cétonique, est associé à un bilan énergétique négatif et sa valeur sérique indique une forte production par le foie. Cependant la concentration sérique du BHB peut être influencé par des sources alimentaires ou par une plus forte production ruminale. C'est la mesure des AGL qui donne une bonne estimation du bilan énergétique et elle est fortement corrélée à celle de la lipomobilisation (Dyk et al., 1995).

- Évaluation des protéines :

L'évaluation du statut protéique d'un groupe de bovins est plus difficile que celle du bilan énergétique. Il n'y a aucun métabolite mesurable qui reflète directement le statut protéique. En conséquence, une combinaison des paramètres est utilisée, comprenant l'urée, l'albumine, les protéines totales, la créatinine et la créatine kinase (CK) (Van Saun, 1997).

La concentration de l'urée sérique est influencée par une variété de paramètres alimentaires comprenant : l'apport protéique de la ration, le taux de protéines

dégradables de ration, l'efficacité de la fonction hépatique et celle des reins, le catabolisme musculaire et la quantité d'hydrates de carbone fermentescibles de la ration. La valeur de la créatinine sérique est employée pour évaluer la vitesse de perfusion rénale et son impact sur la valeur de l'urée. Les protéines totales et l'albumine reflètent la disponibilité en acides aminés provenant des protéines alimentaires et la biomasse ruminale. La valeur de l'activité de la créatine kinase sérique permet d'évaluer l'intégrité des muscles, cette enzyme est libérée lors du catabolisme musculaire (Van Saun, 1997).

- Évaluation de la fonction hépatique :

La fonction et l'intégrité hépatique peuvent être évaluée par plusieurs enzymes dont : la γ -glutamyltransférase (GGT) et l'aspartate aminotransférase (AST) et la bilirubine totale et le cholestérol total. On observe une augmentation de l'activité sérique de la GGT avec l'apparition d'un état de lipidose hépatique. La gravité de l'infiltration graisseuse du foie peut-être associée à une augmentation proportionnelle de l'activité sérique de la GGT et de l'AST (Holtenius et al., 1990). Une augmentation de l'activité de la GGT sérique est un indicateur de l'activation du système de détoxification du foie. La GGT est inductible et son activité sérique augmente lorsque le foie est en présence de produits toxiques provenant de la ration (mycotoxines, ensilage mal conservé, présence d'éthanol). L'activité de l'AST sérique permet d'évaluer l'intégrité des hépatocytes et l'augmentation de sa valeur sérique est souvent une conséquence d'une acidose ruminale, d'une lipidose ou encore de la présence de toxines. On considère que l'ampleur des variations de l'activité AST du sérum est reliée au nombre hépatocytes affectés.

Évaluation des minéraux :

L'évaluation des taux sériques du Ca, du P, du K, du Mg, du Na et des Cl est pertinente en raison des rôles que jouent ces minéraux dans le syndrome de la vache à terre. Malheureusement, la plupart de ces minéraux sont étroitement régulés par une variété de processus homéostatique et leurs concentrations sériques ne reflètent pas toujours l'apport alimentaire (Van Saun, 1997). Le P, le K et le Mg sont, à une certaine mesure, sensibles à l'apport alimentaire. De faibles concentrations du Na et Cl correspondent à une altération de la fonction rénale ou de celle de la digestion (perte intestinale ou séquestration dans les réservoirs gastriques) ou dans les cas de carence alimentaire extrême. La concentration sérique du Ca en période peripartum est un indicateur de l'efficacité du système de régulation du Ca et d'un diagnostic d'hypocalcémie clinique ou subclinique (Oetzel, 2004). Les mesures des taux urinaires sont d'autres méthodes d'évaluation de ces macrominéraux et ils représentent des indicateurs plus sensibles de leur statut alimentaire.

L'évaluation des oligoéléments (Cu, Zn et Se) est habituellement faite en mesurant leurs concentrations sériques. Une carence alimentaire prolongée de ces oligoéléments peut compromettre plusieurs fonctions biochimiques en particulier celles du système immunitaire, prédisposant ainsi aux infections (Suttle, 1986).

Étant une partie du système immunitaire, les globulines peuvent refléter des situations d'inflammation, d'infection et parfois de l'état nutritionnel de l'animal. Cette étude s'inscrit dans l'amélioration des connaissances sur les globulines sériques et leurs interactions avec les paramètres biochimiques et hématologiques chez le

bovin laitier. Les objectifs de cette étude étaient d'évaluer la concentration des globulines sériques et les sources préanalytiques et analytiques potentielles de leur variation. De corréler la concentration des globulines sériques avec le nombre d'embryons transférables chez des bovins laitiers après un traitement de superovulation. Et enfin de distinguer statistiquement des groupes de bovins laitiers en se basant sur la concentration de leurs globulines sériques et d'établir des relations entre les paramètres biochimiques et hématologiques et la concentration des globulines sériques.

CHAPITRE 2

Evaluation of variation in serum globulin concentrations in dairy cattle

Authors: Younès Chorfi, Anne Lanevski-Pietersma, Vincent Girard, Armand Tremblay

Background: Several factors may influence the concentration of serum globulins in healthy cows. Knowledge of sources of variation of cattle serum globulins is necessary for clinical interpretation but they have received little attention in the literature. **Objectives:** The purpose of this study was to compare colorimetry-based total serum globulin values with electrophoretically-determined serum globulin fractions and with IgG concentration; and to evaluate diurnal and long-term physiological variation and the effects of lactation and venipuncture site on serum globulin concentrations in Holstein dairy cattle. **Methods:** Serum total globulin and albumin concentrations were analyzed by colorimetry and electrophoresis in 86 lactating cows; IgG concentrations were determined by radial immunodiffusion test in 41 dry and 34 lactating cows. Serum globulins were analyzed hourly for 24 hours in 8 lactating cows and weekly for 15 weeks in 6 additional cows. Globulin concentrations were compared in samples obtained from jugular and coccygeal venipuncture sites in 4 cows. Results were analyzed using parametric statistical tests. **Results:** Colorimetry-based total serum globulin concentrations correlated well with γ -globulin fractions ($r^2 = 0.87$) and IgG concentrations ($r^2 = 0.91$). Diurnal variation of total serum globulin concentration was significant ($P = .01$); however, globulins did not vary significantly over a 15-week period. Mean serum globulin concentration in samples obtained from the jugular vein was 2.35 g/L higher than that in samples obtained by coccygeal venipuncture ($P < .0001$). **Conclusions:** The colorimetric method widely used in routine laboratory analyses remains a useful test for globulin determination in dairy cattle. However, time of sampling and venipuncture site

should be considered in the interpretation of serum globulins on serial or interindividual specimens.

Key Words: Bovine, globulins, methodology, preanalytical factors, serum

Introduction

Innate and acquired defense mechanisms in cattle are weakest during the peripartum period.¹ This lowered responsiveness includes changes in systemic and udder immunity, and together with the physical and metabolic stresses of pregnancy, calving, and lactation contributes substantially to decreased resistance and increased peripartum incidence of infectious diseases in cows.¹ Total serum globulin concentrations can provide an indication of an animal's humoral immune status or response, one component of the organism's defense system. A decrease in serum globulin concentration in the peripartum period in cattle was reported in one study, whereas, a transient increase was found in another study. Differences in globulin concentrations also may occur because of differences in methodology.²⁻⁶

To our knowledge, no studies document fluctuations in serum globulins concentration during lactation, a physiologic stage in which a variety of disorders occur because of increased demand on the cow's metabolism and in which milk production varies. Factors such as season, age, and pregnancy also have been shown to affect blood values. In one study, although differences in serum globulin concentrations among individual dairy cattle and among age groups were pronounced, no differences were associated with season or stage of pregnancy.⁷ In another study, an inverse relationship was found between milk yield and serum globulins concentration, and a positive correlation was found between age and serum globulins concentration.⁸ Thus, several preanalytical factors must be considered in the interpretation of serum globulin concentrations in dairy cattle.

The aim of this study was to evaluate serum globulins concentration and potential analytical and preanalytical sources of variation in dairy cattle. The three specific objectives of the study were: 1) to compare colorimetry-based total serum globulins concentration with electrophoretically-determined serum globulin fractions; 2) to compare total serum globulins concentration with IgG concentration, as determined by radial immunodiffusion; and 3) to evaluate potential sources of variation in serum globulins concentration including lactational stage, diurnal fluctuation, long-term physiological fluctuation, and sampling site.

Methods

Protein measurements and calculations

Total serum protein and albumin concentrations were determined by colorimetry⁹ on an automated biochemical analyzer (Synchro CX5 clinical system, Fullerton, CA, USA). The biuret method was used to measure the concentration of total proteins. Albumin concentration was measured by a timed endpoint method using bromocresol green. Concentrations of total proteins and albumin were expressed as g/L. Total serum globulins concentration was calculated as the difference between total serum protein and albumin concentrations.

The Titan Gel protein electrophoresis system (Helena Laboratories Corp, Beaumont, TX, USA) was used to determine serum protein fractions.¹⁰ Each bovine serum sample was diluted 1:4 in Titan Gel serum protein buffer. Three microliters of each sample was placed onto template slits of the Titan gel. The gel was allowed to sit at room temperature (20 to 25 °C) for 4 minutes after the last sample was applied to allow the samples to diffuse into the agarose gel. Electrophoresis was carried out

with a current of 85 V for 20 minutes in 25 mL of Titan Gel protein buffer. Protein bands were visualized by fixing the gel in methanol/distilled water/acetic acid (5:5:1) and staining with Amido black protein stain. After destaining and drying at 60-70°C, the gel was scanned using a Helena EDC spectrophotometer at 595 nm. Protein bands including albumin and globulin fractions were quantified with software (EZ-Scan 1.54, Helena Laboratories) based on the colorimetric total protein concentration.

A commercially available kit (Bovine RID Kit-VMRD, Pullman, WA, USA) was used for serum IgG determination.¹¹ Three microliters of test reference and serum samples were applied to serial radial immunodiffusion (SRID) plates containing agarose gel incorporating anti-bovine IgG. The plates were left undisturbed for 18 hours at room temperature after adding the samples. The resulting ring diameters were measured and the IgG content of the samples was calculated using regression analysis. A standard curve was established using reference sera supplied by the manufacturer. Test samples and specimens with diameters beyond the range of the standard curve were repeated after dilution with phosphate buffered saline buffer.

For each experiment, approximately 8 ml of blood were collected from the coccygeal vessel into vacuum tubes without anticoagulant (Vacutainer, Becton Dickenson, Rutherford, NJ, USA). The samples were allowed to clot, the sera were separated immediately and frozen at -20 °C until analysis.

Experiments

Research animals were cared for according to guidelines provided by the Canadian Council on Animal Welfare.

Experiment 1. Effect of analytical method on serum globulin concentrations.

Colorimetry-based total globulin and albumin concentrations were compared with electrophoretically determined globulin and albumin concentrations in serum samples obtained from 86 clinically healthy Holstein cows between January and April 2001 from 12 farms in the province of Quebec, Canada as part of annual or semiannual herd health monitoring. Animals were 1-8 years old with an average annual milk production per cow of 9000 kg and were sampled at different stages of lactation by coccygeal venipuncture.

Experiment 2. Effect of lactational stage on serum globulin concentrations.

Colorimetry-based total serum globulin concentrations, electrophoretically determined globulin concentrations and IgG concentrations were compared in a separate group of 75 Holstein cows (41 lactating and 34 dry cows) between May and July 2001 from 10 farms in the province of Quebec, Canada. Animals were 1-8 years old and were sampled by coccygeal venipuncture.

Experiment 3. Effects of diurnal fluctuation, long-term physiological variation, and venipuncture site on serum globulin concentrations. Three groups of clinically healthy Holstein cows, 2-6 years old, were used in this experiment. Cows were housed at the Institut de recherche et de développement en agroenvironnement (IRDA) and were fed a ration of corn silage, soy bean and vitamin and mineral supplement (VitarauX 3-13, Aliments Breton inc, Qc, CANADA) and had free access

to water. Prior to the study, cows were under veterinary supervision and had not been vaccinated.

Experiment 3a. Diurnal fluctuation. Colorimetry-based total serum globulin concentrations were assessed in 8 lactating cows (average annual milk production, 9000 kg). Animals were sampled by jugular venipuncture each hour over a 24-hour period on each of 4 different days at 3-week intervals. 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 containing 250 ml of 0.9% NaCl, 1000 IU of Hepalean (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 the sampling period.

Experiment 3b. Long-term physiological fluctuation and the effects of feeding and milking. Colorimetry-based total globulins concentration was assessed in midlactational Holstein cows. Blood samples were obtained by jugular venipuncture after the morning feeding and at first milking. Each cow was sampled once every 3 weeks over a 15-week period for a total of 6 samples.

Experiment 3c: The effect of venipuncture site. Colorimetry-based total serum globulins, total protein, and albumin concentrations were measured in 4 cows at the same lactational stage in serum samples obtained simultaneously by jugular and coccygeal venipuncture on 90, 120, 150 and 180 DIM.

Statistical analyses

Data were analyzed using SAS System software (SAS statistical software version 8, SAS Institute, Cary, NC, USA). Values of $P < .05$ were considered significant. Normality of distribution for total protein and protein fraction concentrations was assessed with the Shapiro-Wilk test. An unpaired t -test was used to evaluate differences between groups (experiments 1 and 2).

In experiment 3a, 3b and 3c repeated measurements of serum globulins were analyzed using the SAS MIXED procedure with the cow as repeated subject of measurement. In this model, variations were explained by factors (cow, period, venipuncture site) and time effects (hour in experiment 3a, week in experiment 3b and month in experiment 3c). Time and interaction between factors and time were tested against unexplained variation. In experiment 3a, the day was divided into 3 intervals: 6 AM to 1 PM (morning), 2-9 PM (evening), and 10 PM to 5 AM (night). Differences in values among morning, evening, and night intervals were obtained by contrasting values of all samples of a given interval against all other repeated values. Differences were analysed with the ESTIMATE statement of the SAS MIXED procedure. In experiment 3c, the effect of venipuncture site on each cow was tested as contrasts in the venipuncture site by cow interaction.

Results

Effect of analytical method on serum globulin concentrations

Total protein, albumin, and total globulin concentrations obtained by colorimetry were 70 ± 5 , 34 ± 3 , and 36 ± 6 g/L, respectively ($n=85$). Albumin and total globulin concentrations obtained by electrophoresis were 27.4 ± 2.8 and 43 ± 6

g/L, respectively. There was a significant difference in both total globulin and albumin concentrations obtained by colorimetric and electrophoretic methods. Colorimetry-based mean total globulin concentration was 7 ± 0.4 g/L lower ($P < .001$) and mean albumin concentration was 7 ± 0.2 g/L higher ($P < .001$) than values measured by electrophoresis. On electrophoresis, γ -globulins comprised 55% of total globulins (25 ± 6 g/L), whereas α -1, α -2, and β -globulin fractions comprised 11% (4 ± 1 g/L), 16% (7 ± 1 g/L), and 18% (7 ± 1 g/L), respectively.

Colorimetry-based total serum globulins concentration correlated well with electrophoretically determined total globulin levels ($r^2 = 0.89$, $P < .0001$) and γ -globulin fractions ($r^2 = 0.87$, $P < .0001$). In contrast, colorimetry-based serum globulins concentration correlated poorly with other globulin fractions (α -globulin, $r^2 = 0.14$, $P > .05$, and β -globulin, $r^2 = 0.04$, $P > .05$) (Figure 1A through 1D).

Effect of lactational stage on serum globulin concentrations

Colorimetry-based total serum globulin concentrations correlated well with IgG concentrations determined by radial immunodiffusion ($r^2 = 0.91$, $P < .001$, $n=75$) (Figure 2). Mean total globulins concentration in lactating cows (29 ± 9 g/L) was not significantly different from that in dry cows (32 ± 7 g/L). Similarly, mean γ -globulin concentration determined by electrophoresis (19 ± 8 g/L) and mean IgG concentration (17 ± 8 g/L) in lactating cows were not significantly different from results observed in dry cows (21 ± 7 and 19 ± 7 g/L, respectively).

Diurnal fluctuation and long-term physiologic variation in total globulin concentrations

Total serum globulin concentrations showed significant diurnal variation over a 24-hour period ($P = .01$). Mean morning concentration of serum globulin was significantly higher than those recorded in the evening ($P = .04$) and at night ($P = 0.002$). There was no significant difference between evening and nocturnal concentrations (Figure 3).

Individual total serum globulins concentrations determined by colorimetry at 3-week intervals over a 15-week period (Figure 4) were not significantly different from each other ($P = .639$). However, total serum globulin concentration varied significantly among cows ($P < .0001$). Feeding and milking had no significant effect on globulin concentration ($P = .508$, data not shown).

Effect of venipuncture site on serum globulin concentrations

Mean total serum globulin concentrations in samples obtained by jugular (43 ± 5 g/L) and coccygeal (40 ± 5 g/L) venipuncture were significantly different ($P < .0001$, mean difference 2.35 g/L). Only 1 cow had no significant difference in total globulins concentration between the 2 blood sampling sites ($P > .05$).

