



**Études de l'impact négatif des acides gras sur le système immunitaire des vaches  
laitières**

par

**Noémie Vanacker**

Thèse présentée au Département de biologie en vue  
de l'obtention du grade de docteur ès sciences (Ph.D)

FACULTÉ DES SCIENCES  
UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

Sherbrooke, Québec, Canada, septembre 2022

Le 15 septembre 2022

*Le jury a accepté la thèse de Madame Noémie Vanacker dans sa version finale.*

Membres du jury

Monsieur Pierre Lacasse  
Directeur de recherche  
Agriculture et Agroalimentaire Canada

Professeur Richard Blouin  
Codirecteur de recherche  
Département de biologie

Monsieur Pierre Germon  
Évaluateur externe  
Institut nationale de recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement

Madame Céline Ster  
Évaluatrice interne  
Agriculture et Agroalimentaire Canada

Monsieur Benoît Leblanc  
Évaluateur interne  
Département de biologie

Professeur Nicolas Gévry  
Président-rapporteur  
Département de biologie



## REMERCIEMENTS

En premier lieu, je tiens à remercier mon directeur de thèse le Dr Pierre Lacasse pour la confiance qu'il m'a accordée en me permettant de réaliser quelques-uns de ses projets de recherche, mais aussi pour la formation scientifique qu'il m'a apportée durant tout mon parcours universitaire, ici au Canada. En effet, il a su voir un potentiel là où moi-même je n'aurais osé y croire. Merci pour cela! Je veux également remercier le Dr Richard Blouin, qui a accepté d'être mon codirecteur, pour ses conseils lors de la rédaction de mes articles et de ma thèse et aussi pour l'accompagnement lors des démarches administratives. Un grand merci aussi à mes conseillers de thèse, Céline Ster, Nicolas Gévry et Benoit Leblanc pour l'accompagnement tout au long de mon doctorat. Je remercie également l'organisme « Wallonie-Bruxelles International » et le Réseau Mammite pour l'octroi de bourses. Je voudrais particulièrement remercier toute l'équipe du Labo 230. Au cours de mes 8 années au sein de ce laboratoire, l'équipe a beaucoup évolué et chacun m'a beaucoup apporté aussi bien d'un point de vue professionnel que personnel. Merci à Catherine Thibault de m'avoir toujours épaulée dans les projets et d'avoir supporté mes millions de questions, Séverine Ollier d'avoir été ma première formatrice (heureusement, je ne t'arrive pas à la cheville dans l'art de me cogner) et Véronique Roy pour ta bonne humeur. Les étudiants du Labo, Alison-May (la Française que ça va on peut supporter), Samuel (le farmer avec lequel il faut un traducteur intégré), Samantha (mon éternelle stagiaire), Marie-Pascale (mon autre éternelle stagiaire), Izabella (toujours partante pour les aventures) et Henrique pour leur aide et surtout leur amitié. Les nombreux stagiaires qui ont participé aux projets. Sans vous toutes/tous, l'expérience (et je ne parle pas que de phases animales ici) n'aurait pas été la même. Merci également à l'équipe du centre laitier, avec qui l'on ne manque pas de rigoler. Je me dois également de remercier Christiane Girard et Valérie Beudet pour la belle collaboration sur le projet restriction. Merci à mes amis d'ici qui sont la famille qui nous manque lorsqu'on quitte ses racines : Sabine, Sophie, Aline, Aurélie, Mylène, Luca, Douglas, Daniel, Enrique, Fadi. Et mes amis de l'autre côté de l'Atlantique qui ne manque pas de me rappeler mes racines à chaque retour au pays. Merci à mon chum Sylvain de m'avoir supporté dans les moments plus difficiles. Et enfin, merci à ma famille qui m'a donné des valeurs solides qui m'ont permis d'en arriver là. Ma maman, Françoise et mon papa, Yves ainsi que mes frères et sœurs, Werner, Jordan, Kristina, Louise, Isaline et Charles, mes grands-parents Pierre et Colette et enfin à mes nombreux cousins et cousines.

## SOMMAIRE

La période péripartum est connue pour être à risques pour la vache laitière. En effet, durant cette période celle-ci se retrouve souvent en immunodépression et est donc plus susceptible de développer des problèmes de santé. Nos travaux antérieurs ont montré qu'il existe une relation entre la diminution des fonctions immunitaires et la balance énergétique négative et plus particulièrement l'augmentation de la concentration sanguine en acides gras non estérifiés (AGNE).

L'objectif général de cette thèse était de caractériser plus spécifiquement l'effet des AGNE sur les systèmes immunitaire et métabolique des vaches laitières dans le but d'élaborer des stratégies permettant de diminuer leur impact.

La première étude visait à évaluer l'impact d'un supplément d'acide folique et de vitamine B12 et d'une restriction alimentaire sur plusieurs paramètres immunitaires. Pour ce faire, seize vaches ont reçu sur une période de 5 semaines des injections intramusculaires hebdomadaires soit de solution saline soit de 320 mg d'acide folique et 10 mg de vitamine B12. Au cours de la cinquième semaine, les vaches ont été nourries à 75 % de leur apport ad libitum pendant 4 jours. Des échantillons de sang ont été prélevés au cours de l'expérience afin d'évaluer les populations de cellules sanguines, la capacité de phagocytose et la flambée oxydative des leucocytes polymorphonucléaires (PMN), la prolifération des mononucléaires du sang périphérique (PBMC) et les concentrations d'acides gras non estérifiés et de  $\beta$ -hydroxybutyrate (BHB). Le supplément vitaminique n'a affecté aucune des variables testées, à l'exception de la teneur en matière grasse du lait et en lactose. La restriction alimentaire a réduit la production de lait et augmenté la concentration d'AGNE. Cette dernière n'a pas affecté les populations de cellules sanguines, mais a réduit le pourcentage de PMN positifs pour la flambée oxydative. La prolifération des PBMC a été réduite lorsque le milieu de culture cellulaire a été supplémenté avec des sérums collectés pendant la restriction alimentaire. En conclusion, la restriction alimentaire a affecté les fonctions des PMN et des PBMC et cet effet n'a pas été empêché par le supplément d'acide folique et de vitamine B12. Ces résultats appuient l'hypothèse selon laquelle le plus grand risque de maladies infectieuses chez les vaches souffrant d'un NEB est

lié à une altération des fonctions des cellules immunitaires par une concentration circulante élevée d'AGNE.

Lors de la deuxième étude, nous avons évalué l'effet de 11 acides gras (acides palmitoléique, myristique, palmitique, stéarique, oléique, linoléique, docosahexaénoïque, linoléique conjugué, laurique, eicosapentaénoïque et linoléique) ainsi qu'un mélange d'acides gras représentant le profil d'AGNE observé au cours de la période de transition à différentes concentrations (0, 50, 100 et 250  $\mu\text{M}$ ) sur la prolifération et la sécrétion de cytokines des lymphocytes. Pour évaluer la lymphoprolifération, des cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) de 5 vaches saines ont été isolées et stimulées à l'aide d'un agent mitogène, la concanavaline A (ConA) en présence ou en absence d'acides gras. Nos résultats ont montré que tous les acides gras, à l'exception de l'acide laurique, réduisaient significativement la prolifération des PBMC de manière dose-dépendante. Pour la sécrétion de cytokines, nous avons constaté que les niveaux d'IL-4 dans le surnageant de culture de PBMC stimulés par la ConA étaient réduits à la suite de l'ajout des acides oléique, palmitoléique, eicosapentaénoïque, myristique et du mélange d'AGNE. Les PBMC ont également montré une diminution de la sécrétion d'Interféron- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) en réponse aux acides laurique, linoléique, palmitoléique, stéarique et myristique. Dans l'ensemble, les acides gras polyinsaturés étaient des inhibiteurs plus puissants des sécrétions de cytokines que les acides gras saturés. De plus, nous avons détecté une corrélation négative entre les points de fusion des acides gras et leur capacité à inhiber les sécrétions d'IL-4 et d'IFN- $\gamma$ , comme en témoigne une plus grande inhibition avec les acides gras à bas point de fusion. De manière générale, l'étude a permis de confirmer que les AGNE ont un effet négatif sur certaines fonctions lymphocytaires et que leur effet inhibiteur sur les sécrétions de cytokines augmente avec le degré d'insaturation.

Enfin, il est difficile de déterminer l'effet exact des AGNE sur le système immunitaire, car d'autres perturbations métaboliques et hormonales se produisent simultanément pendant la période de transition. Pour la dernière étude présentée dans cette thèse, nous avons déterminé l'impact des AGNE sur les fonctions immunitaires à l'aide d'un modèle expérimental conçu pour évaluer leurs effets indépendamment du bilan énergétique, des changements hormonaux et métaboliques dus à la parturition. Six vaches tarées et non gestantes ont été infusées soit avec de

l'eau stérile (traitement témoin) soit avec une émulsion lipidique (Intralipid© 20%, traitement lipidique) un plan de triple carré latin. Les concentrations sanguines d'AGNE, de BHB de glucose, d'insuline, la prolifération et la sécrétion d'INF- $\gamma$  des lymphocytes ainsi que la phagocytose et la flambée oxydative des neutrophiles ont été évaluées avant, pendant et à la fin de la perfusion. L'infusion de lipide a causé une augmentation graduelle des concentrations d'AGNE, de BHB de glucose et d'insuline dans le sang. La lymphoprolifération a décliné dès 3h après le début de la perfusion de lipides. À 3h et 6h de perfusion, le traitement lipidique a significativement réduit la concentration d'INF- $\gamma$  dans le surnageant des cellules de culture. La perfusion de lipides n'a pas affecté la phagocytose des neutrophiles, mais a réduit le pourcentage de ceux-ci produisant une flambée oxydative. Ces résultats confirment que les AGNE inhibent les fonctions immunitaires, et ce indépendamment du bilan énergétique et des autres changements qui se produisent pendant la période de transition. Ils indiquent également qu'une concentration élevée de lipides sanguins provoque une résistance à l'insuline. Le modèle animal développé nous permettra dans un premier temps de mieux comprendre les voies biologiques impliquées dans la modulation des réponses immunitaires et l'apparition de l'insulinorésistance provoquée par les AGNE.

Les résultats de cette thèse nous montrent que les deux systèmes, le métabolisme et l'immunité, sont des systèmes dynamiques et étroitement liés, on parle d'ailleurs de plus en plus de l'immunométabolisme.

**Mots clés :** Vaches laitières, Balance énergétique, Acides gras non-estérifiés (AGNE), Immunodépression, Lymphoprolifération, Cytokines, Période péripartum, Glucose, Insuline.



## TABLE DES MATIÈRES

CHAPITRE 1.....	1
INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	1
1.1 Contexte.....	1
1.2 Lactation .....	5
1.2.1 Cycle de lactation .....	6
1.2.2 Production de lait.....	7
1.3 Adaptations métaboliques associées à la période péripartum.....	8
1.3.1 Glucose .....	9
1.3.2 Insuline .....	11
1.3.3 Mobilisation des réserves adipeuses.....	12
1.3.4 Profil des acides gras libérés .....	16
1.4 Impact des adaptations métaboliques sur le système immunitaire .....	16
1.5 Rééquilibrer la balance énergétique pour réduire l'immunodépression .....	25
1.6 Objectifs et hypothèses .....	30
1.6.1 Hypothèses générales .....	30
1.6.2 Objectifs généraux.....	30
1.6.3 Objectifs spécifiques.....	30
CHAPITRE 2.....	31
EFFECTS OF FEED RESTRICTION AND SUPPLEMENTARY FOLIC ACID AND VITAMIN B12 ON IMMUNE CELL FUNCTIONS AND BLOOD CELL POPULATIONS IN DAIRY COWS.....	31
2.1 Originalité du travail par rapport à la science.....	31
2.2 Contribution de l'auteure .....	31
2.3 Référence de l'article .....	32
2.4 Manuscrit de l'article.....	33
2.4.1. Abstract .....	34
2.4.2. Implications.....	35

2.4.3. Introduction .....	35
2.4.4. Materials and methods .....	37
2.4.4.1. Animals and Experimental Procedures .....	37
2.4.4.2. Milk Yield and Composition .....	38
2.4.4.3. Blood Collection .....	38
2.4.4.4. Blood Metabolite Assays .....	39
2.4.4.5. PMN Phagocytosis and Oxidative Burst Assays .....	39
2.4.4.6. PBMC Isolation.....	40
2.4.4.7. PBMC Proliferation Assay .....	40
2.4.4.8. Statistical Analysis.....	41
2.4.5. Results .....	41
2.4.5.1. Milk Production, Milk Composition, and DMI .....	41
2.4.5.2. Blood Metabolic Marker Concentrations .....	43
2.4.5.3. Immunological Parameters .....	44
2.4.6. Discussion .....	47
2.4.7. Acknowledgments.....	50
2.4.8. References .....	50
CHAPITRE 3.....	54
EFFECT OF DIFFERENT FATTY ACIDS ON THE PROLIFERATION AND CYTOKINE PRODUCTION OF DAIRY COW PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS .....	54
3.1 Originalité du travail par rapport à la science .....	54
3.2 Contribution de l’auteure .....	55
3.3 Référence de l’article .....	55
3.4 Manuscrit de l’article .....	56
3.4.1. Interpretive Summary.....	57
3.4.2. Abstract .....	57
3.4.3. Introduction .....	58
3.4.4. Materials and Methods .....	60
3.4.4.1. Reagents .....	60

3.4.4.2. Animals and Experimental Procedures .....	61
3.4.4.3. PBMC Proliferation Assay .....	62
3.4.4.4. PBMC production of IFN- $\gamma$ and IL-4.....	62
3.4.4.5. Statistical Analysis.....	63
3.4.5. Results .....	63
3.4.5.1. PBMC Proliferation.....	63
3.4.5.2. Cytokine Secretion.....	66
3.4.6. Discussion .....	72
3.4.7. Funding.....	76
3.4.8. Acknowledgments.....	76
3.4.9. References .....	76
CHAPITRE 4.....	81
EFFECT OF INTRAVENOUS LIPID INFUSION ON INSULIN RESISTANCE AND IMMUNE FUNCTIONS OF DAIRY COWS.....	81
4.1. Originalité du travail par rapport à la science.....	81
4.2. Contribution de l’auteure .....	81
4.3. Référence de l’article .....	82
4.4. Manuscrit de l’article .....	82
4.4.1. Interpretive Summary .....	82
4.4.2. Abstract .....	84
4.4.3. Introduction .....	85
4.4.4. Materials and Methods .....	86
4.4.4.1. Animals and Experimental Procedures.....	86
4.4.4.2. Blood Collection.....	88
4.4.4.3. Blood Metabolite Assays.....	88
4.4.4.4. Blood Insulin Assay .....	88
4.4.4.5. Polymorphonuclear Leukocyte Phagocytosis and Oxidative Burst Assays.	89
4.4.4.6. Peripheral Blood Mononuclear Cell Isolation .....	89
4.4.4.7. Peripheral Blood Mononuclear Cell Proliferation Assay .....	89

4.4.4.8.	Interferon- $\gamma$ Production.....	90
4.4.4.9.	Statistical Analysis .....	90
4.4.5.	Results .....	91
4.4.5.1.	Blood metabolite assays.....	91
4.4.5.2.	Blood Insulin.....	94
4.4.5.3.	Polymorphonuclear Leukocyte Phagocytosis and Oxidative Burst Assays.	94
4.4.5.4.	Peripheral Blood Mononuclear Cell Proliferation and Interferon- $\gamma$ Production.....	96
4.4.6.	Discussion.....	97
4.4.7.	Fundings .....	102
4.4.8.	Acknowledgments .....	102
4.4.9.	Declaration of interest .....	103
4.4.10.	References .....	103
CHAPITRE 5.....		108
DISCUSSION ET CONCLUSION .....		108
5.1	Résumé des objectifs et des principaux résultats.....	108
5.2	L'acide folique et la vitamine B12 .....	108
5.3	Les acides gras ... tous égaux? .....	109
	.....	109
5.4	Les AGNE seuls responsables? .....	110
5.5	Perspectives .....	112
BIBLIOGRAPHIE .....		115

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1</b>	Effet de la glutamine, du glucose, des corps cétoniques, des acides gras et de la balance énergétique négative sur les fonctions immunitaires des leucocytes.	17-18
<b>Table 2</b>	Milk composition of samples collected at milking on d 29 and 30 from cows injected weekly with either saline (control, C) or a mix of folic acid and vitamin B <sub>12</sub> (V).	42
<b>Table 3</b>	Concentrations of the leukocyte populations of cows injected weekly with either saline or a mix of folic acid and vitamin B <sub>12</sub> , as measured before the experiment (d -1), just before feed restriction (d 26), and after 3 d of feed restriction (d 29).	45
<b>Table 4</b>	Fatty acids used in this study	61
<b>Table 5</b>	Interferon- $\gamma$ concentration (pg/mL) in the culture media of PBMC exposed to different concentrations of fatty acids compared with untreated control.	68
<b>Table 6</b>	Interleukine-4 concentration (pg/mL) in the culture media of PBMC exposed to different concentrations of fatty acids compared with untreated control.	71
<b>Table S1</b>	Descriptive statistics of cows infused with a lipid solution (Intralipid© 20% 1 ml/kg/h) or sterile water (1 mL/kg/h).	107

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1</b>	Production laitière (millions d'hectolitres) au Canada de 1920 à 2010 (figure adaptée du Conseil canadien d'information laitière.	2
<b>Figure 2</b>	Cycle de vie de la vache laitière	6
<b>Figure 3</b>	Courbe de lactation typique des Holsteins et mesure de la persistance de lactation (Réseau Canadien pour l'Excellence Laitière, 2017).	7
<b>Figure 4</b>	Bilan énergétique de la vache laitière au cours d'une lactation (Bauman et Currie, 1980).	9
<b>Figure 5</b>	Métabolisme hépatique de la vache laitière en balance énergétique négative.	13
<b>Figure 6</b>	Relation entre l'activité de la myéloperoxydase des PMN et la concentration plasmatique en AGNE ( $R=0.44$ , $P<0.001$ ) (Hammon et al., 2006).	21
<b>Figure 7</b>	Relation d'effet de la concentration en AGNE sur la prolifération des PBMC stimulées à la concanavalin A (Ster et al., 2012).	23
<b>Figure 8</b>	Le rôle des vitamines B dans la production d'énergie mitochondriale (Kennedy, 2016).	29
<b>Figure 9</b>	Flow diagram of the experimental design.	38
<b>Figure 10</b>	Milk production of cows injected weekly with either saline or a mix of folic acid and vitamin B <sub>12</sub> .	42
<b>Figure 11</b>	Serum concentrations of BHB (A) and non-esterified fatty acids (NEFA) (B) in cows injected weekly with either saline or a mix of folic acid and vitamin, as measured before the experiment (d -1), just before feed restriction (d 26), and after 3 d of feed restriction (d 29).	44
<b>Figure 12</b>	Percentages of PMN positive for phagocytosis in cows injected weekly with either saline or a mix of folic acid and vitamin B <sub>12</sub> , as measured just before feed restriction (d 26) and after 3 d of feed restriction (d 29).	46

<b>Figure 13</b>	Percentages of PMN stimulated with phorbol 12-myristate 13-acetate that were positive for oxidative burst in cows injected weekly with either saline or a mix of folic acid and vitamin B <sub>12</sub> , as measured just before feed restriction (d 26) and after 3 d of feed restriction (d 29).	46
<b>Figure 14</b>	Percentages of proliferative peripheral blood mononuclear cells (PBMC) in cows injected weekly with either saline or a mix of folic acid and vitamin B <sub>12</sub> , as measured just before feed restriction (d 26) and after 3 d of feed restriction (d 29).	47
<b>Figure 15</b>	Percentage of lymphoproliferation in the presence of fatty acids at different concentrations compared to untreated control.	64
<b>Figure 16</b>	Percentage of cell death during the lymphoproliferation in either absence or presence of fatty acids at different concentrations.	66
<b>Figure 17</b>	Mean value of Interferon- $\gamma$ production according to the class of NEFA.	69
<b>Figure 18</b>	Mean value of interleukin-4 production according to the class of NEFA.	72
<b>Figure 19</b>	Blood concentration of NEFA (panel A) and BHB (panel B) in cows infused with a lipid solution (Intralipid <sup>®</sup> 20% 1 ml/kg/hor sterile water (control) for 6h.	92
<b>Figure 20</b>	Blood concentration of glucose (panel A) or insuline (panel B) in cows infused with a lipid solution (Intralipid <sup>®</sup> 20% 1 ml/kg/h;) or sterile water (control) for 6h.	93
<b>Figure 21</b>	Percentage of polymorphonuclear cells positive for phagocytosis (panel A) and oxidative burst (panel B) assayed from the blood of cows infused with a lipid solution (Intralipid <sup>®</sup> 20% 1 ml/kg/h;) or sterile water (control) for 6h.	95
<b>Figure 22</b>	Percentage of proliferative peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from two donors cows incubated with the sera of cows infused with a lipid solution (Intralipid <sup>®</sup> 20% 1 ml/kg/h) or sterile water (control) for 6h.	96
<b>Figure 23</b>	Concentration of INF- $\gamma$ in the culture cell supernatant of PBMC from four donors cows incubated with sera of cows infused with a lipid solution (Intralipid <sup>®</sup> 20% 1 ml/kg/h) or sterile water (control) for 6h.	97

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

<b>ADP</b>	Adénosine Diphosphate
<b>AGL</b>	Acides Gras Libres
<b>AGNE</b>	Acides gras non estérifiés
<b>ATP</b>	Adénosine Triphosphate
<b>BHB</b>	B-hydroxybutyrate
<b>CD4+</b>	Cluster de différenciation 4
<b>Con-A</b>	Concanavaleine A
<b>COX 1</b>	Cyclooxygénase 1
<b>COX 2</b>	Cyclooxygénase 2
<b>CPT- II</b>	Carnitine acyltransférase II
<b>CPT-I</b>	Carnitine acyltransférase I
<b>DHA:</b>	Acide docosahexaénoïque
<b>FFAR</b>	Récepteur à acides gras ( <i>Free fatty acid receptor</i> )
<b>GLUT4</b>	Transporteur du glucose 4
<b>Ig</b>	Immunoglobuline
<b>IL-12</b>	Interleukine-12
<b>IL-4</b>	Interleukine-4
<b>IL-6</b>	Interleukine-6
<b>INF-<math>\gamma</math></b>	Interféron- $\gamma$
<b>JeL</b>	Jour en lait
<b>LPS</b>	Lipopolysaccharides
<b>MS</b>	Matière sèche
<b>NETs</b>	Neutrophil extracellular trap
<b>NK</b>	Natural killer
<b>PBMC</b>	Cellules mononucléées sanguines périphériques
<b>PMN</b>	Leucocytes polymorphonucléaires
<b>PPAR</b>	Récepteur activé par les proliférateurs de peroxyosome
<b>RO</b>	Réactifs oxygénés
<b>TLR-4</b>	Toll-like receptor-4
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Tumor Necrosis Factor $\alpha$



# CHAPITRE 1

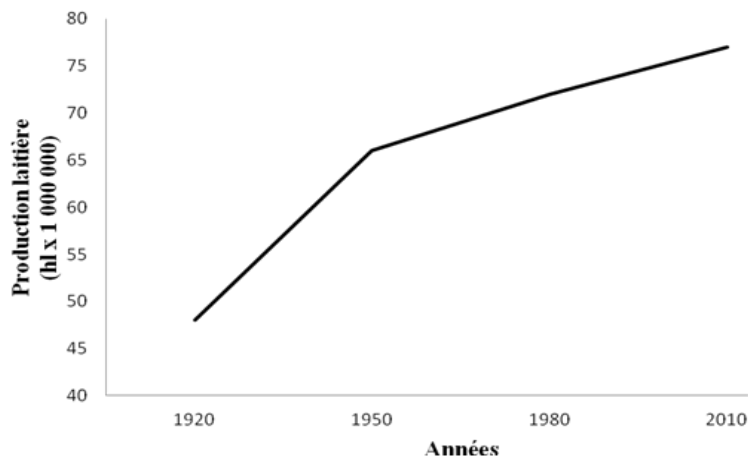
## INTRODUCTION GÉNÉRALE

### 1.1 Contexte

Au Canada, l'agriculture, et plus particulièrement la production laitière, est un important secteur de l'économie. En effet, à l'heure actuelle, le secteur de l'agriculture et de l'agroalimentaire représente 7,4% du produit intérieur brut et un emploi sur neuf à l'échelle nationale. En 2020, 10 095 fermes laitières canadiennes ont produit 93,51 millions d'hectolitres de lait. Pour la même année, la production laitière canadienne a contribué à hauteur de 7.13 milliards de dollars au PIB. En 2021, l'industrie laitière au Québec représentait 4 675 fermes laitières avec une production de 34 556 265 hectolitres de lait (site Agriculture et agroalimentaire Canada). En 2017, il y avait 113 usines de transformation, dont 57 fabriques artisanales de produits laitiers (Wert et Farms, 2017). On comprend mieux, dès lors, l'importance de la recherche en agriculture et particulièrement en production laitière.

L'agriculture d'aujourd'hui n'est plus celle de nos grands-parents. En effet, durant les dernières décennies, la production laitière a énormément changé. Entre 1951 et 1991, le nombre d'exploitations laitières a chuté de 451 000 à 28 900, alors que la production laitière a continué d'augmenter (Figure 1, site Agriculture et Agroalimentaire Canada). Ce phénomène s'explique par le fait que la production de lait par vache, mais aussi la taille des troupeaux, ont augmenté. Depuis le début des années quarante, le secteur laitier a pris conscience de l'importance de la sélection génétique et de l'alimentation pour l'amélioration de la rentabilité. Il s'est intéressé non seulement à améliorer la productivité des vaches laitières, mais aussi à la conformation, la

longévité, la facilité de vêlage, la vitesse de traite, le tempérament de traite et la performance reproductive. En effet, on est passé de vaches produisant en moyenne 2000 kg de lait par an dans les années 1930 à des vaches produisant presque 10 000 kg de lait par an à l'heure actuelle (Wert et Farms, 2017). Cependant, cela a engendré l'apparition de nouvelles problématiques. L'augmentation de la production laitière a entraîné une hausse du taux de réforme due entre autres, aux infections intramammaires, aux métrites, à des problèmes de digestion et de reproduction et à des troubles métaboliques tels que l'acétonémie ou le déplacement de caillette (Goff and Horst, 1997). Malgré nos avancées, bon nombre de vaches sont réformées après seulement une à deux lactations alors qu'il faut deux lactations pour rentabiliser son coût d'élevage. En conséquence, l'amélioration de la rentabilité amenée par l'augmentation de la production laitière est minimisée par les pertes engendrées par les traitements médicaux, les réformes précoces et l'élevage d'un plus grand nombre de génisses de remplacement.



**Figure 1: Production laitière (millions d'hectolitres) au Canada de 1920 à 2010 (figure adaptée du Conseil canadien d'information laitière).**

Les vaches laitières sont plus susceptibles de développer des problèmes de santé lors de deux périodes critiques, à savoir la période péripartum (ou période de transition) et le tarissement. Selon Leblanc (2010), environ 75% des maladies se déclarent dans le premier mois suivant le

vêlage et 36% des mortalités surviennent moins de 60 jours après le vêlage. En effet, durant la période de transition de la gestation à la lactation, on observe une augmentation simultanée de l'incidence des maladies métaboliques (fièvre du lait, rétention placentaire, cétose, déplacement de l'abomasum, boiterie) et infectieuses (métrite, mammite clinique, etc. Goff et Horst, 1997). Selon LeBlanc et al. (2010) 30 à 50% des vaches laitières contractent une certaine forme de maladie métabolique ou infectieuse au moment du vêlage.

Parmi les différentes maladies infectieuses apparaissant lors de la période péripartum, la métrite et la mammite font partie de celles les plus fréquemment observées. La métrite est une inflammation sévère de toutes les couches de l'utérus (muqueuse et sous-muqueuse de l'endomètre, ainsi que des couches musculaires et séreuses, Carlos et al., 2007)). Elle se développe généralement dans les 21 premiers jours après la parturition et est caractérisée par un utérus gonflé et des écoulements de liquide rouge-brun aqueux souvent accompagné de mauvaises odeurs (Dervishi et al., 2016). L'incidence de la métrite varie selon la race, le pays et le troupeau. Cependant, lors d'une étude menée sur 97 318 vaches aux États-Unis, l'incidence de la métrite chez des vaches en lactation était de 21%. Et pour certaines études, l'incidence atteint 40 % du troupeau (Sheldon, 2019). Le développement de cette maladie s'explique par le fait qu'après la parturition, la barrière physique formée par le cervix du vagin et la vulve est compromise permettant ainsi aux bactéries pathogènes de remonter dans le tractus génital. Lors d'une infection telle que la métrite, plusieurs mécanismes immunitaires vont se mettre en place. La reconnaissance de l'agent pathogène par les cellules immunitaires engendre une inflammation locale et parfois systémique. En effet, les cellules immunitaires vont libérer différents médiateurs inflammatoires tels que le facteur de nécrose tumorale  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), l'interleukine 1 et l'interleukine 6 qui jouent notamment un rôle dans l'augmentation de la température corporelle et la diminution de la prise alimentaire. L'augmentation de la concentration sanguine en cytokines déclenche la production de protéines de la phase aiguës telles que l'haptoglobine, l'amyloïde A sérique et la protéine de liaison aux lipopolysaccharides. Plusieurs études ont également rapporté des altérations des métabolites sanguins et des cytokines (Dervishi et al., 2016). En 2006, Hammon et al., ont montré que les vaches atteintes de métrite avaient des concentrations sanguines en AGNE et en BHB significativement plus

élevées en période post-partum. Ceci suggère que les vaches ayant un bilan énergétique négatif en période péripartum sont prédisposées à une immunodépression. La mammites quant à elle est une réaction inflammatoire de la glande mammaire causée par une infection microbiologique. Cette maladie provoque entre autres une diminution de la production laitière, ce qui engendre des coûts pour l'éleveur. La diminution de la production laitière est due aux dommages tissulaires causés par l'infection qui diminue le nombre et l'activité des cellules épithéliales (Zaho et Lacasse, 2008). Lors de l'infection de la glande mammaire, plusieurs mécanismes vont se mettre en place dont l'activation des cellules épithéliales mammaires, de la phagocytose, de la production de cytokines et de chimiokines. Parmi les cytokines impliquées on retrouve le TNF- $\alpha$  sécrété pas les macrophages, mais aussi par les cellules épithéliales mammaires. Celui-ci joue un rôle dans l'activation de l'immunité innée et adaptative (Ballou, 2012).