Discussion

In this study, significant differences were observed in globulin concentrations based on analytical method. Colorimetry-based total serum globulins concentration, calculated by subtraction of albumin concentration from total protein concentration, has been in use for over 50 years in routine testing, but the method is less sensitive and specific than electrophoresis, and underestimates total protein concentration.^{9,12}

Potential interferences with the method used for albumin will also affect calculated globulin concentrations. Bromcresol green and bromcresol purple are both widely used for albumin measurement, but may over- or underestimate albumin concentration.¹³⁻¹⁶ Bromcresol green binds globulin fractions, in particular α - and β -globulins, resulting in an overestimation of albumin concentration that can be apparent especially in hypoalbuminemia.^{17,18} Bromcresol purple, on the other hand, underestimates albumin concentrations in people with renal failure or increased serum bilirubin concentration.^{19,20} Other molecules, such as heparin, also can interfere with albumin assays, an effect that is less pronounced with bromcresol purple.²¹ Although bovine serum albumin has better affinity for bromcresol green than does human serum albumin, reaction time and the animal's age may affect serum albumin levels, the latter presumably caused by changing globulin patterns during development.^{13,22-24} In our laboratory, comparison of both dye-binding methods has shown that albumin results obtained with bromcresol green correlate best with electrophoresis (unpublished data). Nonetheless, bromcresol green had a positive (7 g/L) analytical bias when compared with electrophoresis in this study. Electrophoresis often is considered a reference method for evaluating colorimetric assays for protein fractions, but it, too, can result in different results depending on the electrophoretic method used. In one study in which bovine serum proteins were compared using 2 electrophoretic methods, significant differences in albumin, and α - and β -globulins concentrations but not in γ -globulins concentration were observed.²⁵

The γ -globulins represented the main fraction of total globulins determined by electrophoresis (55%) in healthy dairy cattle in this study. The α -1, α -2, and β -

globulin fractions represented 11%, 16%, and 18%, respectively, of total serum globulins. These findings coincide with previously published observations.²⁶ Colorimetry-based total serum globulin concentrations correlated well with electrophoretically determined total globulin, γ -globulins, and IgG concentrations. In contrast, calculated globulin concentrations correlated poorly with other globulin fractions.

In lactating cows, colorimetry-based total globulins concentration, electrophoretically determined γ -globulin concentration and IgG concentration were not significantly different from concentrations observed in dry cows. The only difference between dry and lactating cows was the lower mean total globulin concentration (by colorimetry), which might be explained by globulin loss in milk via the udder during lactation.²⁷

Differences in serum globulin concentrations between morning and evening samples, although significant statistically, were small and may not be important biologically. They may be due to the normal metabolism of globulins or to a compensatory response to fluctuations in albumin concentration. Indeed, hypoalbuminemia or decreased plasma oncotic pressure stimulates the production or reduces the rate of catabolism of serum globulins.^{28,29}

The results of this study suggest that serum globulin concentrations remain relatively constant over a medium-range time period (15 weeks) within a given physiological stage as long as environment and nutrition are not altered. However,

total globulin concentrations can vary significantly among individuals, depending on breed, age, and lactational stage.^{1,10,12,30}

The slightly higher total globulins concentration in samples obtained by jugular venipuncture compared with that obtained by coccygeal venipuncture has not, to our knowledge, been previously reported. The jugular area is drained by several regional lymph nodes secreting immunoglobulins into the blood stream, which may increase the globulin content of jugular blood. Although this small difference may not be relevant biologically, knowledge of sampling site may be important for data interpretation especially in serial sampling of an individual animal.

In conclusion, because γ -globulins comprise the main serum globulin fraction in healthy dairy cattle, colorimetry-based total globulins concentration is a reliable indicator of serum γ -globulin and IgG concentrations in healthy subjects. Although not statistically significant, differences between dry and lactating cows highlight the importance of establishing different reference intervals for globulins in dairy cattle based on their physiologic status and diet. Time of day and sampling site also may affect interpretation of globulin concentrations, especially in serial analyses on individual cows or in comparing individuals, however, because of the small sample size in this study, similar observations on a larger number of animals would be required before these results can be generalized.

Acknowledgment

This study was supported by a grant provided by Fond du Centenaire, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal.

References

1. Mallard BA, Dekkers JC, Ireland MJ, et al. Alteration in immune responsiveness during the peripartum period and its ramification on dairy cow and calf health. *J Dairy Sci.* 1998;81:585-595.
2. Kehrli ME Jr, Nonnecke BJ, Roth JA. Alterations in bovine lymphocyte function during the periparturient period. *Am J Vet Res.* 1989;50:215-220.
3. Cai TQ, Weston PG, Lund LA, et al. Association between neutrophil functions and periparturient disorders in cows. *Am J Vet Res.* 1994;55:934-943.
4. Van Kampen C, Mallard BA, Wilkie BN. Adhesion molecules and lymphocyte subsets in milk and blood of periparturient Holstein cows. *Vet Immunol Immunopathol.* 1999;69:23-32.
5. Blauarmel H, Kruger I. Micro-agar gel electrophoresis for quantitative assay of protein fractions in the blood plasma of highly pregnant dairy cows close to the date of parturition. *Arch Exp Veterinarmedizin.* 1976;30:925-932.
6. Blauarmel H, Kruger I. Quantitative assay of blood plasma protein fractions in pregnant dairy cows during 24 hours, using micro-agar-gel electrophoresis. *Arch Exp Vet.* 1976;30:547-552.
7. Liberg P. Agarose gel electrophoretic fractionation of serum proteins in adult cattle. 1. A study of clinically healthy cows. *Acta Vet Scand.* 1977;18:40-53.
8. Kitchenham BA, Rowlands GJ, Shorbagi H. Relationships of concentrations of certain blood constituents with milk yield and age of cows in dairy herds. *Res Vet Sci.* 1975;18:249-252.
9. Sapan CV, Lundblad RL, Price NC. Colorimetric protein assay techniques. *Biotechnol Appl Biochem.* 1999;29:99-108.
10. Satya S, Jonali D, Jeetendra G. Polyacrylamide gel electrophoretic pattern of serum and milk protein in pregnant and non-pregnant cows. *Indian Vet J.* 2001;78:209-211.
11. Dawes ME, Tyler JW, Hostetler D, et al. Evaluation of a commercially available immunoassay for assessing adequacy of passive transfer in calves. *J Am Vet Med Assoc.* 2002;220:791-793.
12. Kaneko JJ. Serum proteins and dysproteinemias. In: Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML, eds. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals.* San Diego, CA: Academic Press; 1997:117-138.

13. Silverman LM, Christenson RH. Amino acids and proteins. In: Burtis CA, Ashwood ER, eds. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*. 2nd ed. Philadelphia, PA: WB Saunders; 1994:625-734.
14. Ingwersen S, Raabo E. Improved and more specific bromcresol green methods for the manual and automatic determination of serum albumin. *Clin Chim Acta*. 1978;88:545-550.
15. Doumas BT, Peters T. Serum and urine albumin: a progress report on their measurement and clinical significance. *Clin Chim Acta*. 1997;258:3-20.
16. McGinlay JM, Payne RB. Serum albumin by dye-binding: bromcresol green or bromcresol purple? *Ann Clin Biochem*. 1988;25:417-421.
17. Sidki A, Hirst D. Establishing albumin levels in sheep serum by a specific fluoroimmunoassay. *Vet J*. 1998;156:67-72.
18. Stokol T, Tarrant JM, Scarlett JM. Overestimation of canine albumin concentration with the bromcresol green method in heparinized plasma samples. *Vet Clin Pathol*. 2001;30:170-176.
19. Maguire GA, Price CP. Bromcresol purple method for serum albumin gives falsely low values in patients with renal insufficiency. *Clin Chim Acta*. 1986;155:83-88.
20. Bush V, Reed RG. Bromcresol purple dye-binding methods underestimate albumin that is carrying covalently bound bilirubin. *Clin Chem*. 1987;33:821-823.
21. Bonvicini P, Ceriotti G, Plebani M, et al. Heparin interferes with albumin determination by dye-binding methods. *Clin Chem*. 1979;25:1459-1460.
22. Maruthamuthu M, Kishore S. Bromcresol green as a new spectrophotometric probe for serum albumins. *Proc Indian Acad Sci Chem Sci*. 1988;100:525-533.
23. Keay G, Doxey DL. Serum albumin values from healthy cattle, sheep and horses determined by the immediate bromcresol green reaction and by agarose gel electrophoresis. *Res Vet Sci*. 1983;35:58-60.
24. Green SA, Jenkins SJ, Clark PA. A comparison of chemical and electrophoretic methods of serum protein determinations in clinically normal domestic animals of various ages. *Cornell Vet*. 1982;72:416-426.
25. Blauarmel H. Comparison between quantitative assay of blood plasma protein fractions in clinically healthy cattle and cellulose acetate sheet and micro-agar-gel electrophoresis. *Arch Exp Vet*. 1978;32:525-530.

26. Tumbleson ME, Burks MF, Wingfield WE. Serum protein concentrations, as a function of age, in female dairy cattle. Aging and serum proteins. *Cornell Vet.* 1973;63:65-71.
27. Larson BL. Immunoglobulins of the mammary secretions. In: PF Fox, ed. *Advanced Dairy Chemistry 1-Proteins*. London, UK: Elsevier Science Publishers; 1992:231-254.
28. Kaysen GA. Plasma composition in the nephrotic syndrome. *Am J Nephrol.* 1993;13:347-359.
29. Harrus S, Waner T, Bark H, et al. Recent advances in determining the pathogenesis of canine monocytic ehrlichiosis. *J Clin Microbiol.* 1999;37:2745-2749.
30. Kabir KK, Varshney JP, Rawal CVS, et al. Studies on serum progesterone and certain blood biochemical indices in cyclic and acyclic non-descript rural buffaloes. *Indian Vet J.* 2001;78:1116-1118.

FIGURE CAPTIONS

Figure 1. Regression analysis of colorimetry-based total globulins concentration (C.T.G.) and electrophoretically determined total globulins (E.T.G.) (A), α -globulins (E. α -G.) (B), β -globulins (E. β -G.)(C) and γ -globulins (E. γ -G.) (D) concentrations.

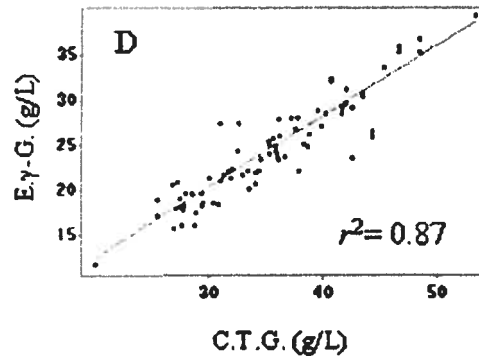
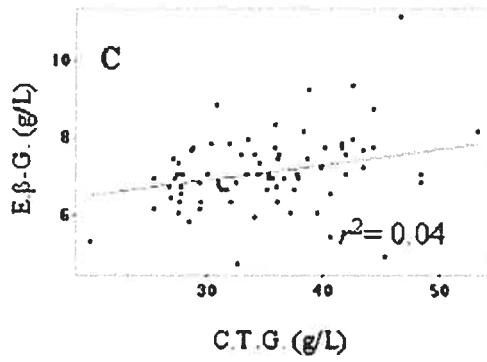
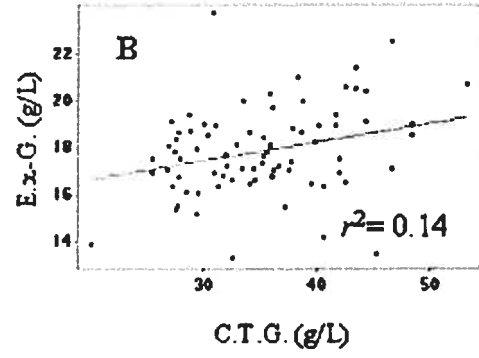
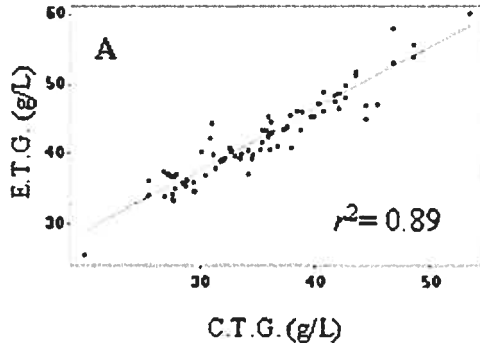


Figure 2. Regression analysis comparing colorimetry-based total globulins (C.T.G.) concentration with IgG concentration (g/L).

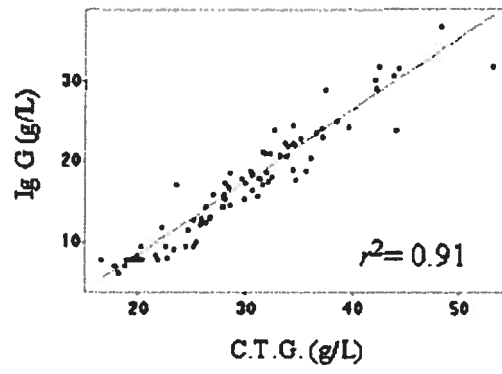


Figure 3. Diurnal variation in total serum globulin and albumin concentrations. Each point corresponds to the mean (\pm SEM) of 8 lactating cows sampled on 3 separate days at 3-week intervals. Morning (6 AM to 1 PM) total globulin concentrations (grayed zone of graph) were significantly higher than those obtained during the evening ($P = .04$) and at night ($P = .002$).

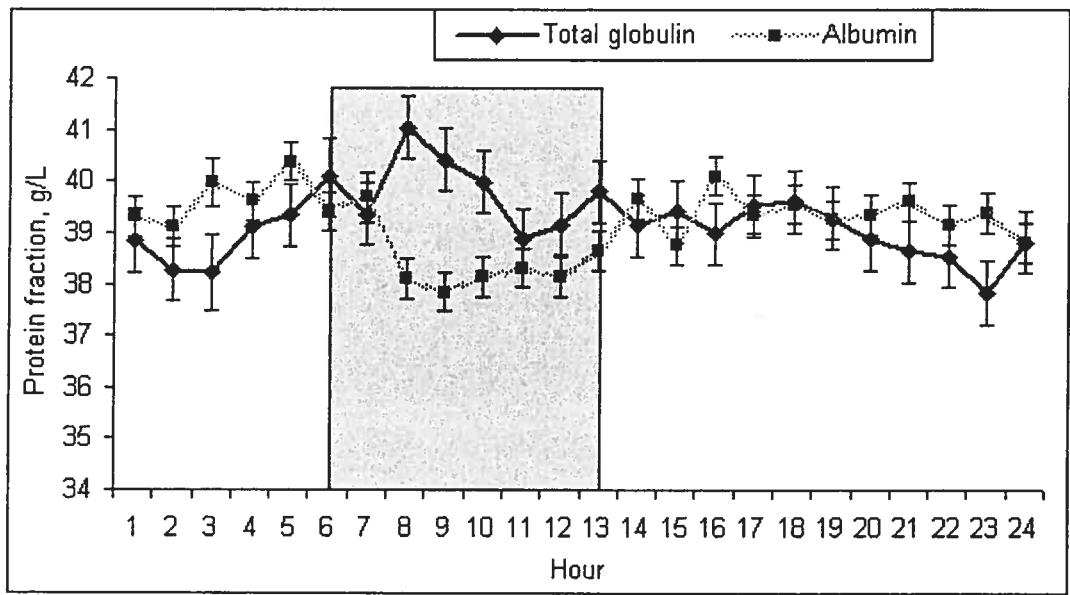
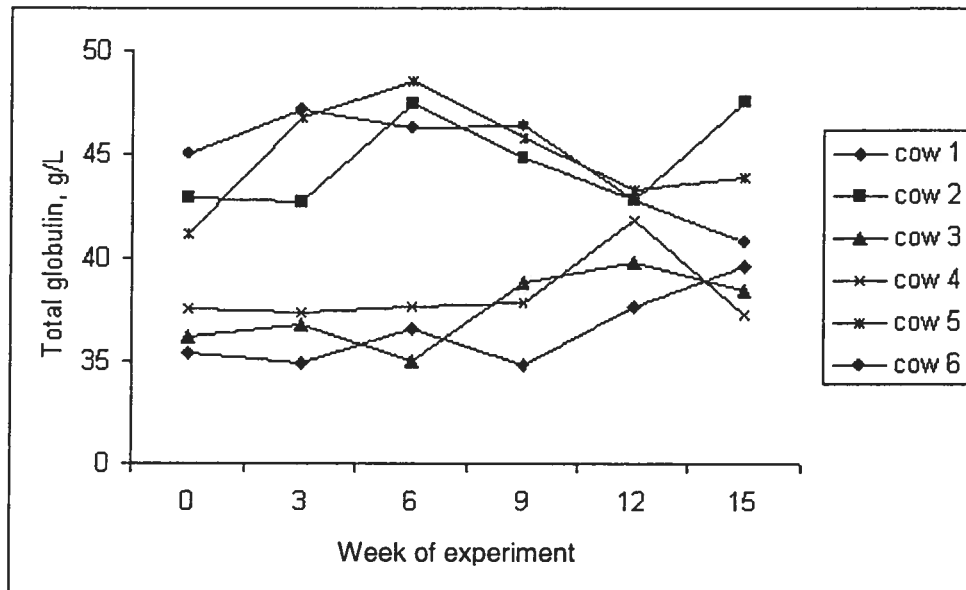



Figure 4. Long-term variation in total serum globulins concentration. Six lactating cows were sampled every 3 weeks for 15 weeks (6 samples each). There was no significant effect of time on serum globulins concentration ($P = .639$).



FOOTNOTES

From the Clinical Biochemistry Laboratory, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal. Corresponding author: Anne Lanevschi-Pietersma, Department of clinical sciences of companion animals, Faculty of veterinary medicine, Utrecht University, Yalelaan 16, 3508 TD Utrecht, Netherlands



CHAPITRE 3

**Metabolic balance and embryo production during superovulatory treatment in
dairy cattle**

Authors: Younès Chorfi, Anne Lanevski, Raynald Dupras, Vincent Girard, Armand
Tremblay

Abstract

The objective of this study was to verify the relationship between the number of transferable embryos (TE) and various blood chemistry parameters as a reflection of the metabolic state of cows after superovulatory treatment. Forty nine Holstein cows (41 lactating and 8 dry) with an average age of 6.6 ± 1.5 years were subjected to superovulatory treatment for commercial production of embryos. At the time of embryo harvest, individual blood samples were taken from each cow for biochemical analysis. All embryos including dead ones as well as non-fertilized oocytes were counted in uterine lavage. Feed samples collected daily for a period of two weeks before embryo harvest were analyzed for the following mycotoxins: vomitoxin, zearalenone and T2 toxin. Negative-binomial regression was used to investigate factors which might have influenced the number of TE. On average, cows produced 9.45 ± 5.60 embryos and oocytes of which 5.27 ± 4.20 were TE, 0.37 ± 0.80 were dead embryos and 3.82 ± 3.78 were non-fertilized oocytes. Serum concentrations of glucose, β -hydroxybutyrate, blood urea nitrogen, albumin, globulins, total protein, β -carotene, cholesterol, P, CO₂, Ca, Cu, Zn, Se, Na, Cl, glutathion peroxidase, γ -glutamyl-transpeptidase and aspartate amino-transferase were not significantly associated with the number of TE ($p > 0.10$). Animal age and days in milk were also not associated with the number of TE. Mycotoxin amounts in feed varied from 0 to 175 ppm and were not significantly associated with TE ($p > 0.17$). Higher concentrations of Mg and K were associated with a higher production of TE ($p = 0.005$ and $p = 0.043$ respectively) and higher concentrations of creatinine kinase were associated with a lower production of TE ($p = 0.011$).