Concernant les maladies métaboliques, les principales qui se développent en période péripartum sont l'hypocalcémie et l'acétonémie. L'hypocalcémie est causée par la redirection du calcium vers la glande mammaire pour la production de lait. Cette maladie est communément appelée la fièvre de lait et peut mener à des difficultés pour la vache à se lever étant donné que le calcium est nécessaire au fonctionnement des muscles et des nerfs. L'hypocalcémie peut aussi provoquer une diminution de la prise alimentaire, de la motilité du rumen et des intestins et une augmentation de la susceptibilité à d'autres maladies métaboliques et infectieuses (Goff 2008). Il est à noter que l'hypocalcémie est un facteur de risque pour le déplacement de caillette (Massey et al., 1993). Selon Gordon et al. (2013), l'acétonémie subclinique affecte environ 40 % des lactations en Amérique du Nord en période péripartum. Cette maladie est caractérisée par une augmentation dans l'urine, le sang et le lait des corps cétoniques. Elle est considérée clinique lorsque d'autres signes tels de l'inappétence, une perte rapide de poids et des selles sèches apparaissent. L'augmentation des corps cétoniques est provoquée par la forte demande énergétique exercée par la production de lait en début de lactation. En effet, la vache en acétonémie se retrouve incapable de compenser la demande énergétique via l'alimentation et va dès lors puiser dans ses réserves de graisse qui seront métabolisées au niveau du foie pour *in fine* provoquer une augmentation des corps cétoniques. Le mécanisme sera plus amplement détaillé ci-après. Les coûts associés à l'acétonémie comprennent le traitement de la maladie, un

risque accru d'apparition d'autres maladies, diminution de la production de lait, diminution des performances de reproduction et augmentation de risque de réforme dans les 30 premiers jours de lactation.

Au vu des risques accrus encourus par la vache laitière en période péripartum de développer un problème de santé, il est important, aussi bien pour le bien-être de l'animal que pour celui de l'éleveur, de mieux comprendre les mécanismes physiologiques impliqués afin d'en minimiser leur impact.

## **1.2 Lactation**

La lactation est une fonction qui caractérise une classe entière d'animaux : les mammifères. Cette fonction est apparue au cours de l'évolution et a permis d'augmenter les chances de survie de la progéniture (Akers, 2002). Le lait joue non seulement un rôle alimentaire, mais aussi protecteur. En effet, pour bon nombre de mammifères, il y a un transfert d'immunité entre la mère et le fœtus via le placenta et entre la mère et le nouveau-né via le colostrum. C'est ce que l'on appelle l'immunité passive. Étant donné que le type de placenta diffère en fonction des espèces, l'immunité passive ne sera pas la même en fonction du type de placentation. En effet, dépendamment de l'espèce, le nombre de couches histologiques séparant le sang fœtal du sang maternel varie. Or, la capacité des immunoglobulines G (Ig G), seules capables de traverser ces couches, et donc à passer du sang maternel vers la circulation fœtale, dépend du nombre de couches histologiques. Chez les ruminants, le nombre de couches est de 5 ce qui rend le transfert d'immunoglobulines très difficile. Par conséquent, le système immunitaire du nouveau-né est immature à la naissance. Pour cette espèce, le colostrum, qui est le lait produit dans les premiers jours suivant la mise bas, est la principale source d'immunoglobulines de type G et A pour le nouveau-né. Il est donc primordial pour un veau de boire du colostrum dans les 48h suivant sa naissance, car les jonctions serrées au niveau des cellules intestinales sont ouvertes et permettent le passage des immunoglobulines. Dans le milieu agricole, il est bien connu qu'un veau n'ayant pas reçu de colostrum a très peu de chance de survie (Martinet et Houbedine, 1993).

### 1.2.1 Cycle de lactation

La vie d'une vache peut se diviser en plusieurs étapes (Figure 2). À partir de la naissance, la génisse va être nourrie et surveillée afin de s'assurer du bon déroulement de sa croissance et de son développement. Vers l'âge de 15 mois, la génisse est mise à la reproduction. Après les 9 mois de gestation, elle va mettre bas et le veau sera soit gardé pour le renouvellement du cheptel ou bien vendu, et la production de lait va débuter. Deux mois après son vêlage, elle est de nouveau mise à la reproduction. La vache va produire du lait pour une période d'environ 10 mois. Avant la naissance du prochain veau, la vache est tarie pour une période d'environ 2 mois. Par la suite, la vache produira en moyenne un veau par an et produira du lait 10 mois par an.

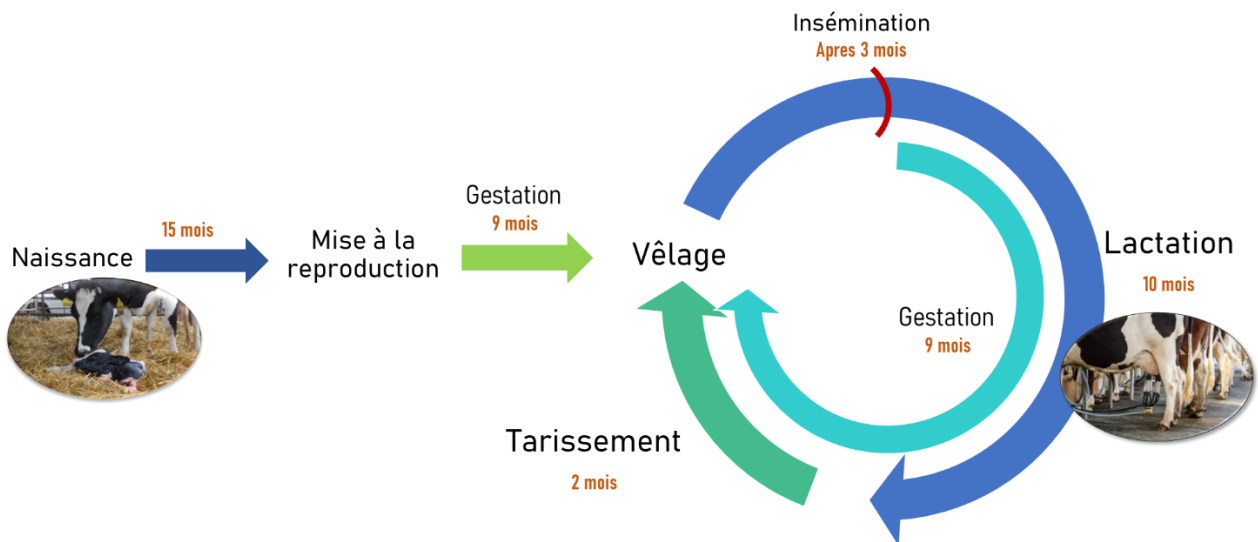
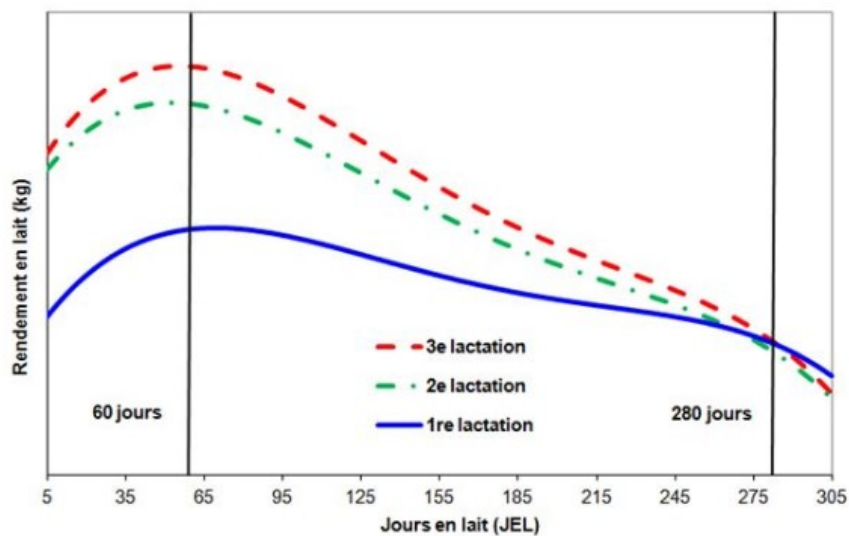


Figure 2 : Cycle de vie de la vache laitière.

## 1.2.2 Production de lait

Pour qu'il y ait une production de lait, il faut qu'il y ait une gestation. Durant celle-ci, plusieurs mécanismes se mettent en place. Vers la fin de la gestation des sécrétions lactées commencent à apparaître, c'est ce que l'on appelle la lactogenèse I. Elle est provoquée par la différenciation cellulaire et les changements enzymatiques. En période péripartum, la production de lait de manière plus abondante est enclenchée, cette phase est appelée lactogenèse II qui fait suite à de nombreux remaniements cellulaires et hormonaux. À la mise bas, la production de lait va augmenter graduellement afin de suivre les besoins du nouveau-né et atteindre un pic de production (Figure 3) à environ 8 semaines post-partum. Cette phase de maintien de lactation est appelée la galactopoïèse. La production va ensuite graduellement décroître jusqu'à s'arrêter, c'est la période de tarissement, laquelle est nécessaire au renouvellement cellulaire afin d'optimiser la production pour la lactation suivante (Martinet et Houbedine, 1993).



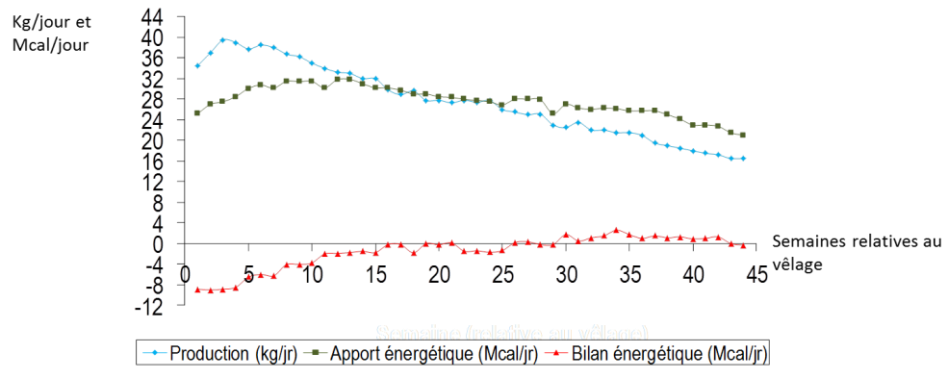
**Figure 3: Courbe de lactation typique des Holsteins et mesure de la persistance de lactation (Réseau Canadien pour l'Excellence Laitière, 2017).**

Dans le cadre de cette thèse, la période à laquelle nous allons nous intéresser est la période péripartum aussi appelée période de transition. Il est communément admis que la période péripartum est la période allant de 3 semaines précédant le vêlage à 3 semaines suivant le vêlage (Grummer, 1995). La transition de la période de gestation à la période de lactation, soumet les vaches à de grands changements physiologiques, métaboliques et hormonaux.

### **1.3 Adaptations métaboliques associées à la période péripartum**

Au moment de la parturition, l'organisme de la vache subit de grands changements métaboliques. En effet, bien qu'en fin de gestation la demande énergétique de l'unité foetoplacentaire soit à son maximum, elle ne représente que la moitié de celle nécessaire pour produire 25 kg de lait par jour (Drackley et al., 2005). Dans la nature, le veau naissant n'exige pas une forte production de lait, car sa consommation est proportionnelle à son développement. Grâce à des mécanismes biologiques de régulation, la production de lait augmente graduellement, laissant le temps à l'organisme de la vache de s'adapter à la demande énergétique. Cependant, dans les conditions d'élevage actuelles, la vache est soumise à la trayeuse dont la consommation n'est pas limitée. Ainsi, la vache passe en seulement quelques heures d'une demande nutritionnelle faible à une demande forte. De plus, en période péripartum, on observe une diminution de la prise alimentaire due, entre autres, au fait que le rumen se retrouve écrasé par l'utérus et que la flore ruminale doit s'adapter au changement d'alimentation. Ces deux facteurs combinés engendrent une balance énergétique négative en début de lactation chez la vache laitière (Figure 4). En effet, celle-ci se retrouve incapable de compenser par une augmentation de la prise alimentaire la demande énergétique exigée par la production de lait.





**Figure 4: Bilan énergétique de la vache laitière au cours d'une lactation (Bauman et Currie, 1980).**

### 1.3.1 Glucose

Le glucose est la principale source d'énergie pour bon nombre d'organes et une source indispensable pour le cerveau (Lema-Perez, 2021). Il est également nécessaire pour le développement du fœtus et pour la synthèse du lait. En effet, le glucose est essentiel à la synthèse du lactose. Le lactose est un sucre du lait et est le principal responsable de la pression osmotique du lait et, donc, de son volume. Chez la vache gravide, le glucose est la source la plus importante d'énergie pour l'oxydation dans les tissus placentaires et fœtaux (Bell, 1995). Dès lors, on comprend pourquoi un approvisionnement en glucose est une priorité métabolique pour l'animal gravide ou allaitant. Chez la vache laitière, un manque de glucose peut conduire à une acidocétose (Drackley et al., 2005). Cette nécessité en glucose pour le fœtus et pour la production de lait a mené à des adaptations métaboliques qui sont régulées et coordonnées pour assurer un apport constant à l'utérus gravide et à la glande mammaire active en dépit des variations environnementales ou de l'alimentation maternelle (Bell, 1995).