Key words: Dairy cattle, transferable embryos, serum chemistry parameters, mycotoxins.

1. Introduction

Genetic improvement in dairy cows has led to a dramatic increase in milk yield and this has been associated with a decrease in reproductive performance [1,2]. Embryo mortality is a significant cause of reproductive failure in cattle and part of this may be related to nutritional influence around the time of conception [3]. Nutritional imbalance may affect fertility by causing embryonic death [4], but it is not clear if nutrition affects embryo quality by changing the developmental capacity of the oocyte or early embryonic development. The relationship between nutrition and reproduction is complex and the response to manipulation through specific diets often shows variable and inconsistent results [4]. In lactating dairy cows, inadequate short term nutrition or prolonged depletion of body reserves during early lactation can have significant deleterious effects on the resumption of ovarian activity, conception rate and fertility. Deleterious effects of excessive nutrition on embryo development are becoming evident both in normally ovulated and superovulated cows [4]. On the other hand, dietary supplements containing high energy and protein have been shown to increase ovulation rate in ewes [5]. Similarly, increases in ovulation rate were reported when glucose was infused intravenously [5].

Embryo survival and growth depend upon the quality of the uterine luminal environment. Intake of high dietary proteins alters uterine secretions and may be related to blood urea concentration which can have a detrimental effect on fertility by changing the uterine pH [6]. Furthermore, excess dietary protein may exacerbate negative energy balance during early lactation and thereby reduce fertility [7,8].

The significance of minerals in herd fertility is indisputable. The elements that are of particular importance are categorized into major elements such as Ca, P, K, Na, Mg and trace elements such as Fe, I, Cu, Mn, Zn, Co and Se [9,10]. The minerals that affect reproduction in cattle are generally found within the trace element group, although deficiencies of Ca and P can also affect fertility [9,11]. Ovarian status has a major effect on superovulation and this can be influenced by several factors including the type and quantity of diets [12,13].

Because nutritional influence on reproduction is profound and its effect on superovulation is poorly understood, this study was designed to verify the relationship between various biochemical parameters and the number of transferable embryos from cows after superovulatory treatment. To this effect, biochemical serum parameters of energy balance, hepatic function, acid-base balance and levels of minerals and proteins were studied in relation to transferable embryos.

2. Materials and Methods

2.1. Animals

Forty nine Holstein cows (41 lactating and 8 dry) from 20 farms in Quebec, Canada with an average age of 6.6 ± 1.5 years were subjected to a superovulatory treatment for the commercial production of embryos. The cows were fed a total mixed ration and mineral supplements with free access to fresh water and were cared for according to guidelines provided by the Canadian Council on Animal Welfare.

2.2. Embryo production

Superovulation was performed according to a modified method of Baracaldo et al [14]. Briefly, each cow received 3 mg of estradiol-17 β im and 1.9 g of progesterone-releasing vaginal insert (CIDR, Bioniche Animal Health, Belleville, ON, Canada) at random stages of the estrous cycle (designated Day 0). From Day 4 to Day 8 the cows received a total of 380 mg NIH-FSH-P1 (Folltropin V, Bioniche Animal Health) administered intramuscularly through 9 injections of decreasing dose (from 70 mg to 20 mg) at 12-h intervals. On Day 7, the cows received 3 injections consisting of 500 μ g, 500 μ g and 375 μ g of cloprostenol, a prostaglandin F2 α analogue (Estrumate, Shering-Plough, Pointe-Claire, QC, Canada) at approximately 6-h intervals after which vaginal inserts were removed. Artificial insemination (AI) was performed on Day 9 and Day 10 after treatment with 150 μ g GnRH im (Cystorelin, Merial Canada Inc, Baie d'Urfe, Qc, Canada).

Embryos were flushed from the uterus of donor cows 7 days after AI, using Dulbecco's phosphate buffered saline (PBS) (Sigma-Aldrich LTD, Oakville, ON,

Canada) supplemented with 1.5 % of fetal bovine serum and 25 µg/mL of kanamycin sulfate. They were assessed for viability immediately after collection using a microscope. Live embryos were washed 10 times in the PBS solution at 30-35°C. After a 5-minute bath in 1.5 M ethylene glycol at 30°C, the embryos were transferred to a 0.25 mL straw and cooled in a programmable freezer (CryoLogic, Mount Waverley, Vic, Australia) by 0.5°C per minute to reach -32°C. The embryos were then plunged into liquid nitrogen and stored till use.

2.3. Serum biochemical analyses

During embryo harvest, individual blood samples were taken from each cow and delivered the same day to the clinical chemistry laboratory of the Faculté de médecine vétérinaire of the Université de Montréal. Serum was separated and analyzed on a Beckman-Synchron CX5 autoanalyzer (Beckman instruments, Fullerton, CA, USA) using Beckman reagents. Concentrations of Glucose (Glu), cholesterol (Chol), albumin (Alb), total protein (TP), Ca, P, Mg and β-carotene (Caro) were measured by colorimetric end-point methods. Globulins (Glo) were calculated by subtracting Alb from TP concentrations. Enzymatic activity of aspartate aminotransferase (AST), gamma glutamyl transferase (GGT), creatinine kinase (CK) and blood urea nitrogen (BUN) concentration were measured by kinetic-enzymatic methods, as were the activities of β-hydroxybutyrate (BHB), glutathione-peroxidase (GPXs). Cu and Zn concentrations were measured by colorimetric methods using Randox commercial kits (Randox Laboratories Canada Ltd, Mississauga, ON, Canada). Na, K, Cl and CO₂ concentrations were measured using ion specific electrodes [15,16].

Serum Se was measured by HPLC using modified of Howkes and Kutnink [17]. Serum at 250 μ l volume was mixed with 2.5 mL double-distilled nitric acid (70%) and 1 mL perchloric acid (70%). The samples were heated at 140°C for 90 min and then transferred to 200°C for 75 min. After cooling to room temperature, 1 mL of 4 M HCl was added to the digested samples and the tubes were block heated for 15 min at 150°C to reduce Se VI to Se IV. One milliliter of 2 M glycine base, 0.09 M Na₄EDTA and 4 drops of 0.02% cresol red were added and the pH was adjusted to 1.5–2.0 with 7 M NH₄OH. One and a-half millilitres of 2 M glycine, pH 1.75, was added and the samples were diluted to 8 mL with distilled water, to minimize the tube-to-tube pH variation. One milliliter of 0.1% (w/v) 2,3-diaminonaphthalene hydrochloride in 0.1 M HCl (extracted once with cyclohexane just before use) was added and the mixture was heated for 45 min at 50°C. After cooling, 3 mL cyclohexane was added, polyethylene stoppers were placed on the tubes, and they were mechanically shaken for 15 min to extract the fluorescent piaszelenol. The cyclohexane extracts were placed directly into 2-mL autosampler vials and analysed by HPLC system consisting of a HP 1100 (Hewlett–Packard Co., Palo Alto, CA, USA) and a Water-Xterra column (Waters Corporation, Milford, MA, USA). Elution was isocratic with a mobile phase consisting of 90% cyclohexane and 10% ethyl acetate, at a flow rate of 0.5 mL/min. The fluorescent derivative, naphtho-2-selena-1,3-diazole (4,5-benzopiazselenol), eluted at 2 min and was detected by a HP 1046A fluorescence detector at an excitation wavelength of 378 nm and emission wavelength of 530 nm.

2.4. Mycotoxin analysis

Feed samples collected daily for two weeks prior to embryo harvest were analyzed for mycotoxins. As previously described [18], vomitoxin (DON), T-2 toxin and zearalenone were determined using a commercial kit (Veratox CD-ELISA, Neogen Corporation, Lansing, MI, USA) according to manufacturer's instructions. Toxin concentrations were measured in parts per billion (ppb).

2.5. Statistical analysis

Negative-binomial regression test was used in a statistical analysis in SAS (Proc Genmod, SAS version 8.2, Cary, NC, USA) to determine the relationship between TE, biochemical parameters and mycotoxins. All independent variables were first screened and only those that were significant at a liberal alpha level of 0.15 were included in a multivariate model [19]. To evaluate whether each variable should remain in the final model, two models were fitted, one with the variable present and the other with the variable omitted. The difference between the log likelihood ratios computed for each model was used to assess the significance of the variable left out. The final model was found when the omission of any variable caused a significant increase in the deviance. The alpha level of 0.05 was used for the final model.

3. Results

The 49 cows produced an average of 9.45 ± 5.60 total embryos and oocytes of which 5.27 ± 4.20 embryos were transferable, 0.37 ± 0.80 were dead and 3.82 ± 3.78 were non-fertilized oocytes. The preliminary screening of all variables by negative binomial regression is presented in Table 1. Significant variables were globulins, Mg, P, K, CK, and CO_2 and were included in the multivariate model. The number of TE was associated with serum concentration of Mg ($p=0.005$), CK ($p=0.01$) and K ($p=0.04$). Higher concentrations of Mg and K were associated with a higher TE whereas higher concentrations of CK were associated with a lower TE (Table 2). The final model of the negative binomial regression showed no significant association of globulins ($p=0.46$), P ($p=0.17$) and CO_2 ($p=0.12$) with the number of TE.

There were no significant associations between TE and concentrations of Glu, BHB, Chol, BUN, Alb, TP, Ca, Cu, Zn, Se, β -carotene, Na, Cl and serum activities of GPXs, GGT and AST (Table 1). Age and DIM had no significant effects on the number of TE (Table 1). Results of vomitoxin and T-2 toxin were within the normal range (<500 ppb and <100 ppb respectively) but 15 out of 20 farms had feed contaminated with zearalenone (>250 ppb). There were no significant effects of these mycotoxins on TE (Table 3).

4. Discussion

In this study we report significant correlations between the number of TE and serum Mg, CK and K concentrations. Although some investigators have provided data to support the role of Mg supplementation in fertility [20-22], the relationship between serum Mg and embryo viability is poorly reported and the influence of serum Mg on reproduction is not clearly understood. In this study, higher concentrations of Mg were associated with a higher TE. In dairy cows, erythrocyte Mg concentration has been positively correlated with fertility [22]. Also, Mg deficiency induces embryo mortality in Sprague-Dawley rats and can be prevented by an adequate Mg supplementation via drinking water [23].

Increased serum CK levels generally reflect injury of the skeletal muscle or irritation of the uterus in cows [24,25]. Sattler and Fürll [25] showed a correlation between CK activity measured in the serum and the severity of endometritis in cows. They concluded that measurement of CK levels could be used as a screening parameter in the diagnosis of endometritis if there is no other muscular damage in the animal. The damage caused by the invasion of the trophoblast into the muscular layer of the fallopian tube in ectopic pregnancies in humans, causes CK release into maternal blood [26].

Our study does not directly reflect these findings in that the cows had no endometritis, did not appear to have any muscular injuries and were not in a fetal stage of pregnancy. Lower CK activities associated with higher viable embryos observed in our study indicate that a healthy environment, in which CK

concentrations are low, is one of the necessary elements for the production of a high number of TE.

Potassium is an essential element in culture media used for the production of in-vitro-derived bovine embryos [27]. Limited research suggests that feeding high levels of K may delay the onset of puberty and ovulation, impair corpus luteum development and increase the incidence of anestrus in heifers [28]. Peripheral blood K levels in donor cows in the current study do not reflect the finding by Wiebold et al [29] that the analysis of uterine fluid may contain significantly higher concentrations of K from the uterus of cows with abnormal embryos than that from cows with normal embryos, although K in embryo flushings from the donor cows was not measured in our study. In mice, the number of cells per embryo increases in a dose-related fashion when embryos are cultured in the presence of increasing concentrations of K [30]. These embryos were transferred to pseudopregnant recipient foster mothers as a test of viability. The highest rate of implantation was observed with embryos cultured in a medium containing highest K concentration [30]. This suggests that K plays an important role in embryo viability and implantation during development.

Among the major mineral elements, P has been most commonly associated with reproductive performance in dairy cows [31,32]. In this study no significant effect of P on the number of TE in dairy cattle was observed. This finding is in agreement with some studies which report no effect of dietary P levels on days to first ovulation, days to first estrus, days to first progesterone rise, days to first service, conception rates, and days open [33-36].

Studies in cattle using mastitis as a model indicate that one cause of early embryonic loss is infectious disease or activation of immune responses at sites outside the reproductive tract [37-39]. However, in the multivariate model of this study, serum concentrations of globulins had no significant association with the number of TE.

In this study, serum glucose, BHB, BUN and Alb concentrations were not associated with the number of TE. Even though many publications support a detrimental effect of energy and proteins on TE [40-42], our results suggest that within the range studied, energy balance does not influence the number of TE.

Various publications indicate that blood levels of Ca, Cu, Zn, Se and β -carotene affect reproductive function in dairy cattle [43-48]. However, serum concentrations of these elements in our study showed no significant association with TE. This is in agreement with the results by Jukola et al [49] concerning blood concentrations of Se and β -carotene. Mycotoxins, especially zearalenone, have been reported to affect fertility and embryo development *in-vitro* or and *in-vivo* in dairy cattle [50,51] but in our study there was no significant relationship between the studied mycotoxins and TE.

In conclusion, the results of this study demonstrate an association between Mg, CK, K and TE in dairy cattle. Higher concentrations of Mg and K and lower concentration of CK are associated with a higher number of TE. However, serum concentrations of P, CO₂, globulins, Glu, BHB, BUN, Alb, TP, Ca, Cu, Zn, Se, β -carotene, Chol, Na,

Cl, and GPXs, GGT and AST serum activities as well as age, DIM, and mycotoxin content of feed had no effect on the number of TE.

Acknowledgments

The authors would like to thank Dr Amer Silim, Department of Veterinary Pathology and Microbiology, University of Montreal, and Dr Christopher Price, Department of Veterinary Biomedicine, University of Montreal, for their valuable comments and suggestions during preparation of this manuscript. The authors are very grateful to Guy Beauchamp for statistical analysis.

5. References

- [1] Wall E, Brotherstone S, Woolliams JA, Banos G, Coffey MP. Genetic evaluation of fertility using direct and correlated traits. *J Dairy Sci.* 2003;86(12): 4093-102.
- [2] Washburn SP, Silvia WJ, Brown CH, McDaniel BT, McAllister AJ. Trends in reproductive performance in Southeastern Holstein and Jersey DHI herds. *J Dairy Sci.* 2002;85(1): 244-51.
- [3] Dunne LD, Diskin MG, Sreenan JM. Embryo and foetal loss in beef heifers between day 14 of gestation and full term. *Anim Reprod Sci.* 2000;58 (1-2): 39-44.
- [4] Boland MP, Lonergan P. Effect of nutrition on fertility in dairy cows. *Adv. dairy technol.* 2003;15: 19-33
- [5] Downing JA, Joss J, Scaramuzzi RJ. Ovulation rate and the concentrations of gonadotrophins and metabolic hormones in ewes infused with glucose during the late luteal phase of the oestrous cycle. *J Endocrinol.* 1995;146(3):403-10
- [6] Butler WR. Effect of protein nutrition on ovarian and uterine physiology in dairy cattle. *J Dairy Sci.* 1998;81(9):2533-9.
- [7] Blanchard T, Ferguson JD, Love L, Takeda T, Henderson B, Hasler J, Chalupa W. Effect of dietary crude protein type on fertilization and embryo quality in dairy cattle. *Am. J. Vet. Res.* 1990;51:905-908.
- [8] Lucy MC, Thatcher WW, Staples CR. Postpartum function: nutritional and physiological interactions. In: *Large Dairy Herd Management*, Van Horn HH, Wilcox CJ (Ed.), ADSA, Champaign, IL., 1992, pp. 135-145
- [9] Boland MP. Trace minerals in production and reproduction in dairy cows. *Adv. dairy technol.* 2003;15: 319-330.
- [10] Ahola JK, Baker DS, Burns PD, Mortimer RG, Enns RM, Whittier JC, Geary TW, Engle TE. Effect of copper, zinc, and manganese supplementation and source on reproduction, mineral status, and performance in grazing beef cattle over a two-year period. *J Anim Sci.* 2004;82(8):2375-83
- [11] Melendez P, Donovan GA, Risco CA, Goff JP. Plasma mineral and energy metabolite concentrations in dairy cows fed an anionic prepartum diet that did or did not have retained fetal membranes after parturition. *Am J Vet Res.* 2004;65(8):1071-6.
- [12] Yaakub H, O'Callaghan D, Boland MP. Effect of type and quantity of concentrates on superovulation and embryo yield in beef heifers. *Theriogenology.* 1999;51(7):1259-66.

- [13] Dawuda PM, Scaramuzzi RJ, Drew SB, Biggadike HJ, Laven RA, Allison R, Collins CF, Wathes DC. The effect of a diet containing excess quickly degradable nitrogen (QDN) on reproductive and metabolic hormonal profiles of lactating dairy cows. *Anim Reprod Sci.* 2004;81(3-4):195-208.
- [14] Baracaldo MI, Martinez MF, Adams GP, Mapletoft RJ. Superovulatory response following transvaginal follicle ablation in cattle. *Theriogenology.* 2000;53(6):1239-50.
- [15] Eicher R, Liesegang A, Bouchard E, Tremblay A. Effect of cow-specific factors and feeding frequency of concentrate on diurnal variations of blood metabolites in dairy cows. *Am J Vet Res.* 1999;60(12):1493-9.
- [16] Chorfi Y, Lanevski-Pietersma A, Girard V, Tremblay A. Evaluation of variation in serum globulin concentrations in dairy cattle. *Vet Clin Pathol.* 2004;33(3):122-7.
- [17] Hawkes WC, Kutnink MA. High-performance liquid chromatographic-fluorescence determination of traces of selenium in biological materials. *Anal Biochem.* 1996;241(2):206-11.
- [18] Gray SL, Lackey BR, Tate PL, Riley MB and Camper ND. Mycotoxins in Root Extracts of American and Asian Ginseng Bind Estrogen Receptors α and β . *Exp Biol Med (Maywood).* 2004;229(6):560-8.
- [19] Dohoo I, Martin W, Stryhn H: Modelling survival data. *In: Veterinary Epidemiologic Research*, 1st ed., AVC Inc., Charlottetown, PEI, Canada 2003
- [20] Krupnik A, Effect of magnesium supplementation on the frequency of placental retention and puerperal endometritis in cows. *Zeszyty Naukowe Akademii Rolniczej we Wroclawiu, Wetereyjna.* 2002;42, 91-110.
- [21] Ingraham RH, Kappel LC, Morgan EB, Srikandakumar A. Correction of subnormal fertility with copper and magnesium supplementation. *J Dairy Sci.* 1987;70(1):167-80.
- [22] Mulei CM, Daniel RC, Green D. Changes in erythrocyte Mg, Na and K concentrations in late pregnancy and early lactation and their relationship with subsequent fertility and milk production in dairy cows. *Zentralbl Veterinarmed A.* 1988;35(7):522-8.
- [23] Bubeck J, Haussecker H, Disch G, Spatling L, Classen HG. Potentiation of magnesium-deficiency-induced foetotoxicity by concomitant iron deficiency and its prevention by adequate supply via drinking water. *Magnes Res.* 1994;7(3-4):245-54.

- [24] Onapito JS, Raffe MR, Cox VS. Pressure-induced changes in fibular motor nerve conduction velocity and fibularis (peroneus) tertius muscle-evoked potentials in a goat model of the downer cow syndrome. *Am J Vet Res.* 1986;47(8):1747-50.
- [25] Sattler T, Furl M. Creatine kinase and aspartate aminotransferase in cows as indicators for endometritis. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med.* 2004;51(3):132-7.
- [26] Vitoratos N, Gregoriou O, Papadias C, Konidaris S, Kalogirou D, Kalampokis D, Chryssikopoulos A. Clinical value of creatinine kinase in the diagnosis of ectopic pregnancy. *Gynecol Obstet Invest.* 1998;46(2):80-3.
- [27] Wirtu G, Pope CE, Damiani P, Miller F, Dresser BL, Short CR, Godke RA, Bavister BD. Development of in-vitro-derived bovine embryos in protein-free media: effects of amino acids, glucose, pyruvate, lactate, phosphate and osmotic pressure. *Reprod Fertil Dev.* 2004;15(8):439-49.
- [28] Smith RD, Chase LE. Nutrition and reproduction. *Animal Science Mimeo 88*, August, 1985 Dept. of Animal Science Cornell University Ithaca, NY 14853.
- [29] Wiebold JL. Embryonic mortality and the uterine environment in first-service lactating dairy cows. *J Reprod Fertil.* 1988;84(2):393-9.
- [30] Roblero LS, Riffo MD. High potassium concentration improves preimplantation development of mouse embryos in vitro. *Fertil Steril.* 1986;45(3):412-6.
- [31] 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.* 83:1028–1041.
- [32] Wu Z, Satter LD. Milk production and reproductive performance of dairy cows fed two concentrations of phosphorus for two years. *J Dairy Sci* 2000;83:1052–63.
- [33] Schafer M, Tran TH, Paarmann S, Kramer G. Relationship between metabolic status and results of embryo collection in high-producing cows. *Arch Exp Veterinarmed.* 1990; 44(1):157-62.
- [34] De Boer G, Buchanan-Smith JG, Macleod GK, Walton JS. Responses of dairy cows fed alfalfa silage supplemented with phosphorus, copper, zinc, and manganese. *J Dairy Sci* 1981;64:2370–7.

[35] Call JW, Butcher JE, Shupe JL, Lamb RC, Boman RL, Olson AE. Clinical effects of low phosphorus concentrations in feed given to lactating dairy cows. *Anim Vet Res* 1987; 48:133-6.

[36] Brodison JA, Goodall EA, Armstrong JD, Givens DI, Gordon FJ, McCaughey WJ, et al. Influence of dietary phosphorus on the performance of lactating dairy cattle. *J Agric Sci (Camb)* 1989;112:303-11.

[37] Soto P, Natzke RP, Hansen PJ. Identification of possible mediators of embryonic mortality caused by mastitis: actions of lipopolysaccharide, prostaglandin F₂alpha, and the nitric oxide generator, sodium nitroprusside dihydrate, on oocyte maturation and embryonic development in cattle. *Am J Reprod Immunol.* 2003;50(3):263-72.

[38] Soto P, Natzke RP, Hansen PJ. Actions of tumor necrosis factor-alpha on oocyte maturation and embryonic development in cattle. *Am J Reprod Immunol.* 2003;50(5):380-8.

[39] Hansen PJ, Soto P, Natzke RP. Mastitis and fertility in cattle - possible involvement of inflammation or immune activation in embryonic mortality. *Am J Reprod Immunol.* 2004;51(4):294-301.

[40] Dunne LD, Diskin MG, Boland MP, O'Farrell KJ, Sreenan JM. Nutrition and embryo survival in cattle. *Ir J Agric Food Res* 1997;36: 95.

[41] Yaakub H, O'Callaghan D, Boland MP. Effect of type and quantity of concentrates on superovulation and embryo yield in beef heifers. *Theriogenology.* 1999;51(7) :1259-66.

[42] Yaakub H., O'Callaghan D., O'Doherty J. V., Hyttel P. Effect of dietary intake on follicle numbers and oocyte morphology in unsuperovulated and superovulated ewes, *Theriogenology.* 1997;47 (1): 182.

[43] Boland MP, Lonergan P, O'Callaghan D. Effect of nutrition on endocrine parameters, ovarian physiology, and oocyte and embryo development. *Theriogenology.* 2001; 55(6):1323-40.

[44] Knowlton KF, Herbein JH, Meister-Weisbarth MA, Wark WA. Nitrogen and phosphorus partitioning in lactating Holstein cows fed different sources of dietary protein and phosphorus. *J Dairy Sci.* 2001;84(5):1210-7.

[45] Rosol TJ, Capen CC. In Calcium-regulating hormones and diseases of abnormal mineral (Ca, P, Mg), Kaneko JJ (Ed.) *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*, Academic Press C.A., 1997, pp. 619-687.

[46] Naor Z, Catt KJ. Mechanism of action of gonadotropin-releasing hormone. Involvement of phospholipid turnover in luteinizing hormone release. *J Biol Chem.* 1981;256(5):2226-9.

[47] Shemesh M, Hansel W, Strauss JF 3rd. Calcium-dependent, cyclic nucleotide-independent steroidogenesis in the bovine placenta. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1984;81(20):6403-7.

[48] Arechiga CF, Vazquez-Flores S, Ortiz O, Hernandez-Ceron J, Porras A, McDowell LR, Hansen PJ. Effect of injection of beta-carotene or vitamin E and selenium on fertility of lactating dairy cows. *Theriogenology.* 1998;50(1):65-76.

[49] Jukola E, Hakkarainen J, Saloniemi H, Sankari S. Blood selenium, vitamin E, vitamin A, and beta-carotene concentrations and udder health, fertility treatments, and fertility. *J Dairy Sci.* 1996;79(5):838-45.

[50] Minervini F, Dell'Aquila ME, Maritato F, Minoia P. Toxic effects of the mycotoxin zearalenone and its derivatives on in vitro maturation of bovine oocytes and 17 beta-estradiol levels in mural granulosa cell cultures. *Toxicol In Vitro.* 2001;15(4-5):489-95.

[51] Weaver GA, Kurtz HJ, Behrens JC, Robison TS, Seguin BE, Bates FY, Mirocha CJ. Effect of zearalenone on the fertility of virgin dairy heifers. *Am J Vet Res.* 1986;47(6):1395-7.

Table 1: Relationship between TE and biochemical blood parameters. Significant variables (*) at the liberal alpha level of 0.15 were then included in a multivariate model.

Parameter	mean±STD	Chi-Square	P
Mg (mmol/L)	0.95±0.09	8.69	0.0032*
P (mmol/L)	2.04±0.36	6.09	0.0136*
K (mmol/L)	4.46±0.31	5.11	0.0237*
CK (U/L)	150.3±313.5	4.03	0.0446*
CO ₂ (mmol/L)	25.84±1.30	2.31	0.1281*
Glo (g/L)	38.26±7.78	2.14	0.1435*
Glu (mmol/L)	3.34±0.38	1.58	0.2092
BHB (mmol/L)	0.62±0.29	0.20	0.6560
Urea (mmol/L)	5.09±1.01	0.05	0.8239
Alb (g/L)	35.24±2.18	1.68	0.1951
TP (g/L)	73.50±6.56	1.65	0.1986
Ca (mmol/L)	2.33±0.11	1.00	0.3167
Cu (µmol/L)	15.25±2.94	1.01	0.3142
Zn (µmol/L)	16.31±2.49	1.12	0.2891
Se (µmol/L)	0.07±0.02	0.19	0.6601
GPXs (U/L)	447.1±197.5	1.14	0.2856
Caro (µmol/L)	2.59±0.74	0.01	0.9250
Chol (mmol/L)	4.58±1.58	0.47	0.4943
GGT (U/L)	26.45±6.84	1.29	0.2558
AST (U/L)	66.69±19.56	0.06	0.8100
Na (mmol/L)	138.4±1.8	0.60	0.4384
Cl (mmol/L)	97.97±2.22	0.53	0.4679
Age (month)	78.16±28.77	0.37	0.5433
DIM	116.6±72.9	0.32	0.5712

Table 2: Biochemical blood parameters significantly associated with the number of TE.

Parameter	Estimate	Std Error	Chi-Square	P
Mg (mmol/L)	3.8971	1.3484	7.97	0.0048
CK (U/L)	-1.4701	0.6024	6.43	0.0112
K (mmol/L)	0.7073	0.3444	4.08	0.0434

Table 3: Relationship between TE and feed mycotoxins concentrations.

Parameter	mean±STD	Chi-Square	P
Vomitoxin (ppb)	302.3±14.6	1.87	0.1710
Zealenone (ppb)	174.1±120	0.16	0.6855
T2 toxin (ppb)	31±10.3	1.31	0.2523

CHAPITRE 4

**Centroid classification of blood parameters related to globulin concentrations of
dairy cows.**

Younès Chorfi, Vincent Girard, Anne Lanevschi-Pietersma, Armand Tremblay.

Background: Serum globulin is a component of the cow's humoral immune status and could be related to other serum biochemical and hematological parameters. **Objectives:** To aggregate serum globulin observations into distinct categories: hypoglobulinemic (GLO^-), normal (GLO^0) and hyperglobulinemic (GLO^+) and investigate relationship between serum globulin and other biochemical hematological parameters using two classification methods: distances to cluster centroids and discriminant analysis. **Methods:** Blood samples of 5893 adult Holstein cows presented to the Université de Montréal veterinary hospital between 1993-2003, for evaluation of infectious or metabolic diseases were analyzed for: glucose (Glu), Urea, cholesterol (Chol), albumin (Alb), total protein (TP), globulin, total bilirubin (TBil), Ca, P, Mg, aspartate aminotransferase (AST), gamma glutamyl transferase (GGT), alanine aminotransferase (ALT), creatinine (Crea) creatinine kinase (CK), alkaline phosphatase (ALP), Na, K, Cl and CO_2 . EDTA-preserved blood samples were analyzed for Fibrinogen (Fb), hematocrit (HCT), hemoglobin concentration (Hb), mean corpuscular volume (MCV) and red blood cells (RBC), lymphocytes (Lym), neutrophils (Neutro), monocytes (Mon) and total platelets (PLT) counts. Centroid and discriminant analysis were used to classify and analyze the data. **Results:** The error rate to classify test group (N=2609) was 49% for discriminant criterion and 39% for centroid classification. This centroid classification revealed that serum concentration of Fb and Neutro and Lym counts were significantly lower in GLO^0 than for the GLO^+ ($p < .0001$, $p < .0001$ and $p = 0.0019$ respectively) and significantly higher than for GLO^- ($p = 0.014$, $p = 0.0002$ and $p < .0001$). In comparison to GLO^0 , Na and Cl concentrations were higher for GLO^- ($p = 0.0002$ and $p = 0.0008$ respectively) and lower for GLO^+ ($p = 0.05$ and $p = 0.0005$ respectively). Serum concentration of P and

RBC count were significantly higher in GLO⁻ than in GLO⁰ ($p<.0001$ and $p=0.007$ respectively) and serum concentrations of Crea and Ca were significantly lower in GLO⁺ than in GLO⁰ ($p=0.001$ and $p=0.02$ respectively). **Conclusion:** this study demonstrated that the centroid method was more successful than the linear discriminant function to describe how different blood parameters varied with high or low globulin concentration.

Key words: bovine, globulins, centroid method, discriminant method, biochemical parameters.

Introduction

Interpretation of individual animal test results is generally straightforward. The serum values of an individual are compared to reference intervals established by the laboratory. These consist of 95% confidence intervals of test results from 100 or more clinically healthy animals. Therefore with interpretations relying on a single parameter, serum samples are abnormal once below or above this confidence interval (Farver, 1997).

Serum globulin concentration has been proposed as a valuable indicator of dairy cow's humoral immune status due to the importance of γ -globulins in their composition (Misra et al., 1980; Yeotikar et al., 2003; Chorfi et al., 2004). But other blood parameters such as selenium, copper and zinc are also affected by the animals' immunological status (Spears 2000; Meglia et al., 2001). However, interpretations based on confidence intervals of multiple parameters are more difficult than those using a single parameter (Kida, 2003; Kida, 2002a; Kida, 2002b). The objective of this study was therefore to compare two methods representative of variations of multiple blood parameters and test their efficiencies in reproducing the interpretation based on serum globulin concentrations.

Methods

Between 1993-2003, 5893 adult Holstein cows having reached different lactational stages were admitted to the Université de Montréal veterinary hospital for evaluation of infectious or metabolic diseases. Approximately 8 ml of blood were collected by jugular or coccygeal venipuncture into two Vacutainer tubes, either with or without EDTA, for biochemical and hematological analyses (Becton Dickenson, Rutherford, NJ, USA).

1- Serum biochemical and hematological analyses

Serum samples were analyzed on a Beckman-Synchron CX5 autoanalyzer using Beckman reagents (Beckman Clinical System, Fullerton, CA, USA). Glucose (Glu), cholesterol (Chol), albumin (Alb), total protein (TP), total bilirubin (TBil), calcium (Ca), phosphorus (P) and magnesium (Mg) were measured by colorimetric end-point methods. Kinetic-enzymatic methods were used to evaluate activities of aspartate aminotransferase (AST), gamma-glutamyl-transferase (GGT), alanine aminotransferase (ALT), creatinine (Crea), creatinine kinase (CK), alkaline phosphatase (ALP) and BUN concentrations. Globulin concentrations were estimated as difference between colorimetrically determined total protein and albumin concentrations. Sodium (Na), potassium (K), chloride (Cl) and carbon dioxide (CO₂) concentrations were determined with ion specific electrodes (ISE) (Eicher et al., 1999).

EDTA-preserved blood samples were analyzed for hematocrit (HCT), hemoglobin concentration (Hb), mean corpuscular volume (MCV) and red blood cells (RBC), lymphocytes (Lym), neutrophils (Neutro), monocytes (Mon), total platelets (PLT)

counts using the Abbott Cell Dyn 3500 Automated Hematology System (Abbott Diagnostic Division, CA, USA) (Omer et al., 2002). For fibrinogen concentrations (Fb), samples were vortexed before depositing 100 μ L of sample plasma into a microhematocrit tube. Serum Fb concentrations were then determined using heat precipitation (60°C for 3 min) and refractometry as described by Duncan et al. (1994).

2- Statistical analysis

2-1 Data normalization and standardization and categories determination

Blood parameters were normalized through a log transformation when kurtosis exceeded 4. Observations with missing log values were eliminated and the remaining 5806 observations were then standardized using Stdsize procedure (SAS 2000). Standardized globulin values higher than +1 and lower than -1 were grouped in hyper- or hypoglobulinemic categories (GLO^+ , GLO^-) and 3197 randomly chosen values between -1 and 1 were excluded from the normal category (GLO^0) to form three categories with similar frequencies of observations.

2-2 Discriminant classification

A subset of quantitative blood parameters that best reveals differences among GLO^+ , GLO^0 and GLO^- was selected using SAS Stepdisc procedure (SAS, 2000). With these selected parameters, the Discrim procedure (SAS, 2000) produced a discriminant function from a random selection of 500 observations. The function was then tested on the remaining 2609 observations. The efficiency of the discriminant function was measured as the percentage of correctly classified observations.

2-3 Centroid classification

A canonical discriminant analysis (SAS 2000) was used to find three linear combinations of blood parameters other than globulin (CAN1, CAN2, CAN3) that provide maximal separation between GLO categories. These linear combinations are observations that summarize between-class variation and can be used as coordinates on which a cluster analysis could be applied. Then, mean coordinates of GLO categories were used as seeds for the Fastclus procedure (SAS 2000) which placed each observation into one of the three categories of clusters, such that blood parameters in a given cluster tended to be similar to each other in some sense, and blood parameters in different clusters tend to be dissimilar.

Extreme values were iteratively eliminated until the Fasclus procedure produced three well defined clusters with few misclassified observations. These homogeneous clusters were used to describe blood parameter differences between categories as described later. Frequency of GLO categories in each cluster was used to obtain the misclassified amount of observations.