Chez le ruminant, la quantité de glucose absorbée est très faible. En effet, les glucides sont dégradés par les microorganismes du rumen, ce qui explique qu'il en reste peu pour l'absorption au niveau de l'intestin. C'est donc la gluconéogenèse qui est la voie principale d'approvisionnement en glucose. Le principal précurseur de la gluconéogenèse hépatique est le

propionate, un des principaux acides gras volatils produits lors de la fermentation prégastrique. Celui-ci est absorbé par l'épithélium ruminal dans le sang de la veine porte pour être amené au foie. Le taux de production d'acide gras volatil, et donc de propionate, est directement corrélé avec la quantité de substrat fermentable ingéré par l'animal. Le propionate est principalement obtenu à partir de la fermentation de l'amidon par les bactéries amylolytiques. Cependant, en période de forte demande en glucose, d'autres substrats glycogéniques deviennent tout aussi importants tels que le lactate, certains acides aminés et le glycérol. L'utilisation par le foie de ces derniers précurseurs du glucose est contrôlée soit par l'effet positif du glucagon ou celui négatif de l'insuline, plutôt que par le propionate lui-même (Bell and Bauman, 1997, Drackley et al., 2001).

Au moment de la parturition, le processus de production abondante de lait s'enclenche. Durant cette période, la quantité de glucose nécessaire va augmenter soudainement afin de synthétiser le lactose. En effet, elle passe de 1000-1100 g/jour 3 semaines avant le vêlage à  $\geq 2500$  g/jour 3 semaines après (Reynolds et al 2003). Au maximum de sécrétion, la glande mammaire nécessite jusqu'à 80 % du glucose disponible. Pour répondre à cette demande, des mécanismes vont se mettre en place de manière coordonnée : le taux de gluconéogenèse dans le foie augmente de manière radicale et les réserves de glycogène sont mobilisées. Une partie de l'augmentation de la gluconéogenèse vient de l'augmentation de la prise alimentaire en début de lactation. De plus, la synthèse de glucose totale par jour augmente même si une prise alimentaire constante est maintenue. Le taux de gluconéogenèse doit doubler rapidement alors que l'apport en propionate, ou en autre substrat glycogénique d'origine alimentaire, n'augmente pas de la même manière. La vache n'a dès lors pas d'autre choix que d'aller puiser dans les réserves corporelles, notamment dans les réserves protéiques (Bell 1995, Bell et Bauman, 1997). En début de lactation, les vaches se retrouvent en hypoglycémie, car incapables de répondre à la demande en glycogène exercée par la glande mammaire (Loiselle et al., 2009).

### 1.3.2 Insuline

L'insuline est une hormone peptidique sécrétée par les cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans du pancréas. Elle joue un rôle d'importance dans la régulation des substrats énergétiques tels le glucose, les lipides et les protéines. Elle a pour fonction notamment d'augmenter l'absorption cellulaire du glucose, de bloquer la synthèse du glucose par le foie lui conférant un effet hypoglycémiant, mais aussi elle empêche la dégradation du glycogène hépatique et musculaire. Elle active la synthèse de triglycérides adipeux et des protéines des muscles squelettiques. La sécrétion de l'insuline est dépendante de la concentration sanguine en glucose. En effet, lorsque l'absorption de glucose par les cellules  $\beta$  augmente (par exemple après un repas), la métabolisation de glucose intracellulaire s'intensifie ce qui augmente le ratio ATP-ADP et provoque la fermeture des canaux potassiques sensibles à l'ATP. S'en suit une dépolarisation de la membrane cellulaire engendrant l'ouverture des canaux calciques voltage-dépendant et amène un afflux de calcium exogène vers l'intérieur de la cellule. L'augmentation intracellulaire de calcium déclenche alors la sécrétion d'insuline (Baumgard et al., 2016).

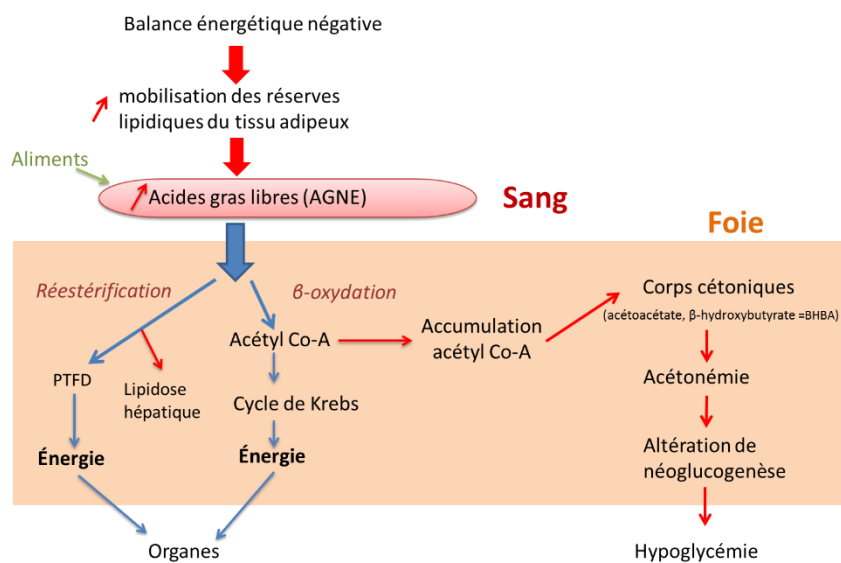
Outre l'augmentation de la gluconéogenèse mise en place pour répondre à la demande en glucose exercée par le fœtus et le début de la lactation, un autre mécanisme va être enclenché. En effet, en début de lactation, les tissus périphériques deviennent insulino-résistants afin de permettre l'utilisation du glucose par la glande mammaire pour la production de lait puisque l'absorption du glucose par celle-ci n'est pas dépendante de l'insuline. La résistance à l'insuline est définie comme un état où une concentration normale d'insuline induit une diminution de la réponse biologique dans les tissus sensibles à l'insuline (De Koster et Opsomer, 2013). Une insulino-résistance transitoire en début de lactation est donc un des mécanismes d'adaptation afin de maintenir l'homéostasie du glucose (Bell et Bauman, 1997). Dans les dernières années, plusieurs études se sont intéressées aux mécanismes impliqués dans cette insulino-résistance. Elles ont entre autres montré que les AGNE jouent un rôle dans ce mécanisme puisque des concentrations élevées en AGNE (induites soit par restriction alimentaire ou par une infusion intraveineuse de suif) ont provoqué une altération de la sensibilité à l'insuline (Schoenberg et al., 2012, Oikawa et al., 2006, Pires et al., 2007). Le mécanisme exact par lequel les AGNE

induisent l'insulinorésistance chez la vache laitière est à ce jour encore inconnu. Pour tenter de comprendre les voies possiblement impliquées, il faut se pencher sur les études menées chez l'humain. Le premier mécanisme envisagé est le cycle de Rankle ou autrement appelé le « cycle glucose-acide gras ». Il implique que dans certains états métaboliques il y a une compétition de l'utilisation du glucose ou des acides gras par les muscles squelettiques, le cœur, le foie et le pancréas. En effet, dans le cas où il y a une abondante disponibilité en acides gras, leur oxydation va inhiber l'utilisation du glucose en tant que substrat énergétique pour le métabolisme cellulaire. Ce processus est médié par différentes voies biologiques telles que l'inhibition de la pyruvate déshydrogénase, de l'activité de la phosphofructokinase et de l'hexokinase ou encore une diminution de la translocation de GLUT4 (transporteur du glucose 4) dans les muscles squelettiques (De Koster et Opsomer, 2013). Un autre mécanisme impliqué est la diminution de la sensibilité des tissus à l'insuline qui peut être comparée au diabète de type 2 chez l'homme (Youssef et El-Ashker, 2017). Pour les personnes atteintes par ce type de diabète, on observe une augmentation de la concentration plasmatique en AGNE qui résulte d'une lipolyse excessive. Une étude menée en 2018 par Liang et al., a montré que chez des sujets humains sains, une infusion à faible dose de lipides a induit une résistance à l'insuline et une réponse pro-inflammatoire qui seraient médiées par l'activation des récepteurs de type Toll 4 (TLR-4) chez les monocytes en circulation ce qui a pour effet de stimuler les voies biologiques associées. Les TLR-4 sont des médiateurs de la réponse inflammatoire induite par les LPS (lipopolysaccharides, Chow et al., 1999). L'augmentation en AGNE en période péripartum est non seulement responsable de l'insulinorésistance, mais est aussi capable de moduler la réponse inflammatoire (Liang et al., 2018). Une insulinorésistance qui persiste dans le temps est donc nocive pour le système immunitaire de la vache laitière.

### **1.3.3 Mobilisation des réserves adipeuses**

Le glucose étant redirigé vers la glande mammaire et la production de lait, la vache va mobiliser ses réserves de tissu adipeux afin de combler ses besoins énergétiques. Une lipolyse massive, qui consiste en une hydrolyse enzymatique par les lipases, va dès lors se mettre en place. Cela

va permettre de libérer des acides gras sous forme non estérifiée (AGNE) dans la circulation sanguine. Ces AGNE vont être captés par différents organes, dont le cœur, les muscles squelettiques et, surtout, le foie. Le métabolisme hépatique des acides gras du ruminant se caractérise par trois voies métaboliques distinctes : l'oxydation, l'estérification et l'excrétion via la bile (Figure 5).



**Figure 5: Métabolisme hépatique de la vache laitière en balance énergétique négative** (PTFD : protéine de très faible densité).

#### A) Oxydation

Les acides gras présents dans le cytoplasme vont réagir avec la coenzyme A pour former de l'acyl Co-A en présence de l'acyl Co-A synthétase. La molécule d'acyl Co-A ainsi formée va ensuite passer du cytosol à la mitochondrie via un système de transport complexe impliquant deux carnitine acyl-transférases et une carnitine acyl-translocase. La carnitine acyltransférase I (CPT-I) va convertir les acides gras à longues chaînes en acylcarnitine par transfert d'un groupe acyl. Dans la matrice, les molécules d'acylcarnitine peuvent restituer leur groupe acyl à une

coenzyme A sous l'action d'une carnitine acyltransférase II (CPT-II) afin de redonner de l'acyl co-A. L'activité de la CPT-I est l'étape limitante de l'oxydation mitochondriale des acides gras et donc indirectement de la cétogenèse. L'activité de de la CPT-I est sensible à l'inhibition au malonyl-Co-A. Dann and Drackley (2005) ont montré que l'activité de la CPT-I et sa sensibilité à la molécule inhibitrice malonyl-CoA sont modifiées pendant la période de transition. La molécule de malonyl Co-A est sensible aux changements d'insuline et de glucagon/adrénaline chez les ruminants, augmentant quand l'insuline augmente et vice versa. Une fois l'acyl Co-A entré dans la mitochondrie, il va subir la  $\beta$ -oxydation et donner de l'acétyl Co-A. Celui-ci va ensuite entrer dans le cycle de Krebs où il fait partie de la première étape des réactions en catalysant la réaction de transformation de l'oxaloacétate en citrate.

L'oxydation des acides gras, qui permet de produire de l'énergie, dépend donc du cycle de Krebs et de la disponibilité en oxaloacétate. En période de balance énergétique négative, l'oxaloacétate devient limitant à cause du manque de glucose. L'acétyl Co-A va alors s'accumuler au niveau du foie et subir une oxydation partielle résultant en la production de corps cétoniques tels l'acétone, l'acétone ou le BHB. Les corps cétoniques relâchés par le foie peuvent agir comme source énergétique alternative pour des tissus tels que le cerveau ou le cœur. La présence d'AGNE et de BHB fait partie du processus normal d'adaptation face à la balance énergétique négative en début de lactation (McArt et al., 2013). En effet, en début de lactation, la concentration en insuline de la vache diminue ce qui permet d'augmenter la lipolyse des tissus adipeux et de diminuer la lipogenèse, et donc de diminuer le taux de malonyl Co-A. Ceci permet d'augmenter l'oxydation hépatique des acides gras et des corps cétoniques. Cependant, l'accumulation au niveau sanguin de ces corps cétoniques peut provoquer une maladie métabolique appelée acétonémie. Celle-ci se caractérise par l'apparition de corps cétoniques dans le sang, le lait et les urines. L'acétonémie clinique devient généralement évidente entre 10 jours et jusqu'à 3 semaines post-vêlage. La vache devient alors apathique et diminue sa consommation alimentaire. De plus, chez les animaux souffrant d'acétonémie, le processus de gluconéogenèse est généralement réduit, ce qui provoque une hypoglycémie (Gordon et al., 2013). Puisque la production de lait requiert une grande quantité de glucose, le volume de lait produit est alors réduit.

## B) Estérification

L'autre voie que les acyl Co-A peuvent emprunter est la voie de l'estérification dans le réticulum endoplasmique lisse où ils vont être transformés en triacylglycérols et être exportés sous forme de lipoprotéines de très faibles densités (Cuvelier et al., 2004). En condition de balance énergétique positive, cette voie est privilégiée plutôt que la voie de l'oxydation. En période péripartum, l'estérification est augmentée en raison de la forte mobilisation lipidique et de la diminution de la prise alimentaire due au peu d'espace disponible pour le rumen. Ce qui provoque un afflux massif d'AGNE vers le foie. Chez le ruminant, le niveau d'activité de la glycérophosphate acyltransférase, l'enzyme catalysant la première réaction de la synthèse des triacylglycérols, est plus faible au niveau du foie qu'au niveau du tissu adipeux. Ceci limiterait donc la quantité de triacylglycérols formés lors de la mobilisation lipidique, favorisant ainsi la  $\beta$ -oxydation et donc la cétogenèse. Kleppe et al. (1988) ont montré que la capacité d'exportation des triacylglycérols dans les lipoprotéines de très faible densité était 25 fois plus faible chez le ruminant que chez le rat alors que le taux d'estérification est le même. Ceci peut provoquer une accumulation des triacylglycérols au niveau du foie et engendrer une stéatose hépatique. Cette condition est fréquemment observée chez les vaches laitières hautes productrices en début de lactation (Pullen et al., 1990). Cette accumulation dans les hépatocytes provoque une altération des fonctions du foie, notamment la fonction de détoxification et la gluconéogenèse, cette dernière pouvant provoquer une hypoglycémie.

## C) Excrétion via la bile

Les acides gras peuvent être excrétés dans la bile. Cette voie est une voie mineure chez le ruminant en comparaison à l'oxydation et à l'estérification.