Cluster centroid coordinates obtained from the Fastclus procedure were then used to obtain Euclidian distances for all 2609 observations:

$$Y_{ij} = \sqrt{\sum (CAN_{ik} - CENTER_{jk})^2}$$

where:

Y_{ij} are Euclidian distances of i observation to each of j cluster centroid of j globulin category;

CAN_{ik} , with $k=1$ to 3 , individual canonical values of the i observation,

$CENTER_{jk}$, k canonical coordinates of the j cluster centroid.

The least of the three Euclidian distances to GLO cluster centroids, calculated for each observation, identified in which GLO category the observation was to be classified.

For some observations, two Euclidian distances were within one standard error of the centroid parameters. These observations were consequently classified in either categories, normal-hyperglobulinemic or normal- hypoglobulinemic and were not considered in the relationship between globulin and blood parameters variations.

2-4 Relationship between globulin and blood parameters variations

Observations close to the cluster centroids were used to evaluate differences between GLO^- , GLO^0 and GLO^+ blood parameters means using the GLM procedure (SAS 2000).

Results and Discussion

1- Discriminant classification

Parameters best suitable ($P < 0.05$) to discriminate between GLO categories were Na, Cl, MCV, Fb, ALP and Neutro. Probability of misclassified observations, i.e. test error rate, was in average 49% and respectively 65%, 53% and 31% for GLO⁰, GLO⁻ and GLO⁺ categories. The large error rate in GLO⁻ results from 29% of GLO⁻ being misclassified as GLO⁺. As a consequence, discriminant criterion do not seems to help the interpretation of multiple parameters involved in the globulin variation.

2- Centroid classification

Iterative elimination of observations at the cluster periphery produced three well defined clusters (Figure 1) representing 426 observations. With the resulting centroid coordinates, error rate of centroid classification of the 2609 observations was 39%. Error rates were respectively 53%, 36% and 33% for GLO⁰, GLO⁻ and GLO⁺ categories. In contrast to the discriminant classification, only 11% of the GLO⁻ were misclassified as GLO⁺. Since Euclidian distances to cluster centroids were more successful to classify whole observations than discriminant classification, observations close to the cluster centroids were used to describe how blood parameters vary with globulin.

3- Blood parameters variations

Within the 426 observations most close to cluster centroids, serum concentration of Fb, Na, Cl, P, Crea and Ca and Neutro, Lym and RBC counts of GLO⁰ were significantly different from GLO⁺ and GLO⁻ categories (Table 1). Serum concentrations of Glu, Chol, Alb, TBil, Mg, BUN, K, CO₂, Hb, and serum activities

of AST, GGT, ALT, ALP, and CK and HCT, MCV and counts of Mon and PLT had no significant differences between GLO categories.

Compared to GLO⁰, serum concentrations of Fb were significantly lower than for the GLO⁺ ($p < .0001$) and significantly higher than for the GLO⁻ ($p = 0.014$). Also, Fb was selected by discriminant function as a parameter to classified GLO categories. Fb is an acute-phase protein (APP) that is synthesized by liver parenchymal cells and released into the bloodstream in response to a variety of stressors (Hickey et al. 2003, Mackiewicz, 1997). It was expected in this study that the GLO⁺ would have higher concentrations of Fb because α -1, α -2 β -globulins are APPs (Kaneko 1997). Carter et al. (2002) showed that antimicrobial-treated cattle had significantly decreased serum Fb concentrations, reflecting a resolution of the inflammatory response.

In comparison to GLO⁰, Serum concentrations of Na and Cl were higher for GLO⁻ ($p=0.0002$ and $p=0.0008$ respectively) and lower for GLO⁺ ($p=0.05$ and $p= 0.0005$ respectively). Since an increase of colloid osmotic pressure is associated with high blood concentration of albumin and globulin (Thomas and Brown, 1992), the resulting movement of water from tissues to plasma lead to hemodilution and decrease in Na and Cl concentrations (Ahlqvist, 2004; Petersen et al., 2004). Hemodilution might also explain the higher RBC count in GLO⁻ compared to GLO⁰ (Warner, 2000); however RBC count was not different in GLO⁺ compared to GLO⁰.

As expected, in GLO⁰ Neutro and Lymp counts were significantly lower than for the GLO⁺ ($p < .0001$ and $p=0.0019$ respectively) and significantly higher than for the GLO⁻ ($p = 0.0002$ and $p < .0001$ respectively). Indeed, this finding is in agreement with many studies showing that during inflammation or infection, concentrations of

serum globulin, Neutro and Lymp were positively correlated (Knowles et al., 2000; Cheryk et al., 1998; Rupic et al., 1998).

GLO⁻ had significantly higher concentrations of serum P than GLO⁰ ($p < 0.0001$). This finding is not in agreement with some studies that have shown a relationship between high serum P and high serum globulin concentration (Olson et al., 1983; Long et al., 1999; Parra et al., 1999). GLO⁺ had a significantly lower Crea concentration than the normal group ($p = 0.001$). This result is in agreement with findings by Basoglu et al. (2004) showing that Crea concentration is inversely correlated with Glo in neonatal calves with presumed septicaemia. Also, prolonged consumption of endophyte-infected tall fescue was associated with increased serum Crea concentration and decreased Glo (Schultze et al., 1999).

GLO⁺ had a significantly higher Ca concentration than GLO⁰ ($p = 0.02$). Calcium can bind serum globulin and hyperglobulinemia may elevate the total serum Ca (Carlson, 1997) however, like Crea, this variation was not found between GLO⁻ and GLO⁰.

In conclusion, this study demonstrated that the centroid method was more successful than the linear discriminant function to describe how different blood parameters varied with high or low globulin concentration. Centroid method can help to deal with multiple blood parameters responsible of metabolic abnormalities in dairy cows.

References

- Ahlqvist J. Equation for osmotic pressure of serum protein (fractions). *J Appl Physiol*. 2004;96(2):762-4.
- Basoglu A, Sen I, Sevinc M, Simsek A. Serum concentrations of tumor necrosis factor-alpha in neonatal calves with presumed septicemia. *J Vet Intern Med*. 2004;18(2):238-41.
- Carlson GP. Fluids, Electrolytes, and Acid-Base Balance. In: Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML, eds. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. San Diego, CA: Academic Press; 1997:117-138.
- Carter JN, Meredith GL, Montelongo M, Gill DR, Krehbiel CR, Payton ME, Confer AW. Relationship of vitamin E supplementation and antimicrobial treatment with acute-phase protein responses in cattle affected by naturally acquired respiratory tract disease. *Am J Vet Res*. 2002;63(8):1111-7.
- Cheryk LA, Hooper-McGrevy KE, Gentry PA. Alterations in bovine platelet function and acute phase proteins induced by *Pasteurella haemolytica* A1. *Can J Vet Res*. 1998;62(1):1-8.
- Chorfi Y, Lanevski-Pietersma A, Girard V, Tremblay A. Evaluation of variation in serum globulin concentrations in dairy cattle. *Vet Clin Pathol*. 2004;33(3):122-7.
- Duncan JR, Prasse KW, and Mahaffey EA. 1994. *Veterinary Laboratory Medicine: Clinical Pathology*. Iowa State Univ. Press, Ames.
- Eicher R, Liesegang A, Bouchard E, Tremblay A. Effect of cow-specific factors and feeding frequency of concentrate on diurnal variations of blood metabolites in dairy cows. *Am J Vet Res*. 1999;60(12):1493-9.
- Farver TB. Concepts of normality in clinical biochemistry. In: Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML, eds. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. San Diego, CA: Academic Press; 1997:117-138.
- Hickey MC, Drennan M, Earley B. The effect of abrupt weaning of suckler calves on the plasma concentrations of cortisol, catecholamines, leukocytes, acute-phase proteins and in vitro interferon-gamma production. *J Anim Sci*. 2003;81(11):2847-55.
- Kaneko JJ. Serum proteins and dysproteinemias. In: Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML, eds. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. San Diego, CA: Academic Press; 1997:117-138.
- Kida k. Use of every ten-day criteria for metabolic profile test after calving and dry off in dairy herds. *J Vet Med Sci*. 2002a;64(11):1003-10.

Kida k. The metabolic profile test: its practicability in assessing feeding management and periparturient diseases in high yielding commercial dairy herds. *J Vet Med Sci.* 2002b;64(7):557-63.

Kida k. Relationships of metabolic profiles to milk production and feeding in dairy cows. *J Vet Med Sci.* 2003;65(6):671-7.

Knowles TG, Edwards JE, Bazeley KJ, Brown SN, Butterworth A, Warriss PD. Changes in the blood biochemical and haematological profile of neonatal calves with age. *Vet Rec.* 2000;147(21):593-8.

Long RJ, Zhang DG, Wang X, Hu ZZ, Dong SK. Effect of strategic feed supplementation on productive and reproductive performance in yak cows. *Prev Vet Med.* 1999;38(2-3):195-206.

Mackiewicz A. Acute phase proteins and transformed cells. *Int Rev Cytol.* 1997;170:225-300.

Meglia GE, Johannisson A, Petersson L, Waller KP. Changes in some blood micronutrients, leukocytes and neutrophil expression of adhesion molecules in periparturient dairy cows. *Acta Vet Scand.* 2001;42(1):139-50.

Misra SC, Sharma KN, Mehrotra PN. Note on principal serum protein fractions of crossbred calves following foot and mouth disease vaccination. *Indian J Anim Sci* 1980 50, 764-768

Olson DP, South PJ, Hendrix K. Serum chemical values in hypothermic and rewarmed young calves *Am J Vet Res.* 1983;44(4):577-82.

Omer OH, El-Malik KH, Mahmoud OM. Haematological profiles in pure bred cattle naturally infected with *Theileria annulata* in Saudi Arabia. *Vet Parasitol.* 2002;107(1-2):161-8.

Parra O, Ojeda A, Combellas J, Gabaldon L, Escobar A, Martinez N, Benezra M. Blood metabolites and their relationship with production variables in dual-purpose cows in Venezuela. *Prev Vet Med.* 1999;38(2-3):133-45.

Petersen HH, Nielsen JP, Heegaard PM. Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. *Vet Res.* 2004;35(2):163-87.

Rupic V, Ivandija L, Luterotti S, Dominis-Kramaric M, Bozac R. Plasma proteins and haematological parameters in fattening pigs fed different sources of dietary zinc. *Acta Vet Hung.* 1998;46(1):111-26.

Schultze AE, Rohrbach BW, Fribourg HA, Waller JC, Oliver JW. Alterations in bovine serum biochemistry profiles associated with prolonged consumption of endophyte-infected tall fescue. *Vet Hum Toxicol.* 1999;41(3):133-9.

Spears W. Micronutrients and immune function in cattle. Proc Nutr Soc. 200;59(4):587-94.

Thomas LA, Brown SA. Relationship between colloid osmotic pressure and plasma protein concentration in cattle, horses, dogs and cats. Am J Vet Res. 1992;53(12):2241-4.

Warner T. and Harrus S.: Anemia of inflammatory disease. In : Schalm's Veterinary Hematology, 5th ed., BF Feldman, JG Zinkl, NC Jain eds., pp. 205-209, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2000.

Yeotikar PV, Bapat ST, Bilolikar SC, Kulkarni SS. Metabolic profile of healthy cattle and cattle affected by foot-and-mouth disease. Vet Rec. 2003;153(1):19-20.

Figure captions

Figure 1: Observation dispersion in GLO categories: GLO^- (\square), GLO^0 (\circ) and GLO^+ (Δ). Each point corresponds to observation distance to cluster centroids and plotted against two canonical coordinates (CAN1, CAN2).

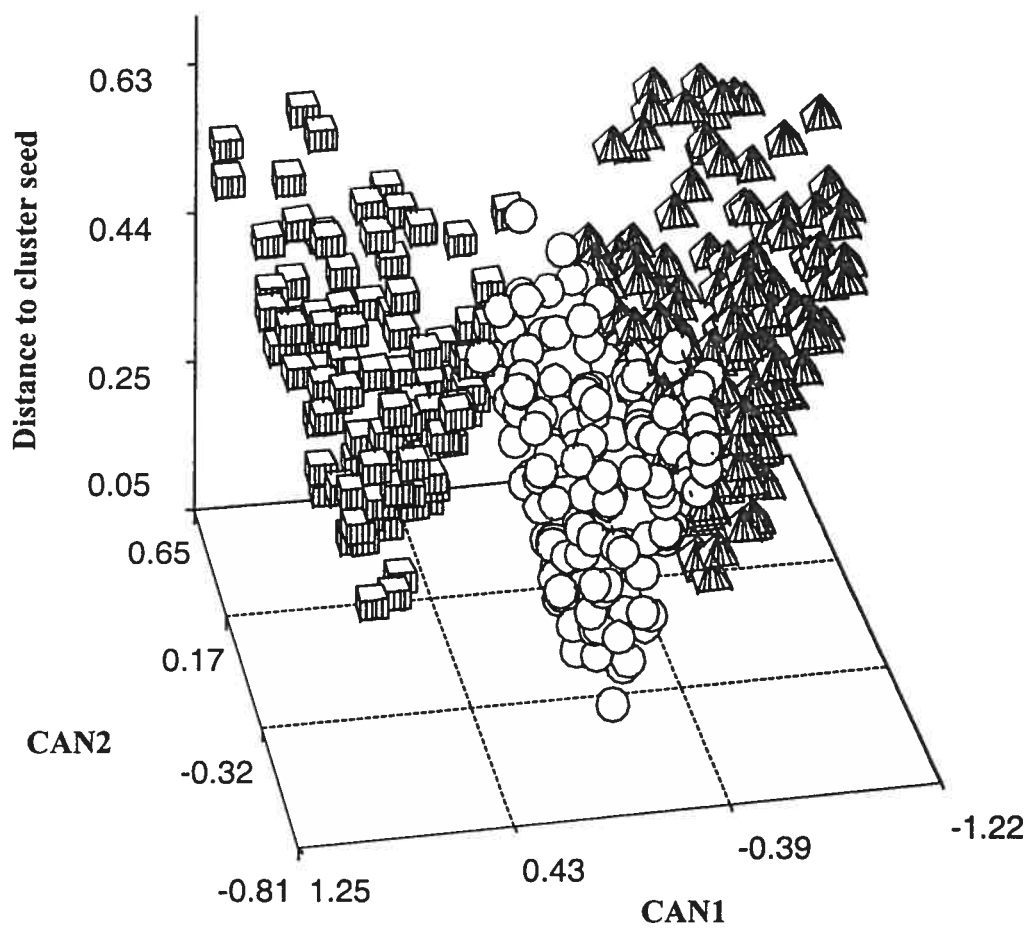


Table 1: Means \pm MSE of blood parameter concentrations in GLO categories.

Blood parameters	GLO categories			MSE	P value of contrasts	
	GLO ⁻	GLO ⁰	GLO ⁺		GLO ⁻ vs GLO ⁰	GLO ⁰ vs GLO ⁺
Glo (g/L)	21.3 \pm 0.07	32.3 \pm 0.16	49.2 \pm 0.22	4.83	<.0001	<.0001
Fb (g/L)	5.17 \pm 0.08	5.8 \pm 0.08	7.11 \pm 0.10	1.90	0.014	<.0001
Neutro (x 10 ⁹ /L)	42.42 \pm 1.03	51.15 \pm 0.82	59.03 \pm 0.71	17.13	0.0002	<.0001
Lymp (x 10 ⁹ /L)	31.64 \pm 0.62	38.95 \pm 0.82	43.98 \pm 0.82	15.50	<.0001	0.0019
Na (mmol/L)	141.44 \pm 0.16	139.89 \pm 0.14	139.21 \pm 0.12	3.00	0.0002	0.05
Cl (mmol/L)	104 \pm 0.25	102 \pm 0.23	100.4 \pm 0.21	4.58	0.0008	0.0005
P (mmol/L)	2.1 \pm 0.02	1.8 \pm 0.02	1.75 \pm 0.02	0.50	<.0001	0.38
RBC (x 10 ¹² /L)	6.67 \pm 0.10	6.19 \pm 0.06	6.02 \pm 0.04	1.30	0.007	0.30
Crea (μ mol/L)	98.68 \pm 1.5	97.69 \pm 1.54	86.80 \pm 1.33	29.90	0.81	0.001
Ca (mmol/L)	2.21 \pm 0.02	2.20 \pm 0.02	2.28 \pm 0.01	0.30	0.80	0.02

CHAPITRE 5

III. Discussion et conclusion générale

La concentration en globulines sériques peut varier significatives selon la méthode analytique utilisée. La concentration en globulines sériques est calculée par la soustraction de la concentration sérique des protéines totales de celle de l'albumine qui sont mesurées par la méthode colorimétrique. Cette méthode analytique n'est pas aussi sensible que l'électrophorèse et elle peut sous-estimer la concentration des globulines sériques. En effet, il y a un potentiel d'interférence, car le bromocrésol, utilisé dans la mesure de l'albumine, peut se lier aux fractions des globulines, en particulier avec les fractions α et β (Sidki et al., 1998; Stokol et al., 2001). Les cas d'hypoglobulinémie, mesurée par colorimétrie, doivent prendre en considération cette surestimation de la concentration en albumine sérique au détriment de celle des globulines. Cette surestimation peut atteindre en moyenne 7 g/L si on compare la méthode colorimétrique à celle électrophorétique. Contrairement à la colorimétrie, l'électrophorèse est considérée comme méthode de référence dans la détermination des fractions protéiques.

Dans notre étude, les γ -globulines représentent la fraction principale des globulines sériques (55%) alors que les fractions α -1, α -2, et β -globuline ne représentent que 11%, 16% et 18% respectivement. Ces résultats sont similaires à ceux trouvés par Tumbleson et al. (1973). La concentration en globulines colorimétriques a montré une bonne corrélation avec celle des globulines électrophorétiques totales ($r^2= 0.89$, $p < 0.001$), avec les γ -globulines ($r^2= 0.87$, $p < 0.001$) et avec les IgG (déterminés par immunodiffusion radiale) ($r^2= 0.91$, $p < 0.001$). À l'inverse, cette corrélation était faible avec les fractions α et β -globuline (r^2

= 0.14, $p > 0.05$ et $r^2 = 0.04$, $p > 0.05$, respectivement). Chez les vaches en lactation, les concentrations en γ -globulines et en IgG ne montrent pas de différences significatives par rapport à celles des vaches tarées, cependant en moyenne ces concentrations sont légèrement plus basses. Cette différence peut être expliquée par le drainage des globulines sériques par la glande mammaire durant la lactation (Larson, 1992).

Dans notre étude, il a été constaté que la concentration en globulines sériques subit des variations au cours de la journée. La différence entre la concentration du matin par rapport à celle du soir peut être due à un métabolisme normal des globulines ou bien à une adaptation aux variations que peut subir l'albumine sérique. En effet, une hypoalbuminémie ou une réduction de la pression oncotique stimule la production ou réduit le catabolisme des globulines sérique (Kaysen, 1993; Harrus et al., 1999). La concentration en globulines sériques présente une grande stabilité au cours d'une période de 15 semaines durant et ce, chez des vaches de même stade de lactation, avec un environnement sanitaire et alimentaire stable. Le site choisi pour le prélèvement sanguin peut influencer la concentration en globulines sériques. Le sang recueilli par ponction jugulaire contient une concentration plus élevée en globulines sériques par rapport à celui recueilli par ponction des vaisseaux coccygiens. L'interprétation de la concentration en globulines doit prendre en considération le moment du prélèvement durant la journée et le site de la prise sanguine surtout pour des valeurs considérées marginales (<29 g/L ou >41 g/L) par rapport à des valeurs de références utilisées dans le laboratoire.

Les globulines sériques représentent une partie de la réponse immunitaire humorale pouvant influencer la fertilité de la vache et le déroulement de la fécondation et de la gestation (Soto et al., 2003). L'influence des globulines sériques sur le nombre d'embryons transférables a été étudiée chez 49 vaches laitières. L'analyse statistique utilisée pour le traitement des données a montré, dans la sélection préliminaire, une relation statistique entre la concentration en globulines sériques et le nombre d'embryons transférables ($p= 0.14$). La sélection préliminaire a été mise à un degré de signification alpha libéral de 0.15 pour former un modèle statistique (Dohoo et al., 2003). Ce dernier a décelé une corrélation significative entre le nombre d'embryons transférables et la concentration sérique en Mg et en K et avec l'activité sérique de la CK.

Dans cette étude le Mg a été positivement corrélé avec le nombre d'embryons transférables. Ce résultat supporte une étude chez la vache laitière qui a montré que le Mg érythrocytaire était positivement corrélé avec la fertilité (Mulei et al., 1988). Par ailleurs, la mortalité embryonnaire chez des rates Sprague-Dawley carencées en Mg peut être prévenue par une supplémentation adéquate en Mg dans l'eau de boisson (Bubeck et al., 1994).

Dans notre étude, le K a été positivement corrélé avec le nombre d'embryons transférables. Quoiqu'il y a peu de travaux qui se sont consacrés à la relation entre le K sérique et le nombre d'embryons transférables, le K reste un élément important des milieux de culture pour le développement *in vitro* des embryons bovins (Wirtu et al., 2004) permettant ainsi un taux élevé d'implantation embryonnaire chez les vaches

receveuses (Roblero et al., 1986). Ces résultats suggèrent que le K joue un rôle important dans la viabilité et l'implantation embryonnaire.

L'augmentation de l'activité sérique de la CK reflète classiquement une lésion musculaire. Sattler et Furll (2004) ont montré une augmentation de l'activité de la CK pendant l'endométrite sévère chez la vache laitière. Les vaches gestantes montrent une augmentation de la CK sérique par rapport aux vaches non gestantes causée par une irritation utérine. Ces observations supportent l'association que nous avons trouvée entre la concentration élevée de la CK et le nombre réduit d'embryons transférables.

Des études utilisant la mammite comme modèle expérimental indiquent que les maladies infectieuses ou la forte activation du système immunitaire en dehors de l'appareil reproducteur sont parmi les causes de pertes embryonnaires (Soto et al., 2003). L'activité immunitaire humorale et cellulaire peut être reliée à une perte embryonnaire durant la pré-implantation (Hansen et al., 2004). Cependant dans le modèle multivariable de notre étude, la concentration des globulines sériques ne montre pas de relation significative avec le nombre d'embryons transférables.

L'étude des variations des globulines sériques par rapport aux paramètres biochimiques et hématologiques est complexe en raison d'une importante multicolinéarité entre les différents paramètres sanguins. Une approche statistique, en l'occurrence la méthode centroïde, a été développée en réponse à la difficulté que pose l'interprétation des résultats d'un test sanguin. Pour se faire, 5893 résultats de différents paramètres biochimiques et hématologiques de vaches Holstein

hospitalisées ont été analysés. Dans cette étude la méthode centroïde a été comparée à une autre méthode de classification soit la méthode discriminante. Avec un taux d'erreur inférieur, l'approche centroïde s'est révélée meilleure que la méthode discriminante pour classer les observations. Par conséquent, la distance par rapport au centre des catégories (GLO^- , GLO^0 et GLO^+) a été utilisée pour décrire les variations des paramètres sanguins par rapport aux globulines. La concentration sérique du fibrinogène (Fb) et le nombre des neutrophiles (Neutro) et des lymphocytes (Lymp) de la catégorie normale en globuline (GLO^0) étaient significativement bas par rapport à la catégorie hyperglobulinémique (GLO^+) et significativement élevés par rapport à la catégorie hypoglobulinémique (GLO^-). Une augmentation simultanée du Fb et des globulines sériques est normale car le Fb, comme α -1, α -2 et β -globuline, est une protéine de la phase aiguë de l'inflammation synthétisée par le foie et libérée dans la circulation sanguine en réponse aux facteurs de stress (Hickey et al., 2003; Mackiewicz, 1997). En plus, Carter et al. (2002) ont montré que les bovins traités avec des antimicrobiens avaient des concentrations sériques significativement basses en Fb et en globulines, reflétant une baisse de la réponse inflammatoire. Aussi, pendant l'inflammation ou l'infection, la concentration sérique en globuline et le nombre des Neutro et des Lymp subissent une augmentation simultanée (Knowles et al., 2000 ; Cheryk et al, 1998 ; Rupic et al., 1998).

Une augmentation de la pression osmotique colloïdale est associée à une concentration sanguine élevée en l'albumine et en globuline (Thomas et Brown, 1992), le mouvement de l'eau des tissus vers le plasma provoque une hémodilution

réduisant ainsi les concentrations en Na et en Cl (Ahlqvist, 2004 ; Petersen et al., 2004). Ceci explique pourquoi les concentrations en sériques du Na et du Cl étaient plus élevées pour GLO⁻ et inférieures pour GLO⁺ par rapport à GLO⁰. L'hémodilution peut également expliquer le nombre élevé des globules rouges dans GLO⁻ comparé à GLO⁰ (Pyorala, 2003 ; Brown et al., 1994).

La relation entre les globulines et le P sériques est très peu rapportée dans la littérature. Dans cette étude, la catégorie GLO⁻ a présenté des concentrations significativement élevées de phosphatémie. Ce résultat est en désaccord avec quelques études qui ont constaté que les valeurs élevées de la phosphatémie étaient davantage associées à des globulines sériques élevées (Olson et al., 1983; Long et al., 1999; Parra et al., 1999). Plus de travaux de recherche devraient porter sur la phosphatémie et les globulines pour élucider cette relation.

Chez les animaux de la catégorie GLO⁺, la concentration en créatinine était significativement plus basse que ceux de GLO⁻. Ce résultat est en concordance avec celui de Basoglu et al. (2004) qui ont montré que les concentrations sériques de la créatinine sont inversement corrélées à celles des globulines sériques chez les veaux nouveaux-nés présentant des septicémies. De plus, chez les bovins, une consommation prolongée de la fétuque infectée par des endophytes a provoqué une baisse des globulines et augmentation de la créatinine sérique (Schultze et al., 1999). GLO⁺ a montré une concentration significativement plus élevée en Ca que GLO⁰. Le calcium se lie aux globulines sériques et une hyperglobulinémie peut élever le Ca sérique (Carlson, 1997).

En conclusion, parce que les γ -globulines constituent la fraction majeure des globulines sériques chez la vache laitière, la concentration des globulines totales par colorimétrie représentent bien les γ -globulines et les IgG sériques chez les sujets en bonne santé. Les valeurs des globulines sériques ne montrent pas de différences significatives entre les vaches en lactation et les vaches tarées, malgré une augmentation en faveur de ces dernières. Le moment de la prise sanguine et le site du prélèvement influencent la concentration des globulines sériques et ils doivent être pris en considération lors de l'interprétation des résultats.

Parmi les causes de mortalité embryonnaires durant la pré-implantation, les maladies infectieuses ou les fortes activations immunitaires humorales et cellulaires ont été souvent citées. Cependant dans le modèle multivariable de notre étude la concentration des globulines sériques ne présente pas de relation significative avec le nombre d'embryons transférables.

La méthode centroïde était meilleure que la fonction linéaire discriminante pour décrire les variations que subissent différents paramètres sanguins selon les concentrations des globulines. La méthode centroïde pourrait aider et faciliter l'analyse des les résultats de tests sanguins comprenant des paramètres multiples impliqués dans plusieurs entités pathologique notamment les pathologies métaboliques.

IV. Références

Adams RS, Stout WL, Kradel DC, Guss SB Jr, Moser BL, Jung GA. Use and limitations of profiles in assessing health or nutritional status of dairy herds. *J Dairy Sci.* 1978;61(11):1671-9.

Ahlqvist J. Equation for osmotic pressure of serum protein (fractions). *J Appl Physiol.* 2004 Feb;96(2):762-4.

Aziz E, Klesius PH. Effect of selenium deficiency on caprine polymorphonuclear leukocyte production of leukotriene B4 and its neutrophil chemotactic activity. *Am J Vet Res.* 1986;47(2):426-8.

Aziz ES, Klesius PH, Frandsen JC. Effects of selenium on polymorphonuclear leukocyte function in goats. *Am J Vet Res.* 1984;45(9):1715-8

Basoglu A, Sen I, Sevinc M, Simsek A. Serum concentrations of tumor necrosis factor-alpha in neonatal calves with presumed septicemia. *J Vet Intern Med.* 2004;18(2):238-41.

Baud L, Bellocq A, Philippe C, Fouqueray B. Low extracellular pH has a role in the induction of NO synthase type 2 in macrophages. *Bull. Acad. Natl. Med.* 181, 247-258. from tuberculosis sera. *J. Clin. Lab. Anal.* 1997;6, 194-200.

Beard JL. Iron biology in immune function, muscle metabolism and neuronal functioning. *J Nutr.* 2001;131(2S-2):568S-579S;

Beard, J.L., Dawson, H.D. Iron. In O'Dell, B.L., Sunde, R.A. Eds. *Handbook of nutritionally essential minerals.* New York: Marcel Dekker, Inc.1997: pages 275-334.

Bell AW, Bauman DE. Adaptations of glucose metabolism during pregnancy and lactation. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 1997;2(3):265-78.

Bell AW. Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation. *J Anim Sci.* 1995;73(9):2804-19.

Bendich A. Biological functions of dietary carotenoids. *Ann N Y Acad Sci.* 1993 31;691:61-7.

Bendich A. From 1989 to 2001: what have we learned about the "biological actions of beta-carotene"? *J Nutr.* 2004;134(1):225S-230S.

Berry MJ, Larsen PR. The role of selenium in thyroid hormone activation. *Endocrine Rev* 1992;13(2):207-220.

- Bidani A, Wang CZ, Saggi SJ, Heming TA. Evidence for pH sensitivity of tumor necrosis factor-alpha release by alveolar macrophages. *Lung*. 1998;176(2):111-21.
- Bindas EM, Gwazdauskas FC, Aiello RJ, Herbein JH, McGilliard ML, Polan CE. Reproductive and metabolic characteristics of dairy cattle supplemented with beta-carotene. *J Dairy Sci*. 1984 Jun;67(6):1249-55.
- Blecha, F., R. C. Bull, D. P. Olson, R. H. Ross, and S. Curtis. 1981. Effects of prepartum protein restriction in the beef cow on immunoglobulin content in blood and colostrum whey and subsequent immunoglobulin absorption by the neonatal calf. *J. Anim. Sci.* 53:1174-1180.
- Bouchard L, Blais S, Desrosiers C, Zhao X, Lacasse P. Nitric oxide production during endotoxin-induced mastitis in the cow. *J Dairy Sci*. 1999;82(12):2574-81.
- Boulanger V, Bouchard L, Zhao X, Lacasse P. Induction of nitric oxide production by bovine mammary epithelial cells and blood leukocytes. *J Dairy Sci*. 2001;84(6):1430-7.
- Bounous G, Kongshavn PA. Influence of dietary proteins on the immune system of mice. *J Nutr* 1982;112:1747-55.
- Boyne R, Arthur JR. Alterations of neutrophil function in selenium-deficient cattle. *J Comp Pathol*. 1979;89(1):151-8.
- Boyne R, Arthur JR. Effects of molybdenum or iron induced copper deficiency on the viability and function of neutrophils from cattle. *Res Vet Sci*. 1986;41(3):417-9.
- Boyne R, Arthur JR. Effects of selenium and copper deficiency on neutrophil function in cattle. *J Comp Pathol*. 1981;91(2):271-6.
- Brigelius-Flohe R, Traber MG. Vitamin E: function and metabolism. *FASEB J*. 1999;13(10):1145-55.
- Brock JH, Mulero V. Cellular and molecular aspects of iron and immune function. *Proc. Nutr. Soc.* 2000;59, 537-540.
- Brody, T. *Nutritional Biochemistry*, 2nd Edition. San Diego, CA: Academic Press, 1999: pages 739-760.
- Bronner F, Yost JH. Saturable and nonsaturable copper and calcium transport in mouse duodenum. *Am J Physiol*. 1985;249(1 Pt 1):G108-12.
- Brown SA, Dusza K, Boehmer J. Comparison of measured and calculated values for colloid osmotic pressure in hospitalized animals. *Am J Vet Res*. 1994;55(7):910-5.

Bubeck J, Haussecker H, Disch G, Spatling L, Classen HG. Potentiation of magnesium-deficiency-induced foetotoxicity by concomitant iron deficiency and its prevention by adequate supply via drinking water. *Magnes Res.* 1994;7(3-4):245-54.

Burk RF, Levander OA. Selenium. In Shils, M. et al. Eds. *Nutrition in Health and Disease*, 9th Edition. Baltimore: Williams & Wilkins, 1999: pages 265-276.

Burton GW, Traber MG, Acuff RV, Walters DN, Kayden H, Hughes L, Ingold KU. Human plasma and tissue alpha-tocopherol concentrations in response to supplementation with deuterated natural and synthetic vitamin E. *Am J Clin Nutr.* 1998;67(4):669-84.

Busa WB, Nuccitelli R. Metabolic regulation via intracellular pH. *Am J Physiol.* 1984;246(4 Pt 2):R409-38.

Calder PC, Grimble RF. Polyunsaturated fatty acids, inflammation and immunity. *Eur J Clin Nutr.* 2002;56 Suppl 3:S14-9.

Calder PC, Yaqoob P, Thies F, Wallace FA, Miles EA. Fatty acids and lymphocyte functions. *Br J Nutr.* 2002;87 Suppl 1:S31-48.

Cameron RE, Dyk PB, Herdt TH, Kaneene JB, Miller R, Bucholtz HF, Liesman JS, Vandehaar MJ, Emery RS. Dry cow diet, management, and energy balance as risk factors for displaced abomasum in high producing dairy herds. *J Dairy Sci.* 1998;81(1):132-9.

Cantorna MT, Nashold FE, Hayes CE. Vitamin A deficiency results in a priming environment conducive for Th1 cell development. *Eur. J. Immunol.* 1995;25, 1673-1679.

Cao Y, Maddox JF, Mastro AM, Scholz RW, Hildenbrandt G, Reddy CC. Selenium deficiency alters the lipoxygenase pathway and mitogenic response in bovine lymphocytes. *J Nutr.* 1992;122, 2121-2127.

Carlson GP. Fluids, Electrolytes, and Acid-Base Balance. In: Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML, eds. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. San Diego, CA: Academic Press; 1997:117-138.

Carman JA, Hayes CE. Abnormal regulation of IFN-gamma secretion in vitamin A deficiency. *J. Immunol.* 1991;147, 1247-1252.

Carter JN, Meredith GL, Montelongo M, Gill DR, Krehbiel CR, Payton ME, Confer AW. Relationship of vitamin E supplementation and antimicrobial treatment with acute-phase protein responses in cattle affected by naturally acquired respiratory tract disease. *Am J Vet Res.* 2002;63(8):1111-7.

Cerone SI, Sansinanea AS, Streitenberger SA, Garcia MC, Auza NJ. Cytochrome c oxidase, Cu,Zn-superoxide dismutase, and ceruloplasmin activities in copper-deficient bovines. *Biol Trace Elem Res.* 2000;73(3):269-78.

Cheryk LA, Hooper-McGrevy KE, Gentry PA. Alterations in bovine platelet function and acute phase proteins induced by *Pasteurella haemolytica* A1. *Can J Vet Res.* 1998;62(1):1-8.

Chesters JK. Zinc. In *Handbook of Nutritionally Essential Mineral Elements.* 1997 pp. 185–230 [BL O'Dell and RA Sunde, editors]. New York: Marcel Dekker Inc.

Chew BP. Immune function: relationship of nutrition and disease control. Vitamin A and beta-carotene on host defense. *J Dairy Sci.* 1987;70(12):2732-43.

Chirase NK, Hutcheson DP, Thompson GB. Feed intake, rectal temperature, and serum mineral concentrations of feedlot cattle fed zinc oxide or zinc methionine and challenged with infectious bovine rhinotracheitis virus. *J Anim Sci.* 1991;69, 4137-4145.

Cousins RJ, Zinc. In Ziegler, E.E., Filer, L.J. Eds. *Present Knowledge in Nutrition.* Washington D.C.: ILSI Press, 1996: pages 293-306.