### **1.3.4 Profil des acides gras libérés**

La lipomobilisation qui a lieu durant la période péripartum va non seulement affecter la concentration sanguine en AGNE, mais aussi leur composition. Les acides gras peuvent être transportés dans le sang sous 3 formes. La première appelée les lipides neutres est principalement composée de triglycérides, diglycérides, monoglycérides et d'esters de cholestérol. La deuxième est sous forme de phospholipides et enfin la dernière sous forme d'AGNE (Contreras et al., 2010). Le type d'acides gras qui va être mobilisé en période de balance énergétique négative pour les vaches laitières peut varier en fonction de l'alimentation (Douglas et al., 2007). Dans leur étude, Contreras et al. (2010) ont étudié la variation de la concentration, mais aussi le type d'acides gras que l'on retrouve dans le sang autour de la parturition. Ils ont montré que le jour du vêlage pour la fraction en AGNE plasmatiques, les acides gras présents en plus forte proportion étaient en premier lieu l'acide stéarique suivi dans l'ordre décroissant par l'acide palmitique, l'acide oléique, l'acide myristique, l'acide docosahexaénoïque l'acide linoléique et enfin l'acide éicosapentaénoïque. Tandis que pour la fraction de phospholipide plasmatique, la proportion suivait l'ordre suivant : l'acide stéarique, l'acide palmitique, l'acide oléique, l'acide myristique, l'acide éicosapentaénoïque, l'acide arachidonique, l'acide docosahexaénoïque et enfin l'acide linoléique. On peut donc constater que les principaux acides gras sont des acides gras saturés ou monoinsaturés à longues chaînes.

## **1.4 Impact des adaptations métaboliques sur le système immunitaire**

Toutes les adaptations métaboliques en période péripartum décrites ci-dessus ont un impact sur le système immunitaire. En effet, au début de la lactation, la plupart des vaches subissent une immunodépression (Mallard et al., 1998; Harp et al, 1991). Il est communément admis que cette immunodépression est liée à la balance énergétique négative des vaches en début de lactation (Kehrli et al., 1989; Ingvarlsen and Moyes, 2013). Il existe une relation complexe entre le statut métabolique et les fonctions immunitaires qui augmente le risque de maladies en début de lactation (Tableau 1). En période péripartum, il est difficile de déterminer l'impact du statut



métabolique sur le système immunitaire, car bon nombre de paramètres entrent en jeu. En effet, outre la balance énergétique négative, le vèlage implique des perturbations hormonales, environnementales, physiques, etc.

**Tableau 1: Effet de la glutamine, du glucose, des corps cétoniques, des acides gras et de la balance énergétique négative sur les fonctions immunitaires des leucocytes.**

Variable	Effets sur l'immunité		Références
	Inhibiteur	Stimulateur	
Glutamine		Production de cytokines et ROM; division cellulaire; phagocytose; abondance des cellules T CD4	Ogle et al. (1994), Wallace et Keast (1992), Yassard et al. (1997), Newsholme et al. (1985 et 1999), Doepel et al. (2006)
Glucose		Prolifération; différenciation; survie; chimiotaxie; phagocytose	Barghouthi et al. (1995), Gamelli et al. (1996), Pithon-Curi et al. (2004), Klucinski et al. (1988)
Corps cétoniques	Chimiotaxie; flambée oxydative; phagocytose; production ROM; Blastogenèse des lymphocytes; sécrétion des Ig M		Suriyasathaporn et al. (1999), Hoeben et al. (1997), Sartorelli et al. (1999), Nonnecke et al. (1992), Sato et al. (1995), Targowski et Klucinski (1983)

(Adapté de Ingvarlsen and Moyes, 2013)

**Tableau 1 suite: Effet de la glutamine, du glucose, des corps cétoniques, des acides gras et de la balance énergétique négative sur les fonctions immunitaires des leucocytes.**

Acides gras	Sécrétion des Ig M; production de cytokines; viabilité cellulaire; phagocytose; diapédèse, présentation antigénique	Flambée oxydative, nécrose; phagocytose; production de cytokines et de ROM; activation et signalisation des TLR	Lacetera et al. (2004), Scalia et al. (2006), Calder et al. (1990), Brassard et al. (2007), Hughes et Pinder (2000), Rezamand et McGuire (2011), Gorjao et al. (2006), Lee et al. (2003 et 2004), Ster et al. (2012)
Balance énergétique	Phagocytose; chimiotaxie; diapédèse; présentation antigénique; réponse de phase aiguë; flambée oxydative; production de cytokines	Diapédèse; présentation antigénique; réponse de phase aiguë; production de cytokines; Signalisation des TLR	Perkins et al. (2001), Moyes et al. (2009 et 2010), Stevens et al. (2011), Ster et al. (2012), Carbonneau et al. (2012)

---

ROM = métabolites réactifs de l'oxygène; Ig M = immunoglobuline M; TLR= récepteur Toll-like

(Adapté de Ingvarlsen and Moyes, 2013)

Afin de déterminer si l'immunosuppression est due aux besoins physiologiques associés avec le début de la lactation ou bien à la parturition en elle-même, Kimura et al. (2002) ont comparé les changements de populations leucocytaires au moment de la parturition chez des vaches mastectomisées et intactes. Une diminution des sous-populations de lymphocytes T et notamment des cellules CD4<sup>+</sup> a été observée. De plus, la mastectomie a pratiquement éliminé tous les changements dans les sous-populations de leucocytes observés chez les vaches intactes. Ceci suggère que la parturition n'est pas le facteur principal de ces changements, mais que ceux-ci sont plutôt dus au déclenchement de la lactation. En 2003, Nonnecke et al. ont rapporté la production d'immunoglobulines (Ig) G et M, et d'INF- $\gamma$  ainsi que la lymphoprolifération chez des vaches mastectomisées ou non mastectomisées. Ils ont observé que ces différents paramètres diminuaient avant la parturition chez les vaches non-mastectomisées et que cette diminution était à son maximum entre 0 et 4 jours post-partum. Cependant, ces différents paramètres sont restés stables chez les vaches mastectomisées. Ceci supporte à nouveau l'idée que la réduction des fonctions des cellules leucocytaires est, en tout ou en partie, due à la demande physiologique imposée par la production de lait.

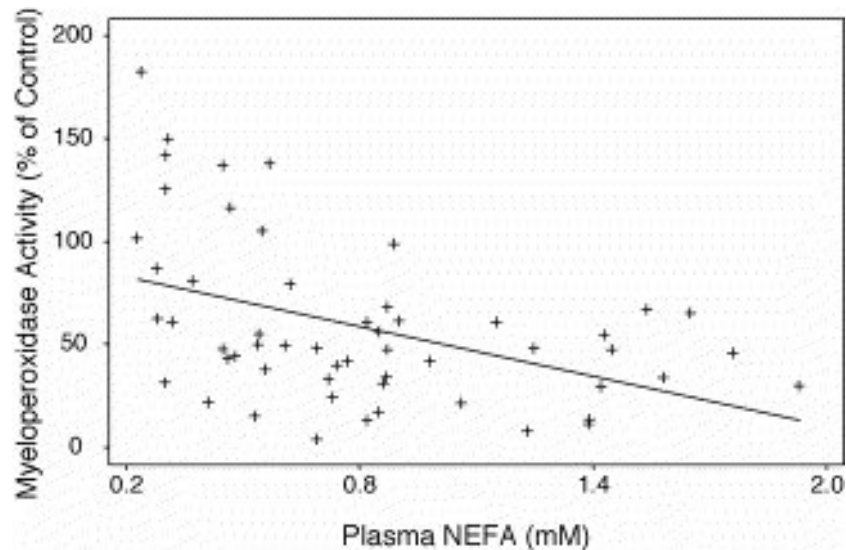
La période avoisinant la parturition est aussi connue pour être associée à un état inflammatoire plus ou moins sévère (Norman et al., 2007; Bertoni et al., 2008). Huzzey et al. (2015) ont observé une augmentation en période péripartum des concentrations des analytes associés au stress, tel que les métabolites fécaux du cortisol, et à l'inflammation, telle que l'haptoglobine. Ils ont également relevé une association entre ces élévations et une production laitière réduite ainsi que des troubles des performances de reproduction plus tard durant la lactation. Bertoni et al. (2004) ont étudié l'effet de l'administration d'un anti-inflammatoire, l'acide acétylsalicylique, dans les 5 premiers jours de lactation. L'acétyl-salicylique est capable d'inhiber les deux cyclooxygénase COX1 et COX2 (cyclooxygénase 1 et 2) qui sont des enzymes clés de la réaction inflammatoire. Ils ont ainsi observé une diminution de l'incidence des troubles cliniques ainsi que de la sévérité de la réponse inflammatoire. Cet état inflammatoire empire la balance énergétique. En effet, les cytokines pro-inflammatoires libérées durant cette phase augmentent la proportion d'énergie utilisée pour supporter une activité plus forte du système immunitaire. Trevisi et al. (2010) ont mis en évidence une association entre

une plus faible réponse inflammatoire durant la période péripartum lorsqu'il y a une balance énergétique négative moins sévère et un meilleur état de santé. Ceci suggère encore une fois qu'il existe une relation claire entre la balance énergétique négative et l'augmentation de problèmes de santé observés en période péripartum.

En temps normal, le niveau de réactifs oxygénés (RO) est maintenu à l'intérieur d'une fourchette physiologique très étroite, grâce à un réseau de mécanismes de défense antioxydants, afin d'optimiser les performances cellulaires et de prévenir des dommages au niveau des tissus. Pendant la période péripartum, la production de RO augmente à cause de la mobilisation lipidique, ce qui peut occasionner des atteintes cellulaires et tissulaires. Cette condition est reconnue comme étant le stress oxydatif. Il a été constaté que le stress oxydatif est un facteur pouvant mener à des dysfonctionnements immunitaires et inflammatoires, et plus particulièrement en période de grand stress métabolique (Sordillo and Aitken, 2009). De ce fait, les vaches ayant une mobilisation lipidique rapide peuvent subir un stress oxydatif plus grand, provoquant des dommages tissulaires. Ceci contribuerait au fait que les vaches en situation de balance énergétique négative ont plus de risque de souffrir de maladies en période péripartum (Ingvartsen and Moyes, 2013).

En 2006, Hammon et al. ont étudié l'activité de la myéloperoxydase et l'activité de réduction du cytochrome C chez des vaches multipares en période péripartum. La myéloperoxydase est une enzyme très abondante dans les granules des neutrophiles polymorphonucléaires (PMN) et permet de produire de l'acide hypochloreux (HOCl) qui lui confère son activité antimicrobienne. Elle est active durant la flambée oxydative. Leurs résultats montrent qu'il existe une association entre le bilan énergétique avant le vêlage et les dysfonctionnements des PMN durant la période péripartum. En effet, l'augmentation des AGNE ainsi que la diminution de la quantité de matière sèche ingérée avant la parturition ont été associées à la suppression de l'activité de la myéloperoxydase des PMN, mais pas à la réduction de l'activité de la cytochrome C. L'activité de la myéloperoxydase des PMN et la concentration en AGNE durant les jours entourant le vêlage étaient corrélées négativement, suggérant que les vaches en balance énergétique négative seraient prédisposées à une suppression immunitaire en période péripartum (Figure 6). Jusqu'alors, on avait constaté que le statut énergétique des vaches après la parturition semblait

avoir un lien avec les dysfonctionnements immunitaires en période péripartum. L'étude de Hammon et al. (2006) montre que les perturbations métaboliques survenant avant le vêlage prédisposent les vaches par la suite à des problèmes de santé utérins.



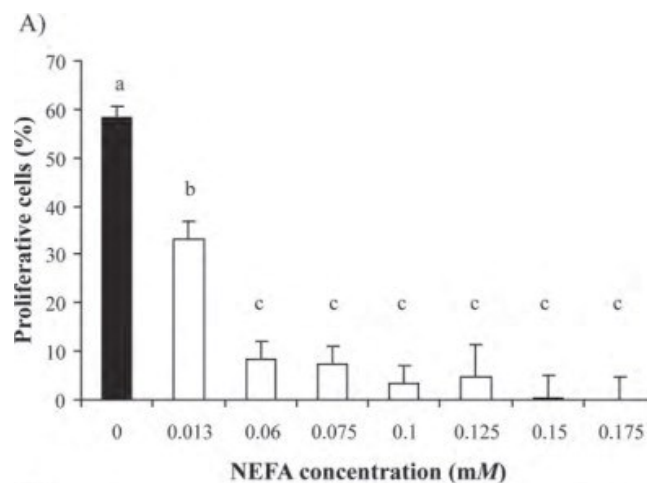
**Figure 6 : Relation entre l'activité de la myéloperoxydase des PMN et la concentration plasmatique en AGNE ( $R=0,44$ ,  $P< 0,001$ ) (Hammon et al., 2006).**

Chez les vaches périparturientes, et plus particulièrement chez les vaches hautes productrices, une concentration élevée en BHB dans le sang est généralement observée. Ospina et al. (2010) ont relevé que des concentrations élevées en AGNE et BHB étaient associées au développement de maladies telles que le déplacement de caillette, l'acétonémie clinique, la métrite ou encore la rétention placentaire. Selon Leblanc (2010), une acétonémie subclinique durant les deux premières semaines de lactation augmente de 3 fois les risques de métrite, augmente la probabilité d'endométrite subclinique à 4 semaines post-partum et augmente la durée et la sévérité des mammites, mais pas l'incidence des mammites. Grinberg et al. (2008) ont remarqué que le BHB abolit la formation des Neutrophil Extracellular Traps (NETs) et leur activité bactéricide. Les NETs sont des structures extracellulaires produites par les PMN après leur activation et sont composés de fibres de chromatines décondensées associées à différentes protéines (Brinkmann et al., 2004). Ces NETs permettent de désactiver et de tuer les bactéries. Ils ont observé une corrélation négative entre la concentration en BHB et la formation des NETs

et leur activité bactéricide. Chez un animal en hypercétonémie, les concentrations sanguines en BHB sont comparables aux concentrations pour lesquelles la formation de NETs a été inhibée de manière *in vitro*. Plusieurs autres études ont supplémenté du sang en BHB de manière *in vitro* et ont montré qu'outre la formation des NETs, la capacité chimiotactique et la flambée oxydative des PMN bovins sont diminuées (Hoeben et al., 1997; Hoeben et al., 2000; Suriyasathaporn et al., 2000). Ster et al. (2012) ont étudié l'effet de sérums pris aux jours 2, 5 et 61 post-vêlage sur les fonctions du système immunitaire telles que la lymphoprolifération, la phagocytose, la flambée oxydative et la production d'INF- $\gamma$  de manière *in vitro*. Ils ont relevé que la lymphoprolifération des sérums prélevés en période périnatal était corrélée négativement à la concentration sanguine en BHB. Ils ont donc réalisé une analyse de l'effet de dose des BHB sur la lymphoprolifération et la production d'INF- $\gamma$  en ajoutant des concentrations croissantes de BHB au milieu de culture. La lymphoprolifération était affectée uniquement avec la plus forte dose de BHB. De plus, la production d'INF- $\gamma$  a tendance à diminuer quand la concentration en BHB dans le milieu augmente. Cependant, le BHB a été ajouté au milieu sous forme de sel de sodium. Les contrôles négatifs contenant du sodium à des concentrations similaires à celles du BHB ont montré une tendance similaire à celle du BHB suggérant que l'effet attribué au BHB est en réalité plutôt dû aux ions sodium. Le fait que les sérums ayant une forte concentration sanguine en BHB aient eu un impact négatif sur lymphoprolifération pourrait expliquer l'augmentation de la sensibilité des vaches aux infections en début de lactation. En effet, bon nombre de vaches en début de lactation sont en acétonémie, maladie métabolique qui est la conséquence d'une concentration élevée en BHB.