Cousins RJ. Absorption, transport, and hepatic metabolism of copper and zinc: special reference to metallothionein and ceruloplasmin. *Physiol Rev.* 1985;65(2):238-309.

Cross M, Gill S. Immunomodulatory properties of milk. *Br J Nutr* 2000;84(S1):81-9.

Cummings B A, Gould DH, Caldwell DR, Hamar DW. Ruminal microbial alterations associated with sulfide generation in steers with dietary sulfate-induced polioencephalomalacia. *Am. J. Vet. Res.* 1995;56:1390–1395.

DeChatelet LR. Phagocytosis by human neutrophils. In *Phagocytes and Cellular Immunity* (H. H. Gadebusch, ed.), Boca Raton, FL, CRC, 1979;1-56.

DeLuca LM. The direct involvement of vitamin A in glycosyl transfer reactions of mammalian membranes. *Vitam. Horm.* 1977;35, 1–57.

Detilleux JC, Kehrlı ME Jr, Stabel JR, Freeman AE, Kelley DH. Study of immunological dysfunction in periparturient Holstein cattle selected for high and average milk production. *Vet Immunol Immunopathol.* 1995;44(3-4):251-67.

Doepel L, Lapierre H, Kennelly JJ. Peripartum performance and metabolism of dairy cows in response to prepartum energy and protein intake. *J Dairy Sci.* 2002;85(9):2315-34.

Dohoo I, Martin W, Stryhn H: Modelling survival data. *In: Veterinary Epidemiologic Research*, 1st ed., AVC Inc., Charlottetown, PEI, Canada 2003

Dohoo IR, Ducrot C, Fourichon C, Donald A, Hurnik D. An overview of techniques for dealing with large numbers of independent variables in epidemiologic studies. *Prev Vet Med.* 1997;29(3):221-39.

Drevon CA. Absorption, transport and metabolism of vitamin E. *Free Radic Res Commun.* 1991;14(4):229-46.

Dyk PB, Emery RS, Liesman JL. Prepartum nonesterified fatty acids in plasma are higher in cows developing periparturient health problems. *J Dairy Sci* 1995;78(Suppl. 1):264.

Efron DT, Barbul A. Modulation of inflammation and immunity by arginine supplements. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 1998;1(6):531-8.

Eicher SD, Morrill JL, Blecha F, Chitko-McKown CG, Anderson NV, Higgins JJ. Leukocyte functions of young dairy calves fed milk replacers supplemented with vitamins A and E. *J Dairy Sci.* 1994;77(5):1399-407.

Erb HN, Grohn YT. Epidemiology of metabolic disorders in the periparturient dairy cow. *J Dairy Sci.* 1988 Sep;71(9):2557-71.

Erskine RJ, Bartlett PC. Serum concentrations of copper, iron, and zinc during *Escherichia coli*-induced mastitis. *J Dairy Sci.* 1993;76(2):408-13.

Fairbanks VF. Iron in Medicine and Nutrition. In Shils, M. et al. Eds. *Nutrition in Health and Disease*, 9th Edition. Baltimore: Williams & Wilkins, 1999: pages 223-239.

Fishelson Z, Horstman RD, Muller-Eberhard HJ. Regulation of the alternative pathway of complement by pH. *J Immunol.* 1987;138, 3392-3395.

Franklin ST, Young JW, Nonnecke BJ. Effects of ketones, acetate, butyrate, and glucose on bovine lymphocyte proliferation. *J Dairy Sci.* 1991;74(8):2507-14.

Friedman A, Halevy O, Schrif M, Arazi Y, Sklan, D. Retinoic acid promotes proliferation and induces expression of retinoic acid receptor-alpha gene in murine T lymphocytes. *Cell Immunol.* 1993;152, 240-248.

Galyean ML, Malcolm-Callis KJ, Gunter SA, Berrie RA. Effects of zinc source and level and added copper lysine in the receiving diet on performance by growing and finishing steers. *The Professional Animal Scientist.* 1995;11, 139-148.

Galyean ML, Perino LJ, Duff GC. Interaction of cattle health/immunity and nutrition. *J Anim Sci.* 1999;77(5):1120-34.

Garber MJ, Roeder RA, Davidson PM, Pumfrey WM, Schelling GT. Dose-response effects of vitamin E supplementation on growth performance and meat characteristics in beef and dairy steers. *Canadian J Anim Sci.* 1996;76, 63-72.

Gengelbach GP, Spears JW. Effects of dietary copper and molybdenum on copper status, cytokine production, and humoral immune response of calves. *J Dairy Sci* 1998;81, 3286-3292.

Gengelbach GP, Ward JD, Spears JW, Brown TT. Effects of copper deficiency and copper deficiency coupled with high dietary iron or molybdenum on phagocytic cell function and response of calves to a respiratory disease challenge. *J Anim Sci.* 1997;75, 1112-1118,

Gerloff BJ. Effect of selenium supplementation on dairy cattle. *J Anim Sci.* 1992;70(12):3934-40.

Gerson D F, Kiefer H. Intracellular pH and the cell cycle of mitogen stimulated lymphocytes. *J Cell Physiol.* 1983;114, 132-136.

Gill HS, Darragh AJ, Cross ML. Optimizing immunity and gut function in the elderly. *J Nutr Health Aging* 2001;5:80-91.

Goff JP, Stabel JR. Decreased plasma retinol, alpha-tocopherol, and zinc concentration during the periparturient period: effect of milk fever. *J Dairy Sci.* 1990;73(11):3195-9.

Grinstein S, Swallow CJ, Rotsein OD. Regulation of cytoplasmic pH in phagocytic cell function and dysfunction. *Clin Biochem.* 1991;24, 241-247.

Grohn YT, Erb HN, McCulloch CE, Saloniemi HS. Epidemiology of metabolic disorders in dairy cattle: association among host characteristics, disease, and production. *J Dairy Sci.* 1989;72(7):1876-85.

Grummer RR, Hoffman PC, Luck ML, Bertics SJ. Effect of prepartum and postpartum dietary energy on growth and lactation of primiparous cows. *J Dairy Sci.* 1995;78(1):172-80.

Gyang EO, Stevens JB, Olson WG, Tsitsamis SD, Usenik EA. Effects of selenium-vitamin E injection on bovine polymorphonucleated leukocytes phagocytosis and killing of *Staphylococcus aureus*. *Am J Vet Res.* 1984;45(1):175-7.

Gygax M, Hirni H, Zwahlen R, Lazary S, Blum JW. Immune functions of veal calves fed low amounts of iron. *Zentralbl Veterinarmed A.* 1993;40(5):345-58.

Hadorn U, Hammon H, Bruckmaier RM, Blum JW. Delaying colostrum intake by one day has important effects on metabolic traits and on gastrointestinal and metabolic hormones in neonatal calves. *J Nutr.* 1997;127(10):2011-23.

Halevy O, Arazi Y, Melamed D, Friedman A, Sklan D. Retinoic acid receptor-alpha gene expression is modulated by dietary vitamin A and by retinoic acid in chicken T lymphocytes. *J Nutr.* 1994;124, 2139-2146.

Hammer CH, Hansch G, Gresham HD, Shin ML. Activation of the fifth and sixth components of the human complement system: C6 dependent cleavage of C5 in acid and the formation of a biomolecular lytic complex, C5,6. *J Immunol.* 1983;131, 892-898.

Hansen PJ, Soto P, Natzke RP. Mastitis and fertility in cattle - possible involvement of inflammation or immune activation in embryonic mortality. *Am J Reprod Immunol.* 2004;51(4):294-301.

Hansen PJ, Soto P, Natzke RP. Mastitis and fertility in cattle - possible involvement of inflammation or immune activation in embryonic mortality. *Am J Reprod Immunol.* 2004;51(4):294-301.

Harrison JH, Conrad HR. Effect of vitamin E and selenium supplementation on incidence of clinical mastitis and duration of clinical symptoms. *J Dairy Sci.* 1984;67(6):1293-300.

Harrison JH, Hancock DD, Conrad HR. Vitamin E and selenium for reproduction of the dairy cow. *J Dairy Sci.* 1984;67(1):123-32.

Harrus S, Waner T, Bark H, et al. Recent advances in determining the pathogenesis of canine monocytic ehrlichiosis. *J Clin Microbiol.* 1999;37:2745-2749.

Helmlinger G, Yuan F, Dellian M, Rakesh KJ. Interstitial pH and pO₂ gradients in solid tumours in vivo: high-resolution measurements reveal a lack of correlation. *Nature Med.* 1997;3, 177-182.

Herdt TH, Stowe HD. Fat-soluble vitamin nutrition for dairy cattle. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 1991 Jul;7(2):391-415.

Herdt TH. Variability characteristics and test selection in herd-level nutritional and metabolic profile testing. *Vet Clin N Am, Food Anim Pract* 2000; 16: 387-403.

Hickey MC, Drennan M, Earley B. The effect of abrupt weaning of suckler calves on the plasma concentrations of cortisol, catecholamines, leukocytes, acute-phase proteins and in vitro interferon-gamma production. *J Anim Sci.* 2003;81(11):2847-55.

Hidiroglou N, Cave N, Atwall AS, Farnworth ER, McDowell L. Comparative vitamin E requirements and metabolism in livestock. *Ann Rech Vet.* 1992;23(4):337-59.

Hidiroglou N, Laflamme LF, McDowell LR. Blood plasma and tissue concentrations of vitamin E in beef cattle as influenced by supplementation of various tocopherol compounds. *J Anim Sci.* 1988 Dec;66(12):3227-34.

Hogan JS, Smith KL, Weiss WP, Todhunter DA, Schockey WL. Relationships among vitamin E, selenium, and bovine blood neutrophils. *J Dairy Sci.* 1990;73(9):2372-8.

Holtenius K, Agenas S, Delavaud C, Chilliard Y. Effects of feeding intensity during the dry period. 2. Metabolic and hormonal responses. *J Dairy Sci.* 2003;86(3):883-91.

Holtenius K, Persson Waller K, Essen-Gustavsson B, Holtenius P, Hallen Sandgren C. Metabolic parameters and blood leukocyte profiles in cows from herds with high or low mastitis incidence. *Vet J.* 2004;168(1):65-73.

Holtenius P, Hjort M. Studies on the pathogenesis of fatty liver in cows. *Bovine Practitioner* 1990;25:91.

Holtenius P, Holtenius K. New aspects of ketone bodies in energy metabolism of dairy cows: a review. *Zentralbl Veterinarmed A.* 1996;43(10):579-87.

Hutjens, M.F. 1996. Time for TFI. *Dairy Today*, 10:No.2, p. 20.

Hwu P, Du MX, Lapointe R, Do M, Taylor MW, Young HA. Indoleamine 2,3-dioxygenase production by human dendritic cells results in the inhibition of T cell proliferation. *J Immunol.* 2000 1;164(7):3596-9.

Ingraham RH, Kappel LC, Morgan EB, Srikandakumar A. Correction of subnormal fertility with copper and magnesium supplementation. *J Dairy Sci.* 1987; 70(1):167-80.

Ingraham RH, Kappel LC. Metabolic profile testing. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 1988;4(2):391-411.

Ivancic J Jr, Weiss WP. Effect of dietary sulfur and selenium concentrations on selenium balance of lactating Holstein cows. *J Dairy Sci.* 2001;84(1):225-32.

Johnston LA, Chew BP. Peripartum changes of plasma and milk vitamin A and beta-carotene among dairy cows with or without mastitis. *J Dairy Sci.* 1984;67(8):1832-40.

Jones GM, Wildman EE, Troutt HF Jr, Lesch TN, Wagner PE, Boman RL, Lanning NM. Metabolic profiles in Virginia dairy herds of different milk yields. *J Dairy Sci.* 1982;65(4):683-8.

Jukola E, Hakkarainen J, Saloniemi H, Sankari S. Blood selenium, vitamin E, vitamin A, and beta-carotene concentrations and udder health, fertility treatments, and fertility. *J Dairy Sci.* 1996;79(5):838-45.

Kandefler-Szerszen M, Filar J, Szuster-Ciesielska A, Rzeski W. Suppression of interferon response of bovine leucocytes during clinical and subclinical ketosis in lactating cows. *DTW Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.* 1992;99, 440-443.

Kaneko JJ. Serum proteins and dysproteinemias. In: Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML, eds. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. San Diego, CA: Academic Press; 1997:117-138.

Kayden HJ, Traber MG. Absorption, lipoprotein transport, and regulation of plasma concentrations of vitamin E in humans. *J Lipid Res.* 1993 Mar;34(3):343-58.

Kaysen GA. Plasma composition in the nephrotic syndrome. *Am J Nephrol.* 1993;13:347-359.

Kemp JD. The role of iron and iron binding proteins in lymphocyte physiology and pathology. *J Clin Immunol.* 1993 Mar;13(2):81-92.

Kincaid RL, Chew BP, Cronrath JD. Zinc oxide and amino acids as sources of dietary zinc for calves: Effects on uptake and immunity. *J Dairy Sci.* 1997;80, 1381-1388.

King, J.C., Keen, C.L. Zinc. In Shils, M. et al. Eds. *Nutrition in Health and Disease*, 9th Edition. Baltimore: Williams & Wilkins, 1999: 223-239.

Kitchenham BA, Rowlands GJ, Shorbagi H. Relationships of concentrations of certain blood constituents with milk yield and age of cows in dairy herds. *Res Vet Sci.* 1975;18(3):249-52.

Kleczkowski M, Klucinski W, Sikora J, Zdanowicz M, Dziekan P. Role of the antioxidants in the protection against oxidative stress in cattle--nonenzymatic mechanisms (Part 2). *Pol J Vet Sci.* 2003;6(4):301-8.

Kleppe BB, Aiello RJ, Grummer RR, Armentano LE. Triglyceride accumulation and very low density lipoprotein secretion by rat and goat hepatocytes in vitro. *J Dairy Sci.* 1988 Jul;71(7):1813-22.

Klucinski W, Degorski A, Miernik-Degorska E, Targowski S, Winnicka A. Effect of ketone bodies on the phagocytic activity of bovine milk macrophages and polymorphonuclear leukocytes. *Zentralbl Veterinarmed A.* 1988;35(8):632-9.

Klucinski W, Miernik-Degorska E, Degorski A, Targowski S, Winnicka A. Effect of ketone bodies on the mitogenic response of bovine milk lymphocytes. *Zentralbl Veterinarmed A.* 1988;35(8):626-31.

Knowles TG, Edwards JE, Bazeley KJ, Brown SN, Butterworth A, Warriss PD. Changes in the blood biochemical and haematological profile of neonatal calves with age. *Vet Rec.* 2000 18;147(21):593-8.

Kraus M, Wolf B. Implications of acidic tumour microenvironment for neoplastic growth and cancer treatment: a computer analysis. *Tumour Biol.* 1996;17, 133-154.

Kremer WD, Noordhuizen-Stassen EN, Grommers FJ, Schukken YH, Heeringa R, Brand A, Burvenich C. Severity of experimental *Escherichia coli* mastitis in ketonemic and nonketonemic dairy cows. *J Dairy Sci.* 1993;76(11):3428-36.

Kuvibidila SR, Porretta C, Baliga S. Iron deficiency alters the progression of mitogen-treated murine splenic lymphocytes through the cell cycle. *J Nutr.* 2001;131, 2028-2033.

Larsen HJ, Moksnes K, Overnes G. Influence of selenium on antibody production in sheep. *Res Vet Sci.* 1988;45(1):4-10.

Larsen HJ, Overnes G, Moksnes K. Effect of selenium on sheep lymphocyte responses to mitogens. *Res Vet Sci.* 1988;45(1):11-5.

Larsen HJ. Relations between selenium and immunity. *Norwegian Journal of Agricultural Science* 1993;11, 105 – 119.

Larson BL. Immunoglobulins of the mammary secretions. In: PF Fox, ed. *Advanced Dairy Chemistry 1-Proteins*. London, UK: Elsevier Science Publishers; 1992:231-254.

Lauridsen C, Engel H, Craig AM, Traber MG. Relative bioactivity of dietary RRR- and all-rac-alpha-tocopheryl acetates in swine assessed with deuterium-labeled vitamin E. *J Anim Sci.* 2002;80(3):702-7.

Lee CY, Man-Fan WJ. Vitamin E supplementation improves cell-mediated immunity and oxidative stress of Asian men and women. *J Nutr.* 2000;130, 2932–2937.

Lessard M, Gagnon N, Petit HV. Immune response of postpartum dairy cows fed flaxseed. *J Dairy Sci.* 2003;86(8):2647-57.

Linder MC, Hazegh-Azam M. Copper biochemistry and molecular biology. *Am J Clin Nutr.* 1996;63(5):797S-811S.

Long RJ, Zhang DG, Wang X, Hu ZZ, Dong SK. Effect of strategic feed supplementation on productive and reproductive performance in yak cows. *Prev Vet Med.* 1999 27;38(2-3):195-206.

Lonnerdal B, Bell JG, Keen CL. Copper absorption from human milk, cow's milk, and infant formulas using a suckling rat model. *Am J Clin Nutr.* 1985;42(5):836-44.

Lopez DH, Trevani AS, Salamone G, Andonegui G, Raiden S, Giordano M, Geffner JR. Acidic pH increases the avidity of FcγR for immune complexes. *Immunology*. 1999;98(3):450-5.

Low PP, Rutherford KJ, Gill HS, Cross ML. Effect of dietary whey protein concentrate on primary and secondary antibody responses in immunized BALB/c mice. *Int Immunopharmacol*. 2003;3(3):393-401.

Mackiewicz A. Acute phase proteins and transformed cells. *Int Rev Cytol*. 1997;170:225-300.

Mahnensmith TL, Aronson PS. The plasma membrane sodiumhydrogen exchanger and its role in physiological and pathophysiological processes. *Circ. Res*. 1985;56, 773-788.

Mallard BA, Dekkers JC, Ireland MJ, Leslie KE, Sharif S, Vankampen CL, Wagter L, Wilkie BN. Alteration in immune responsiveness during the peripartum period and its ramification on dairy cow and calf health. *J Dairy Sci*. 1998;81(2):585-95.