Plusieurs études mettent en évidence l'effet négatif des AGNE sur le système immunitaire. Le mécanisme d'action reste cependant encore inconnu. Kehrl et al. (1989) ont mis en évidence que la lymphoprolifération diminuait après la parturition en comparaison à 2 à 3 semaines avant la parturition. Dans les travaux de Ster et al. (2012) visant à étudier l'effet de sérums pris aux jours 2, 5 et 61 post-vêlage sur les fonctions du système immunitaire, une diminution de la lymphoprolifération et de la production d'INF- $\gamma$  juste après le vêlage a pu être mise en évidence. Afin d'attester que cet effet était réellement attribuable à la concentration en AGNE et en BHB, les échantillons de sérum du jour 61 ont été supplémentés soit en AGNE soit en BHB pour

atteindre les concentrations trouvées dans les sérums du jour 5. L'ajout de BHB n'a pas affecté la prolifération alors que l'ajout d'AGNE a fait diminuer la lymphoprolifération. Un essai dose-réponse a été réalisé sur la lymphoprolifération en utilisant des concentrations croissantes, mais physiologiques en BHB et en AGNE. Cela a permis de démontrer une relation négative entre la concentration d'AGNE et le taux de lymphoprolifération (Figure 7). Cette étude a également mis en évidence que les insuffisances fonctionnelles du système immunitaire étaient certainement attribuables à la composition des sérums et non pas aux PBMC (cellules mononuclées du sang périphérique de l'anglais "peripheral blood mononuclear cell») eux-mêmes. Lacetera et al. (2004) ont établi qu'une haute concentration en AGNE (1,0 mM) supprime la synthèse d'ADN, la sécrétion d'IgM, et la production d'INF- $\gamma$  en comparaison à des concentrations faibles en AGNE (0,0625 et 0,125 mM). Une forte concentration en AGNE a aussi été associée à une déficience des fonctions des PMN (Hammon et al., 2006). En effet, la présence de fortes concentrations en AGNE et en BHB diminue la réponse de flambée oxydative et la capacité phagocytaire des PMN *in vitro*.



**Figure 7: Relation d'effet de la concentration en AGNE sur la prolifération des PBMC stimulées à la concanavalin A (Ster et al., 2012).**

Les lettres sont différentes pour les différences significatives ( $P < 0.001$ ).

Les résultats de ces différentes études semblent indiquer que l'augmentation en AGNE dans le sang altère les fonctions des PBMC et des PMN. Néanmoins, les mécanismes biologiques impliqués ne sont pas encore connus. Les AGNE joueraient également un rôle dans la régulation de certaines voies de signalisation, notamment au niveau des récepteurs activés par les proliférateurs de peroxyosomes (PPARs). Ces derniers sont des facteurs de transcription activés par un ligand, dont font partie les AGNE, jouant un rôle critique dans différentes voies biologiques telles que le métabolisme des lipides, des protéines, du glycérol, de l'urée, du glycogène, mais aussi dans l'adipogenèse, la différenciation et la migration cellulaire, les voies de signalisation à l'insuline et même dans la réponse immunitaire (Bionaz et al., 2013; Mandard and Patsouris, 2013). Chez la souris, il a été montré qu'une délétion de PPAR  $\beta/\delta$  est associée à l'augmentation de l'expression des gènes impliqués dans différents mécanismes reliés à l'immunité innée et à l'inflammation tels que la cytotoxicité reliée aux cellules NK (natural killer), la présentation d'antigène, et la voie de signalisation des récepteurs de type Toll (Sanderson et al., 2010). Chez ces souris, l'expression de ces gènes était significativement plus forte, montrant une activation du facteur nucléaire NF- $\kappa$ B ainsi qu'une augmentation des marqueurs de l'expression génique des cellules de Kupffer (Sanderson et al., 2010). Ainsi les PPARs activés sembleraient inhiber l'activité de NF- $\kappa$ B, un facteur de transcription crucial dans l'initiation de la réponse inflammatoire. Les PPARs joueraient également un rôle dans la réponse de phase aiguë (APR). L'APR est une série de réactions initiées en réponse à une infection, une inflammation, un traumatisme, une brûlure, une nécrose ischémique ou encore une tumeur maligne. Il existe un lien entre l'APR et les PPARs, car, en réponse à une exposition aux LPS bactériens, on observe une réduction de l'expression des PPARs dans différents tissus tels que le foie, le cœur et les reins. Les PPARs pourraient donc jouer un rôle dans la réponse anti-inflammatoire.

Les récepteurs à acides gras (FFAR pour free fatty acid receptor) sont des récepteurs pour les acides gras et leur permettent ainsi d'agir en tant que molécules de signalisation (Friedrichs et al., 2014). Les FFAR, précédemment appelés GPR pour G protein receptor, sont des récepteurs couplés à la protéine G qui sont largement exprimés. Ils existent sous 4 formes, chacune codée par un gène différent : FFAR1, FFAR2, FFAR3 et FFAR4 (Covington et al., 2006). Leurs



présences dans des types cellulaires importants pour le métabolisme et la santé immunitaire font de ces derniers le lien entre l'homéostasie énergétique et le contrôle de la réponse inflammatoire (Alvarez-Curto and Milligan, 2016). Par exemple, l'expression de la GPR84 (Protéine G couplée au Récepteur 84) est augmentée en présence de LPS dans les macrophages où il semble contrôler la sécrétion de la cytokine pro-inflammatoire Interleukine-12 (IL-12). Le gène FFAR4 semble également jouer un rôle anti-inflammatoire en inhibant la sécrétion des cytokines inflammatoires, comme le facteur de nécrose tumorale  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) et l'interleukine-6 (IL-6) induits par les LPS.

Les deux voies évoquées ci-dessus ne sont que des exemples parmi d'autres possibilités. Les AGNE sembleraient donc jouer un rôle dans le contrôle de la régulation de l'expression de gènes associés à certaines voies de signalisation impliquées dans la régulation du système immunitaire, ce qui pourrait expliquer leur impact dans l'immunodépression post-partum observée chez la vache laitière.

Au regard des résultats présentés ci-dessus et obtenus à partir d'études analysant différents aspects du système immunitaire, il semble clair que l'immunosuppression est reliée à la balance énergétique négative. Il apparaît plus précisément que l'augmentation de la concentration sanguine en AGNE résultant de la balance énergétique négative serait responsable, du moins en partie, de l'immunosuppression péripartum. Cependant, leurs mécanismes d'action restent encore inconnus.

## **1.5 Rééquilibrer la balance énergétique pour réduire l'immunodépression**

Il apparaît que la balance énergétique négative et les réponses métaboliques qu'elle entraîne sont à l'origine, du moins en partie, de l'immunodépression en début de lactation. Une amélioration de la balance énergétique pourrait donc améliorer le statut immunitaire des vaches et ainsi diminuer l'incidence des problèmes de santé en début de lactation.

Une des premières approches pour rééquilibrer la balance énergétique en début de lactation est de fournir une alimentation plus riche en énergie. Au tarissement, période de repos dans un cycle

de lactation, les vaches sont nourries avec une ration riche en fourrage qui est énergétiquement moins dense et à plus haute teneur en fibres que la ration de lactation. Ceci permet d'éviter un engraissement excessif de la vache, mais modifie de façon importante les populations microbiennes du rumen. Au moment du vêlage, un apport plus élevé en amidon est amené afin d'augmenter l'apport d'énergie utilisable par la vache. Cependant, ce changement d'alimentation peut entraîner une acidose du rumen suivie d'une acidose métabolique. En effet, l'augmentation de la teneur en amidon entraîne une hausse rapide de la population de bactéries transformant l'amidon en lactate alors que la population de bactéries transformant le lactate en acétate (utilisable par la vache) croît de manière plus lente. Dès lors, le lactate s'accumule dans le rumen. Son acidité étant 10 fois supérieure à celle du propionate, de l'acétate et du butyrate, il a un effet plus marqué sur l'acidité du rumen (Goff and Horst, 1997). L'équilibre bactérien du rumen est très fragile et tout changement d'alimentation doit se faire de manière progressive. En conséquence, bien que l'augmentation rapide de l'apport d'amidon apparaît être une solution, il provoque le déséquilibre entre les différentes bactéries du rumen et n'est donc pas recommandé dans le régime post-partum. En raison de sa haute densité énergétique, le gras serait un ingrédient logique pour augmenter la densité énergétique de l'alimentation dans la période de transition. Néanmoins, l'apport supplémentaire d'acides gras amplifie le déséquilibre entre les métabolites glyco-géniques et céto-géniques et, par conséquent, n'est pas recommandé dans le régime post-partum. Même si une bonne gestion nutritionnelle est essentielle, il est peu probable qu'elle soit en mesure, à elle seule, de réduire l'incidence des maladies péripartum à un niveau acceptable à court ou à long terme. En outre, les avantages apportés doivent être suffisants pour contrebalancer l'augmentation des coûts d'alimentation associés.

Une seconde approche pour rééquilibrer la balance énergétique est de diminuer la demande énergétique en début de lactation. En effet, limiter la production de lait en début de lactation permettrait de diminuer la demande énergétique et d'avoir un effet favorable sur l'immunodépression observée. Andersen et al. (2004), Patton et al. (2006) ainsi que Loisel et al. (2009), entre autres, ont étudié l'impact de la fréquence de traite sur la production laitière et subséquemment sur le métabolisme et le système immunitaire. Ils ont constaté que diminuer la fréquence de traite est efficace pour diminuer la production laitière et que cela permet

d'améliorer la balance énergétique négative. Phyn et al. (2014) ont également étudié l'effet de la fréquence de traite sur le stress métabolique subit chez des vaches laitières au pâturage en période de péripartum. Les résultats de cette étude ont montré que les vaches traites à une fréquence moins élevée ont produit moins de lait et ce, d'autant plus que la période d'application était longue. Augmenter la fréquence de traite a permis d'augmenter la production laitière en comparaison. Cependant, dans le cas d'une augmentation de fréquence de traite, aucun effet de la durée de l'application n'a été observé, ce qui démontre qu'une plus longue période d'augmentation de la fréquence de traite ne permet pas d'augmenter la production laitière. Tous ces résultats indiquent que baisser la fréquence de traite en période péripartum améliore le statut énergétique des vaches laitières périparturientes, tandis qu'augmenter la fréquence de traite induit une balance énergétique négative plus sévère. Dans le même ordre d'idée, O'Driscoll et al. (2012), ont mené une étude visant à évaluer l'effet de la fréquence de traite et de la disponibilité alimentaire sur le stress métabolique et les fonctions du système immunitaire de vaches en période péripartum. Ils ont comparé des fréquences de traites d'une ou deux fois par jour combinées à une disponibilité alimentaire faible ou élevée. Comme précédemment, les vaches traites à une fréquence plus élevée ont produit plus de lait et les vaches ayant une disponibilité alimentaire élevée également. Les vaches à fréquence de traite faible avaient tendance à avoir un pourcentage en neutrophile dans le sang plus faible et avaient un pourcentage en lymphocytes plus élevé que les vaches à fréquence de traite élevée, mais avaient un pourcentage en monocytes plus faible. Les PBMC des vaches à fréquence de traite élevée avaient un taux de production d'INF- $\gamma$  plus faible après stimulation à la Con-A quand la disponibilité alimentaire était élevée en comparaison à celles ayant une disponibilité alimentaire faible. La diminution de la fréquence de traite ainsi que la traite partielle ont réduit la production de lait menant à une mobilisation moindre des réserves corporelles en comparaison des vaches traites plus fréquemment. De plus, la combinaison d'un plan nutritionnel élevé et d'une traite de 2 fois par jour amène la vache à produire plus de lait en comparaison des autres traitements. Ces vaches ont subi un stress métabolique plus grand que les animaux des autres combinaisons de traitement.

Outre la fréquence de traite, Carbonneau et al. (2012) ont utilisé la traite incomplète dans le but de réduire la production de lait. Comme pour les expériences précédentes, les perturbations métaboliques ont été nettement moins marquées chez les vaches dont la production laitière post-partum a été limitée. Ainsi, les teneurs en BHB indiquent que 60 % des vaches témoins et 12 % des vaches traitées partiellement ont souffert d'acétonémie subclinique. Au regard de ces résultats, l'hypothèse de départ est vérifiée, la diminution temporaire de la production laitière diminue le déséquilibre métabolique et améliore l'état immunitaire des vaches. Bien que ces résultats soient probants, ce genre de technique est difficilement applicable dans les grands élevages, particulièrement pour les élevages où les vaches sont élevées en stabulation libre. Un autre inconvénient est que jusqu'alors les techniques employées pour diminuer la production laitière en début de lactation provoquent une diminution de production à long terme et ont un impact sur le reste de la lactation. Il semble donc intéressant d'explorer d'autres pistes.

Les vitamines B jouent un rôle important dans de nombreuses fonctions métaboliques différentes en tant que coenzymes ou cofacteurs lors de réactions biochimiques et, à ce titre, sont essentielles au fonctionnement normal de principales voies métaboliques. Très tôt dans le processus de leur découverte, les besoins en vitamine B chez les humains et les animaux ont été évalués par rapport à la quantité de vitamine suffisante pour prévenir l'apparition de symptômes de carence (Girard et Graulet, 2021). Différentes études (Girard and Matte, 2005; Preynat et al., 2010) ont été menées pour évaluer l'impact des suppléments d'acide folique et de vitamine B12 en début de lactation sur le métabolisme, puisque ces deux composants jouent un rôle dans le métabolisme énergétique et protéique. En effet, la vitamine B12 est une coenzyme impliquée dans 2 voies métaboliques essentielles. Tout d'abord, elle permet l'isomérisation par la méthyl Malonyl CoA du méthylmalonyl-CoA en succinyl-CoA qui va ensuite pouvoir entrer dans le cycle de Krebs (figure 8). Deuxièmement, la vitamine B12 permet le transfert d'un groupe méthyl au 5-méthyltétrahydrofolate qui est la forme méthylée de l'acide folique. Ceci conduit à la formation d'homocystéine qui peut ensuite former de la méthionine qui sera utilisée pour soutenir la production de protéines. La méthionine est également l'un des acides aminés limitant la production de lait (Duplessis et al., 2017). Graulet et al. (2007) ont constaté que la supplémentation en acide folique et en vitamine B12 augmentait la glycémie et diminuait les

lipides hépatiques en début de lactation, ce qui suggère un meilleur équilibre énergétique. Dès lors, une stratégie utilisant un supplément d'acide folique et de vitamine B12 en période de balance énergétique négative pourrait être envisagée afin de réduire la mobilisation des AGNE et de ce fait, diminuer leur impact négatif sur le système immunitaire des vaches laitières.