Mason KE. A conspectus of research on copper metabolism and requirements of man. *J Nutr*. 1979;109(11):1979-2066.

McDowell LR, Williams SN, Hidioglou N, Njeru CA, Hill GM, Ochoa L, Wilkinson NS. Vitamin E supplementation for the ruminant. *Animal Feed Science Technology* 1996;60, 273 - 296.

Meirom R, Samina I, Brenner J. Changes in the cellular subpopulations of peripheral blood leukocytes during the reproductive cycle of dairy cows. *Isr. J. Vet. Med*. 1999;54 (4).

Menkin V. The role of hydrogen ion concentration and the cytology of an exudate. In *Biochemical Mechanisms in Inflammation* (V. Menkin, ed.), Springfield, IL, Charles C. Thomas, 1956; 66-103.

Meydani SN, Barklund MP, Liu S, Meydani M, Miller RA, Cannon JG, Morrow FD, Rocklin R, Blumberg JB. Vitamin E supplementation enhances cell-mediated immunity in healthy elderly subjects. *Am J Clin Nutr*. 1990 Sep;52(3):557-63.

Meydani SN, Meydani M, Blumberg JB, Leka LS, Siber G, Loszewski R, Thompson C, Pedrosa MC, Diamond RD, Stollar BD. Vitamin E supplementation and in vivo immune response in healthy elderly subjects. A randomized controlled trial. *J. Am. Med. Assoc*. 1997;277, 1380-1386.

Meyer KC, Arend RA, Kalayoglu MV, Rosenthal NS, Byrne GI, Brown RR. Tryptophan metabolism in chronic inflammatory lung disease. *J Lab Clin Med*. 1995;126(6):530-40.

Oldham ER, Eberhart RJ, Muller LD. Effects of supplemental vitamin A or beta-carotene during the dry period and early lactation on udder health. *J Dairy Sci.* 1991 Nov;74(11):3775-81.

Olson DP, South PJ, Hendrix K. Serum chemical values in hypothermic and rewarmed young calves *Am J Vet Res.* 1983;44(4):577-82.

Oppenheimer SJ. Iron and its relation to immunity and infectious disease. *J Nutr.* 2001;131, 616S-633S.

Parra O, Ojeda A, Combellas J, Gabaldon L, Escobar A, Martinez N, Benezra M. Blood metabolites and their relationship with production variables in dual-purpose cows in Venezuela. *Prev Vet Med.* 1999 Jan 27;38(2-3):133-45.

Patruta, SI, Horl WH. Iron and infection. *Kidney Int.* 1999;69, S125-S130.

Pehrson B, Hakkarainen J. Vitamin E status of healthy Swedish cattle. *Acta Vet Scand.* 1986;27(3):351-60.

Perkins KH, VandeHaar MJ, Tempelman RJ, Burton JL. Negative energy balance does not decrease expression of leukocyte adhesion or antigen-presenting molecules in cattle. *J Dairy Sci.* 2001;84(2):421-8.

Perryman LE, Leach DR, Davis WC, Mickelsen WD, Heller SR, Ochs HD, Ellis JA, Brummerstedt E. Lymphocyte alterations in zinc-deficient calves with lethal trait A46. *Vet Immunol Immunopathol.* 1989;21(3-4):239-48.

Petersen HH, Nielsen JP, Heegaard PM. Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. *Vet Res.* 2004;35(2):163-87.

Petit HV, Dewhurst RJ, Scollan ND, Proulx JG, Khalid M, Haresign W, Twagiramungu H, Mann GE. Milk production and composition, ovarian function, and prostaglandin secretion of dairy cows fed omega-3 fats. *J Dairy Sci.* 2002;85(4):889-99.

Prohaska JR, Failla ML. Copper and immunity. In *Human Nutrition-A Comprehensive Treatise*, 1993;8, pp. 309-332 [DM Klurfeld, editor]. New York: Plenum Press.

Pullen DL, Palmquist DL, Emery RS. Effect on days of lactation and methionine hydroxy analog on incorporation of plasma fatty acids into plasma triglycerides. *J Dairy Sci.* 1989;72(1):49-58.

Putnam ME, Comben N. Vitamin E. *Vet Rec.* 1987 5;121(23):541-5.

Pyorala S. Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis. *Vet Res.* 2003;34(5):565-78.

- Raghavan M, Bonagura VR, Morrison SL, Bjorkman PJ. Analysis of the pH dependence of the neonatal Fc receptor/immunoglobulin G interaction using antibody and receptor variants. *Biochemistry* 1995;34, 14649–14657.
- Rajaraman V, Nonnecke BJ, Franklin ST, Hammell DC, Horst RL. Effect of vitamins A and E on nitric oxide production by blood mononuclear leukocytes from neonatal calves fed milk replacer. *J Dairy Sci.* 1998;81(12):3278-85.
- Randel RD. Nutrition and postpartum rebreeding in cattle. *J Anim Sci.* 1991;68, 853-862.
- Reddy PG, Frey RA. Nutritional modulation of immunity in domestic food animals. *Adv Vet Sci Comp Med.* 1990;35:255-81.
- Reddy PG, Morrill JL, Minocha HC, Morrill MB, Dayton AD, Frey RA. Effect of supplemental vitamin E on the immune system of calves. *J Dairy Sci.* 1986;69(1):164-71.
- Reid G. Metabolic disorders of cattle. *Med Hypotheses.* 1993;40(5):296-300.
- Roblero LS, Riffo MD. High potassium concentration improves preimplantation development of mouse embryos in vitro. *Fertil Steril.* 1986;45(3):412-6.
- Rode LM, McAllister TA, Cheng KJ. Microbial degradation of vitamin A in rumen fluid from steers fed concentrate, hay or straw diets. *Canadian J Anim Sci.* 1990;70, 227 – 233.
- Rojas LX, McDowell LR, Cousins RJ, Martin FG, Wilkinson NS, Johnson AB, Velasquez JB. Relative bioavailability of two organic and two inorganic zinc sources fed to sheep. *J Anim Sci.* 1995;73(4):1202-7.
- Ropstad E, Larsen HJ, Refsdal AO. Immune function in dairy cows related to energy balance and metabolic status in early lactation. *Acta Vet Scand.* 1989;30, 209-219.
- Rosso GC, Masushige S, Quill H, Wolf G. Transfer of mannose from mannosyl retinyl phosphate to protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977;74(9):3762-6.
- Rotstein OD, Nasmith PE, Grinstein S. The Bacteroides by-product succinic acid inhibits neutrophil respiratory burst by reducing intracellular pH. *Infect. Immun.* 1987;55, 864–870.
- Rukkwamsuk T, Kruij TAM, Wensing T. Relationship between overfeeding and overconditioning in the dry period and the problems of high producing dairy cows during the postparturient period. *Veterinary Quarterly* 1999;21, 71 – 77.

Rupic V, Ivandija L, Luterotti S, Dominis-Kramaric M, Bozac R. Plasma proteins and haematological parameters in fattening pigs fed different sources of dietary zinc. *Acta Vet Hung.* 1998;46(1):111-26.

Sakai S, Moriguchi S. Long-term feeding of high vitamin E diet improves the decreased mitogen response of rat splenic lymphocytes with aging. *J Nutr Sci Vitaminol.* 1997;43(1):113-22.

Sartorelli P, Paltrinieri S, Agnes F. Non-specific immunity and ketone bodies. I: In vitro studies on chemotaxis and phagocytosis in ovine neutrophils. *Zentralbl Veterinarmed A.* 1999;46(10):613-9.

Sato N, Shimizu H, Shimomura Y, Suwa K, Mori M, Kobayashi I. Mechanism of inhibitory action of ketone bodies on the production of reactive oxygen intermediates (ROIS) by polymorphonuclear leukocytes. *Life Sci.* 1992;51(2):113-8.

Sato S, Suzuki T, Okada K. Suppression of mitogenic response of bovine peripheral blood lymphocytes by ketone bodies. *J Vet Med Sci.* 1995;57(1):183-5.

Sattler T, Furll M. Creatine kinase and aspartate aminotransferase in cows as indicators for endometritis. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med.* 2004;51(3):132-7.

Schultze AE, Rohrbach BW, Fribourg HA, Waller JC, Oliver JW. Alterations in bovine serum biochemistry profiles associated with prolonged consumption of endophyte-infected tall fescue. *Vet Hum Toxicol.* 1999;41(3):133-9.

Seligman PA, Kovar J, Gelfand EW. Lymphocyte proliferation is controlled by both iron availability and regulation of iron uptake pathways. *Pathobiology* 1992;60, 19-26.

Sidki A, Hirst D. Establishing albumin levels in sheep serum by a specific fluoroimmunoassay. *Vet J.* 1998;156;67-72.

Smith KL, Hogan JS, Weiss WP. Dietary vitamin E and selenium affect mastitis and milk quality. *J Anim Sci.* 1997 Jun;75(6):1659-65.

Smith VG, Edgerton LA, Hafs HD, Convey EM. Bovine serum estrogens, progestins and glucocorticoids during late pregnancy parturition and early lactation. *J Anim Sci.* 1973;36(2):391-6.

Soto P, Natzke RP, Hansen PJ. Actions of tumor necrosis factor-alpha on oocyte maturation and embryonic development in cattle. *Am J Reprod Immunol.* 2003;50(5):380-8.

Soto P, Natzke RP, Hansen PJ. Identification of possible mediators of embryonic mortality caused by mastitis: actions of lipopolysaccharide, prostaglandin F2alpha,

and the nitric oxide generator, sodium nitroprusside dihydrate, on oocyte maturation and embryonic development in cattle. *Am J Reprod Immunol.* 2003;50(3):263-72.

Spears JW, Harvey RW, Brown TT Jr. Effects of zinc methionine and zinc oxide on performance, blood characteristics, and antibody titer response to viral vaccination in stressed feeder calves. *J Am Vet Med Assoc.* 1991;15;199(12):1731-3.

Stabel JR, Goff JP, Kimura K. Effects of supplemental energy on metabolic and immune measurements in periparturient dairy cows with Johne's disease. *J Dairy Sci.* 2003;86(11):3527-35.

Stabel JR, Reinhardt TA, Nonnecke BJ. Effect of selenium and reducing agents on in vitro immunoglobulin M synthesis by bovine lymphocytes. *J Dairy Sci.* 1991;74(8):2501-6.

Stabel JR, Spears JW, Brown TT. Effect of copper deficiency on tissue, blood characteristics, and immune function of calves challenged with infectious bovine rhinotracheitis virus and *Pasterurella hemolytica*. *J Anim Sci.* 1993;71, 1247-1255.

Stokol T, Tarrant JM, Scarlett JM. Overestimation of canine albumin concentration with the bromcresol green method in heparinized plasma samples. *Vet Clin Pathol.* 2001;30:170-176.

Strang BD, Bertics SJ, Grummer RR, Armentano LE. Effect of long-chain fatty acids on triglyceride accumulation, gluconeogenesis, and ureagenesis in bovine hepatocytes. *J Dairy Sci.* 1998;81(3):728-39.

Suriyasathaporn W, Daemen AJ, Noordhuizen-Stassen EN, Dieleman SJ, Nielen M, Schukken YH. Beta-hydroxybutyrate levels in peripheral blood and ketone bodies supplemented in culture media affect the in vitro chemotaxis of bovine leukocytes. *Vet Immunol Immunopathol.* 1999;68(2-4):177-86.

Suttle NF, Davies HL, Field AC. A model for zinc metabolism in sheep given a diet of hay. *Br J Nutr.* 1982;47(1):105-12.

Suttle NF. Problems in the diagnosis and anticipation of trace element deficiencies in grazing livestock. *Vet Rec.* 1986 16;119(7):148-52.

Suttle NF. The interactions between copper, molybdenum, and sulphur in ruminant nutrition. *Annu Rev Nutr.* 1991;11:121-40.

Taiwo VO, Olaniyi MO, Ogunsanmi AO. Comparative biochemical changes and erythrocytes susceptibility of erythrocytes to in vitro peroxidation during experimental *Trypanosoma congolense* and *T. brucei* infections in sheep. *Isr J Vet Med.* 2003 58 (4).

- Targowski SP, Klucinski W, Littledike ET, Hoy DA. Suppression of mitogenic response of bovine lymphocytes during experimental ketosis in calves. *Am J Vet Res.* 1985;46(6):1378-80.
- Targowski SP, Klucinski W. Reduction in mitogenic response of bovine lymphocytes by ketone bodies. *Am J Vet Res.* 1983;44(5):828-30.
- Thomas LA, Brown SA. Relationship between colloid osmotic pressure and plasma protein concentration in cattle, horses, dogs, and cats. *Am J Vet Res.* 1992 Dec;53(12):2241-4.
- Thomas SR, Stocker R. Antioxidant activities and redox regulation of interferon-gamma-induced tryptophan metabolism in human monocytes and macrophages. *Adv Exp Med Biol.* 1999;467:541-52.
- Torre PM, Harmon RJ, Sordillo LM, Boissonneault GA, Hemken RW, Trammell DS, Clark TW. Modulation of bovine mononuclear cell proliferation and cytokine production by dietary copper insufficiency. *J Nutr Immunol.* 1995;3, 3-20.
- Truong-Tran AQ, Ho LH, Chai F, Zalewski P. Cellular zinc fluxes and the regulation of apoptosis/gene-directed cell death. *J Nutr.* 2000;130(5S Suppl):1459S-66S.
- Tumbleson ME, Burks MF, Wingfield WE. Serum protein concentrations, as a function of age, in female dairy cattle. *Aging and serum proteins. Cornell Vet.* 1973;63:65-71.
- Turner RJ, Wheatley LE, Beck NF. Stimulatory effects of selenium on mitogen responses in lambs. *Vet Immunol Immunopathol.* 1985;8(1-2):119-24.
- Turnlund, J.R. Copper. In Shils, M. et al. Eds. *Nutrition in Health and Disease*, 9th Edition. Baltimore: Williams & Wilkins, 1999: pages 241-252.
- Udaykumar SRK. Acid pH-induced changes in the immunoreactivity of specific antigen and antibody in circulating immune complexes from tuberculosis sera. *J Clin Lab Anal.* 1992;6, 194-200.
- Ullrey DE. Biochemical and physiological indicators of selenium status in animals. *J Anim Sci.* 1987;65(6):1712-26.
- Underwood, E.J. and N.F. Suttle. 1999. In: *The Mineral Nutrition of Livestock*. Third Ed., Midlothian, UK.
- Van Ryssen, J.B., P.S. van Malsen and F. Hartmann.. Contribution of dietary sulphur to the interaction between selenium and copper in sheep. *J. Agric. Sci. (Camb.)* 1998;130:107-114.

Van Saun RJ, Wustenberg M. Metabolic profiling to evaluate nutritional and disease status. *Bovine Practitioner* 1997;1.2:37-42.

Van Saun RJ. Rational approach to selenium supplementation essential. *Feedstuffs*, 1990;(15), 15–17. 1156–1164.

Van Saun, RJ and Sniffen, CJ. Nutritional management of the pregnant dairy cow to optimize health, lactation and reproductive performance. *Animal Feed Science and Technology* 1996;59:13-26.

Walker EM, Walker SM. Effects of iron overload on the immune system. *Ann Clin Lab Sci*. 2000;30, 354–365.

Ward JD, Gengelbach GP, Spears JW. The effects of copper deficiency with or without high dietary iron or molybdenum on immune function of cattle. *J Anim Sci*. 1997;75, 1400-1408.

Ward JD, Spears JW. The effects of low-copper diets with or without supplemental molybdenum on specific immune responses of stressed cattle. *J Anim Sci*. 1999;77, 230-237.

Weinberg ED. Iron depletion: a defense against intracellular infection and neoplasia. *Life Sci*. 1992;50(18):1289-97.

Weiss WP, Smith KL, Hogan JS, Steiner TE. Effect of forage to concentrate ratio on disappearance of vitamins A and E during in vitro ruminal fermentation. *J Dairy Sci*. 1995;78(8):1837-42

Weiss WP. Requirements of fat-soluble vitamins for dairy cows: a review. *J Dairy Sci*. 1998;81(9):2493-501.

Wettemann RP. Postpartum endocrine function of cattle, sheep and swine. *J Anim Sci*. 1980;51 Suppl 2:2-15.

Wirtu G, Pope CE, Damiani P, Miller F, Dresser BL, Short CR, Godke RA, Bavister BD. Development of in-vitro-derived bovine embryos in protein-free media: effects of amino acids, glucose, pyruvate, lactate, phosphate and osmotic pressure. *Reprod Fertil Dev*. 2004;15(8):439-49.

Wolf G. Multiple functions of vitamin A. *Physiol Rev*. 1984;64(3):873-937.

Woodward B, Hillyer L, Hunt K. T cells with a quiescent phenotype (CD45RA+) are overabundant in the blood and involuted lymphoid tissues in wasting protein and energy deficiencies. *Immunology*. 1999;96(2):246-53.

Wright CL, Spears JW, Brown TT, Lloyd KE, Tiffany ME. Effects of chromium and copper on performance and immune function of stressed steers. *J Anim Sci.* 2000;78, Suppl. 1, 1.

Wright PL, Bell MC. Comparative metabolism of selenium and tellurium in sheep and swine. *Am J Physiol.* 1966;211(1):6-10.

Wu G, Greene LW. Glutamine and glucose metabolism in bovine blood lymphocytes. *Comp Biochem Physiol B.* 1992;103(4):821-5.

Yaqoob P, Calder PC. The effects of dietary lipid manipulation on the production of murine T cell-derived cytokines. *Cytokine.* 1995;7(6):548-53.

Yip, R., Dallman, P.R. In Ziegler, E.E., Filer, L.J. Eds. *Present Knowledge in Nutrition.* Washington D.C.: ILSI Press, 1996: pages 277-292.

Zabala MS, Charlo T, Castillon L, Gil-Fournier M. Study of colloidal osmotic pressure-total proteins--serum albumin relationship during and after extracorporeal circulation *Ann Chir.* 1993;47(2):108-15.