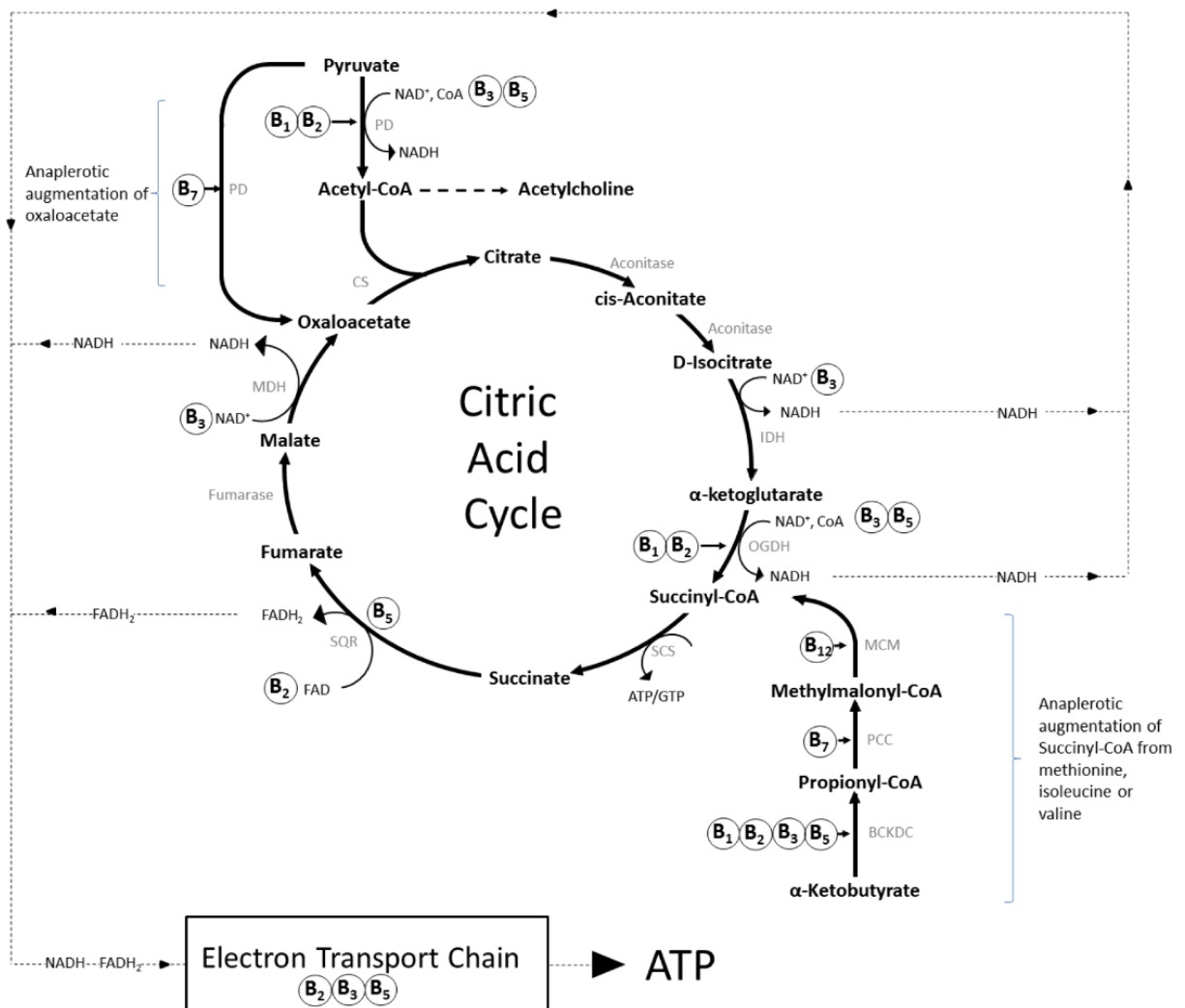


Figure 8 : Le rôle des vitamines B dans la production d'énergie mitochondriale (Kennedy, 2016).

## **1.6 Objectifs et hypothèses**

### **1.6.1 Hypothèses générales**

La première hypothèse générale de cette thèse est que l'accumulation d'AGNE dans la circulation sanguine lorsque la vache se trouve en balance énergétique négative jouerait un rôle clé dans l'immunodépression péripartum et augmenterait l'incidence des maladies durant cette période. La deuxième est qu'il serait possible de développer des stratégies permettant de réduire l'accumulation d'AGNE sanguin et/ou d'en réduire l'impact sur le système immunitaire.

### **1.6.2 Objectifs généraux**

L'objectif général de cette thèse est de mieux comprendre comment l'augmentation de la concentration sanguine en AGNE affecte le système immunitaire afin de pouvoir développer une stratégie permettant d'améliorer le statut immunitaire des vaches laitières pendant la période péripartum.

### **1.6.3 Objectifs spécifiques**

**Objectif 1 :** Évaluer si l'administration par injection intramusculaire d'acide folique et de vitamine B12 permet d'améliorer la balance énergétique chez des vaches soumises à une restriction alimentaire. Ensuite, déterminer si cette stratégie permet d'améliorer certaines fonctions du système immunitaire (Chapitre 2).

**Objectif 2 :** Mesurer l'effet de plusieurs acides gras sur les fonctions des cellules immunitaires bovines et identifier ceux ayant le plus fort impact, tant négatif que positif (Chapitre 3).

**Objectif 3 :** Déterminer l'impact des AGNE sur les fonctions immunitaires et le métabolisme à l'aide d'un modèle expérimental qui n'est pas en situation de balance énergétique négative (Chapitre 4).

## CHAPITRE 2

### EFFECTS OF FEED RESTRICTION AND SUPPLEMENTARY FOLIC ACID AND VITAMIN B12 ON IMMUNE CELL FUNCTIONS AND BLOOD CELL POPULATIONS IN DAIRY COWS

#### 2.1 Originalité du travail par rapport à la science

Plusieurs stratégies afin d'améliorer la balance énergétique en début de lactation ont été testées. Cependant chacune comporte ses inconvénients. Par exemple, la traite partielle est compliquée à mettre en place surtout pour les fermes ayant un robot de traite, les stratégies visant à augmenter l'apport énergétique sont, quant à elles, à risque pour l'équilibre bactérien du rumen. Il est donc important de tenter de développer d'autres stratégies. L'équipe du Dre Christiane Girard s'est intéressée à l'effet d'un supplément d'acide folique et de vitamine B12 sur le métabolisme énergétique. Ils ont montré que cela a permis d'augmenter la glycémie et de diminuer les lipides hépatiques en début de lactation, ce qui suggère un meilleur équilibre énergétique. Cependant, l'effet de ces suppléments sur le système immunitaire de vaches en balance énergétique négative n'a jamais été évalué. L'objectif de cette étude était donc de tester si l'administration par injection intramusculaire d'acide folique et de vitamine B12 permet d'améliorer la balance énergétique chez des vaches soumises à une restriction alimentaire et par le fait même, permet d'améliorer certaines fonctions du système immunitaire.

#### 2.2 Contribution de l'auteure

Ce projet a été réalisé en collaboration avec l'équipe de la Dre Christiane Girard. Un article parallèle a d'ailleurs été publié : *Girard, C. L., Vanacker, N., Beaudet, V., Duplessis, M., & Lacasse, P. 2019. Glucose and insulin responses to an intravenous glucose tolerance test administered to feed-restricted dairy cows receiving folic acid and vitamin B12 supplements. Journal of dairy science, 102(7), 6226–6234. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16298>.*

Concernant l'article ci-après, j'ai aidé à la formation de la technicienne dans la planification et la réalisation de la phase animale. De ce fait, j'ai activement participé à la mise en place de la phase expérimentale qui s'est déroulée au Centre de Recherche et de développement de Sherbrooke. On a travaillé en collaboration pour la planification et la coordination de chacune de nos parties. Par la suite, j'ai effectué toutes les analyses de laboratoire concernant le volet immunologique, dont deux techniques que j'ai mis au point durant ma maîtrise (la mesure de la flambée oxydative et de la phagocytose), et la mesure de la lymphoprolifération. J'ai également fait le dosage des concentrations sanguines en AGNE et BHB correspondant au jour où les mesures immunologiques ont été prises. Enfin, j'ai analysé les données de production laitière. L'équipe du Dr Girard, notamment Valérie Beaudet, s'est occupée de l'analyse des échantillons sanguins concernant le volet métabolique incluant le dosage des AGNE, BHB, de la vitamine B12, du glucose, de l'insuline, de l'urée, du folate, des acides aminés et de l'acide méthylmalonique. Les données d'alimentation ont également été analysées par l'équipe de la Dre Girard. J'ai réalisé la compilation et l'analyses des données de ma partie. Enfin, j'ai écrit l'article dont je suis la première auteure sous la supervision du Dr Pierre Lacasse et j'ai également participé à la révision de l'article rédigé par l'équipe de la Dre Girard.

### **2.3 Référence de l'article**

Vanacker, N., Girard, C. L., Blouin, R., & Lacasse, P. (2020). Effects of feed restriction and supplementary folic acid and vitamin B12 on immune cell functions and blood cell populations in dairy cows. *Animal: an international journal of animal bioscience*, 14(2), 339–345.

<https://doi.org/10.1017/S1751731119002301>



## 2.4 Manuscrit de l'article

### IMMUNITY AND ENERGY BALANCE

#### **Effects of feed restriction and supplementary folic acid and vitamin B<sub>12</sub> on immune cell functions and blood cell populations in dairy cows**

N. Vanacker,\*† C. L. Girard,\* R. Blouin,† and P. Lacasse\*<sup>1</sup>

\*Sherbrooke Research and Development Centre, Agriculture and Agri-Food Canada, Sherbrooke, Quebec, Canada J1M 0C8

†Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC, Canada J1K 2R1

<sup>1</sup>Corresponding author: Pierre Lacasse. [Pierre.Lacasse@canada.ca](mailto:Pierre.Lacasse@canada.ca)

### 2.4.1. Abstract

Cows undergoing a negative energy balance often experience a state of immunosuppression and are at greater risk of infectious diseases. The present study aimed to evaluate the impact of a folic acid and vitamin B<sub>12</sub> supplement and feed restriction on several immune parameters. Sixteen cows at 45 ± 3 d in milk were assigned to 8 blocks of 2 cows each according to each cow's milk production in the previous week, and within each block, the cows randomly received weekly intramuscular injections of either saline or 320 mg of folic acid and 10 mg of vitamin B<sub>12</sub> for 5 wk. During wk 5, the cows were fed 75% of their ad libitum intake for 4 d. Blood samples were taken before the beginning of the experiment, just before feed restriction, and after 3 d of feed restriction, in order to evaluate blood cell populations, the phagocytosis capacity and oxidative burst of polymorphonuclear leukocytes (PMN), the proliferation of peripheral blood mononuclear cells (PBMC), and concentrations of non-esterified fatty acids (NEFA) and β-hydroxybutyrate (BHB). The vitamin supplement did not affect any of the tested variables except milk fat and lactose content. Feed restriction reduced milk production and increased the concentration of non-esterified fatty acids. Feed restriction did not affect blood cell populations but did reduce the percentage of PMN positive for oxidative burst after stimulation with phorbol 12-myristate 13-acetate. The proliferation of PBMC was reduced when the cell culture medium was supplemented with sera collected during the feed restriction. In conclusion, feed restriction affected the functions of PMN and PBMC, and this effect was not prevented by the folic acid and vitamin B<sub>12</sub> supplement. These results support the hypothesis that the greater risk of infectious diseases in cows experiencing a negative energy balance is related to impaired immune cell functions by high circulating concentration of NEFA.

**Key words:** negative energy balance, immunosuppression, blood metabolites

### 2.4.2. Implications

**Effects of feed restriction and supplementary folic acid and vitamin B<sub>12</sub> on immune cell functions and blood cell populations in dairy cows.** *By Vanacker et al.* Cows undergoing a negative energy balance often experience a state of immunosuppression and are at greater risk of infectious diseases. In the present experiment, we tested the hypothesis that a folic acid and vitamin B<sub>12</sub> supplement decreases the metabolic and immunological disturbances induced by feed restriction. The results confirm that a negative energy balance induced by feed restriction impairs immune cell functions. Vitamin supplementation did not prevent metabolic and immunological disturbances.

### 2.4.3. Introduction

The periparturient period is challenging for high-yielding dairy cows. Cows undergo hormonal, metabolic, physiological, nutritional, and immunological changes during that period. According to Leblanc et al. (2006), about 75% of diseases happen in the first month after calving. Most of the metabolic diseases, such as milk fever, ketosis, retained placenta, and displacement of placenta, and infectious diseases such as mastitis, Johne's disease, and metritis occur within the first 2 wk of lactation (Goff and Horst, 1997).

During the transition period, the energy required for milk production exceeds the energy provided by the diet, resulting in a negative energy balance (**NEB**). Body reserves are mobilized to supply additional nutrients, leading to an increase in blood concentrations of non-esterified fatty acids (**NEFA**) and  $\beta$ -hydroxybutyrate (**BHB**) and a decrease in glucose. This period is also associated with an immunodepression. Several studies (Kehrli, Jr., et al., 1989; Moreira da Silva et al., 1998; Hoeben et al., 2000) have shown that polymorphonuclear leukocytes (**PMN**) phagocytosis and oxidative burst activity are impaired during the transition period in dairy cows and that the responsiveness of blood lymphocytes when stimulated with mitogenic agents is also decreased, as is the production of immunoglobulin by B cells (Nonnecke et al., 2003; Lacetera

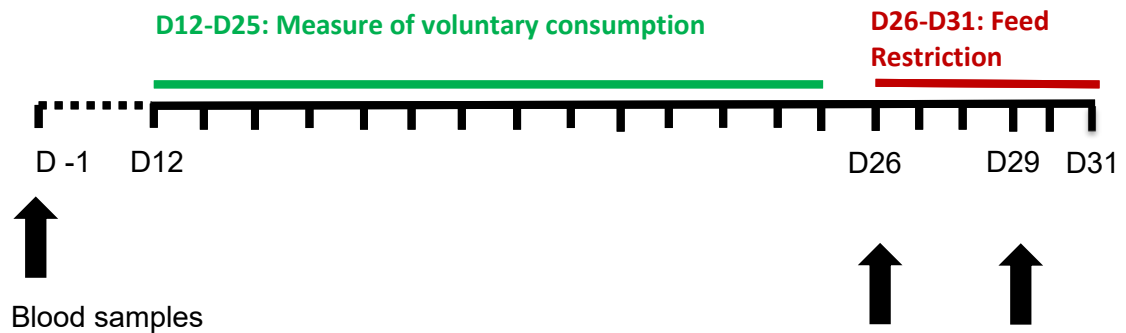
et al., 2005). Nonnecke et al. (2003) reported that the peripartum reduction in the functional capacities of blood lymphocytes was abolished by mastectomy, which suggests that a NEB is causing the periparturient immunodepression. Ster et al. (2012) showed that lymphocyte proliferation and interferon- $\gamma$  secretion were lower when lymphocytes were incubated with sera harvested in the postpartum period and that this was due to high NEFA concentrations. Therefore, strategies that prevent the increase in NEFA in a period of NEB may have a positive impact on immunity.

A combined supplement of folic acid and vitamin B<sub>12</sub> has been reported to change energy partitioning during early lactation. Vitamin B<sub>12</sub> is a coenzyme involved in two essential metabolic pathways. First, it allows isomerization by methyl malonyl CoA of methylmalonyl-CoA into succinyl-CoA which will then be able to enter the Krebs cycle. Secondly, vitamin B<sub>12</sub> allows the transfer of a methyl group to 5-methyltetrahydrofolate, which is the methylated form of folic acid. This leads to the formation of homocysteine which can then form methionine that could be used to support the production of proteins (Scott, 1999). Methionine is also one of the amino acids limiting milk production (Duplessis et al., 2017). As a consequence, the vitamin supplement increased milk production, plasma glucose and decreased hepatic lipids (Graulet et al., 2007). Preynat et al. (2009) found that vitamin supplementation increased the whole-body rate of appearance of glucose and Duplessis et al. (2014) observed a reduction in BW losses without a decrease in milk yield. Those results taken together suggests a better energy balance. Accordingly, folic acid supplementation tend to reduced (Graulet et al., 2007) or reduced (Duplessis et al., 2017) postpartum NEFA concentration. Therefore, the present study aimed to evaluate the impact of a folic acid and vitamin B<sub>12</sub> supplement and feed restriction on blood cell populations, on the phagocytosis capacity and oxidative burst of PMN and proliferation of peripheral blood mononuclear cell (**PBMC**). In order to discriminate between the effects of energy balance with those related to calving itself (hormonal changes, calving stress, variation in calcium concentration and dystocia) the experiment was carried out in early lactation cows where NEB was induced by feed restriction.

## **2.4.4. Materials and methods**

### ***2.4.4.1. Animals and Experimental Procedures***

The study was conducted in accordance with the guidelines of the Canadian Council on Animal Care (1993). Sixteen multiparous Holstein cows at  $45 \pm 3$  DIM were housed at Agriculture and Agri-Food Canada's Sherbrooke Research and Development Centre (Sherbrooke, QC, Canada). The cows were assigned to 8 blocks of 2 cows each according to the cows' milk production during the previous week,  $45 \pm 6$  kg/d. Within each block, the cows randomly received weekly intramuscular injections of either 5 mL of saline (0.9% NaCl; control) or 320 mg of folic acid (pteroylmonoglutamic acid; MP Biomedicals, Solon, OH) and 10 mg of vitamin B<sub>12</sub> (cyanocobalamin, 5,000 µg/mL; Vétoquinol, Lavaltrie, QC, Canada) for 5 consecutive weeks. A total mixed ration providing 15.9% CP, 18.3% ADF, 29.1% NDF, 31.1% starch, and 6.53 MJ/Kg of NE<sub>L</sub> was served once daily, at 0800 h. The ingredients were corn and grass silages, chopped grass hay, finely ground corn grain, soybean meal, distillers grain (corn), corn gluten meal, canola meal, micronized soybean, beet pulp, and mineral premix calculated to meet the requirements of the National Research Council (2001). During the first 4 wk of the experiment (treatment period), daily intake and orts for each cow were weighed, and the feed offered was adjusted if needed, allowing 10% refusals (figure 9). The cows had free access to water. In wk 5, the cows were fed 75% of their ad libitum intake of the previous week for 4 d (feed restriction period).



**Figure 9: Flow diagram of the experimental design**

#### ***2.4.4.2. Milk Yield and Composition***

The cows were milked twice a day, between 0700 and 0800 h and between 1900 and 2000 h. Milk production was recorded at each milking throughout the experiment. Milk composition (lactose, protein, fat, and SCC) was evaluated by a commercial laboratory (Valacta Inc., Sainte-Anne-de-Bellevue, QC, Canada) using mid-infrared reflectance spectrometry with Foss MilkoScan FT 6000 (Foss Electric A/S, Hillerød, Denmark) on samples collected at milking on d 29 and 30.

#### ***2.4.4.3. Blood Collection***

Blood samples were collected from the coccygeal vein at 1330 h on the day before the experiment began (d -1) (i.e., before the cows received the experimental diet and the vitamin supplement), at the end of the treatment period (d 26), and after 3 d of feed restriction (d 29) in uncoated, heparin-coated, and EDTA-coated Vacutainer tubes (Becton, Dickinson and Co., Mississauga, ON, Canada; figure 9). The tubes without additives were left at room temperature

for approximately 2 h to allow clotting before centrifugation at  $1,900 \times g$  for 15 min at  $4^{\circ}\text{C}$ . Then, the serum was stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until PBMC proliferation assays were performed. The heparin-coated tubes were kept at room temperature until PMN phagocytosis and oxidative burst assays were performed (within 2 h after blood collection). The EDTA-coated Vacutainer tubes were sent to the laboratory at the Complexe de diagnostic et d'épidémiologie vétérinaires du Québec (Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, QC, Canada) for determination of complete blood count. The other blood tubes containing EDTA were placed on ice immediately after collection and centrifuged within 30 min at  $1,900 \times g$  for 15 min at  $4^{\circ}\text{C}$ . Then, the plasma was stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until determination of NEFA and BHB concentrations.

#### ***2.4.4.4. Blood Metabolite Assays***

Plasma BHB was evaluated with a BHB reagent kit (Pointe Scientific Inc., Canton, MI), and absorption was read at 505 nm using a SpectraMax 250 microplate reader (Molecular Devices, Sunnydale, CA). Plasma NEFA concentration was determined by an enzymatic colorimetric method using a Randox kit (Scientifiques ESBE, Saint-Laurent, QC, Canada). Briefly, 100  $\mu\text{L}$  of reagent R1 was added to 5  $\mu\text{L}$  of the plasma sample in a 96-well microplate, which was then incubated at  $37^{\circ}\text{C}$  for 5 min. Next, 200  $\mu\text{L}$  of reagent R2 was added, and the microplate was incubated at  $37^{\circ}\text{C}$  for an additional 5 min. Absorbance was read at 550 nm using a SpectraMax 250 microplate reader (Molecular Devices).

#### ***2.4.4.5. PMN Phagocytosis and Oxidative Burst Assays***

The phagocytosis assay was performed in whole blood by flow cytometry using BioParticles Conjugated for Phagocytosis (Life Technologies Inc., Burlington, ON, Canada), as described by Vanacker et al. (2017b). The oxidative burst assay was performed in whole blood by flow cytometry, as described by Vanacker et al. (2017b).

#### **2.4.4.6. PBMC Isolation**

To assess the effect of the serum from the treated cows on PBMC proliferation, PBMC were isolated from the jugular blood of 3 healthy lactating cows not included in the experiment. The blood was collected in blood collection bags containing citrate–phosphate–dextrose–adenine anticoagulant (Animal Blood Resources International, Dixon, CA, USA). Isolation of PBMC was performed as described by Vanacker et al. (2017b).

#### **2.4.4.7. PBMC Proliferation Assay**

The effect of serum collected from the treated cows on PBMC proliferation was measured. Three assays were performed in 96-well plates using isolated PBMC from 3 healthy cows, as described by Ollier et al. (2016). Briefly, the PBMC were labeled with 1  $\mu$ M carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester using the CellTrace CFSE Cell Proliferation Kit (Thermo Fisher Scientific, Burlington, ON, CA). To assess the effect of the serum from treated cows on PBMC proliferation, labeled PBMC suspended in RPMI 1640 supplemented with 7.5% sera sampled on d –1, 26, and 29 from each cow were incubated in a 96-well plate ( $1.5 \times 10^5$  cells per well) at 38.5°C with 5% CO<sub>2</sub> for 72 h. For each serum tested, the PBMC of 3 wells were incubated with the T cell mitogen concanavalin A (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, CA) at 1  $\mu$ g/mL, and the PBMC of 3 wells were incubated without the mitogen as a negative control. After a 72-h incubation, proliferation was analyzed using the FACSCanto II flow cytometer (BD Biosciences, Mississauga, ON, Canada). This assay was performed 3 times for each serum, with 1 assay per healthy cow from which the PBMC had been isolated. A control-positive serum obtained by mixing sera from 4 healthy cows in late lactation and another obtained by mixing sera from 3 freshly calved cows were included in each plate to determine inter-assay variation.



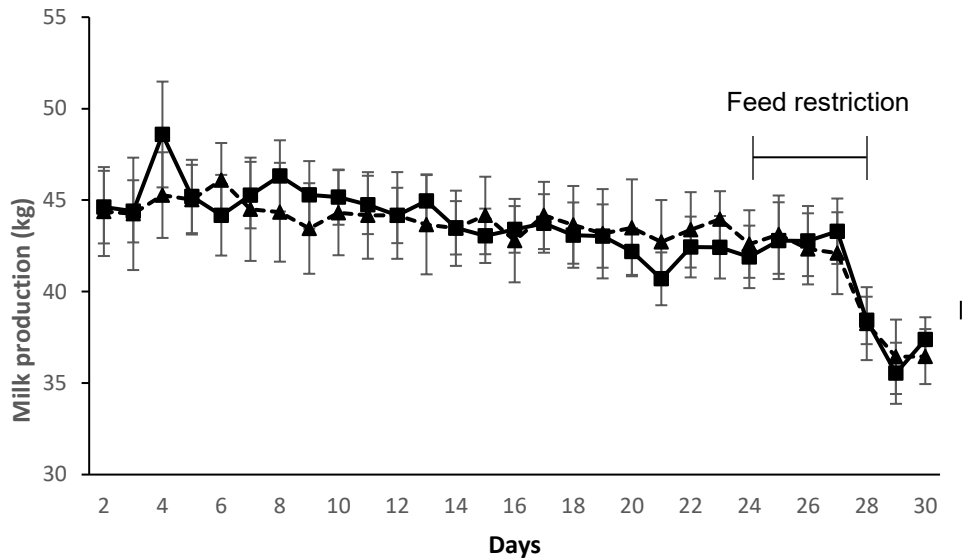
#### **2.4.4.8. Statistical Analysis**

Data were analyzed using the MIXED procedure of the SAS software package (SAS Institute Inc., Cary, NC). For milk production and DMI, data of the vitamin supplementation and the feed restriction periods were analyzed separately. Time (day) was used as a repeated effect, and cow was used as the subject. For metabolic and immunological parameters, Time (sampling period) was used as a repeated effect, and cow was used as the subject. The different sampling periods were compared using the Tukey–Kramer adjustment. For immunological parameters, data from d –1 were used as a covariable. The correlations between the blood concentration of metabolites and the percentages of phagocytic PMN, oxidative-burst-positive PMN, and proliferative PBMC were evaluated using the CORR procedure of SAS. Differences were considered statistically significant when  $P < 0.05$ .

#### **2.4.5. Results**

##### **2.4.5.1. Milk Production, Milk Composition, and DMI**

There was no effect of vitamin supplementation on milk production during the treatment period and the feed restriction period ( $P > 0.8$ ; Figure 10). Milk production decreased slightly throughout the treatment period ( $P < 0.01$ ). During feed restriction, milk production decreased abruptly ( $P < 0.01$ ). Milk from the cows receiving the vitamin supplement tended to have a lower concentration of fat ( $P = 0.06$ ) and had a greater concentration of lactose ( $P < 0.01$ ) than the milk from the control cows did during the restriction period (Table 2). Dry matter intake was not affected by vitamin supplementation or by time during the treatment period. On d 29, all the cows were in a NEB, averaging  $-19.8 \pm 1.26$  Mcal/d.



**Figure 10. Milk production of cows injected weekly with either saline (▲) or a mix of folic acid and vitamin B<sub>12</sub> (■).**

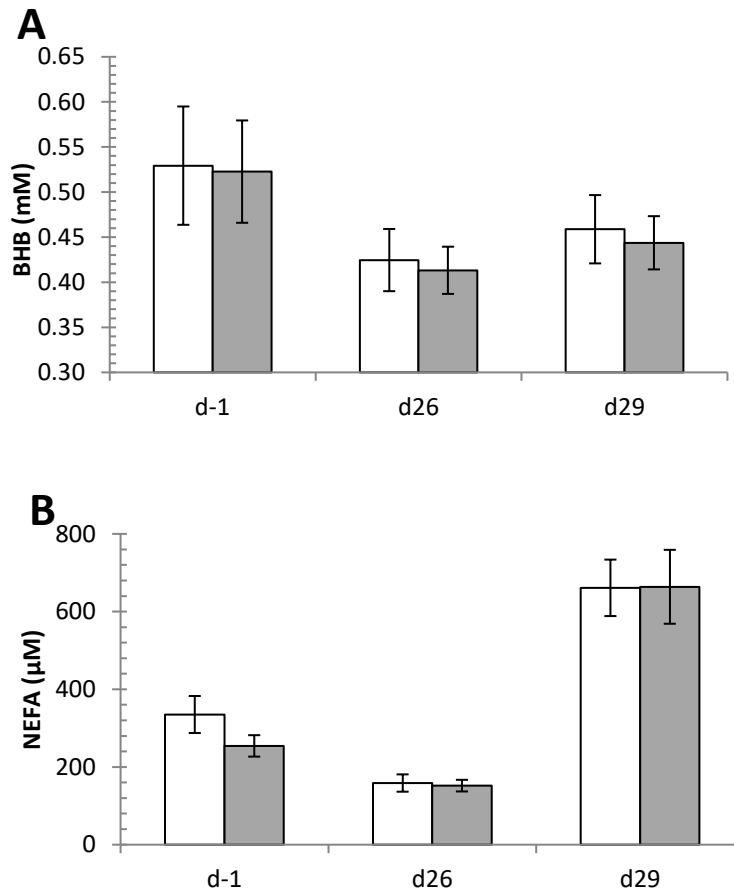
All cows were feed-restricted from d 27 to 30. Milk production was not affected by treatments but, was decreased by feed restriction ( $P < 0.01$ ).

**Table 2. Milk composition of samples collected at milking on d 29 and 30 from cows injected weekly with either saline (control, C) or a mix of folic acid and vitamin B<sub>12</sub> (V).**

Item	Treatments		SEM	P-value
	C	V		
Milk composition				
Fat, g/kg	43.2	39.6	1.20	0.06
Protein, g/kg	30.4	31.0	0.71	0.60
Lactose, g/kg	45.2	46.4	0.27	0.005
Total solids, g/kg	118.7	116.9	1.83	0.51
Milk yield				
Fat, kg/d	1.68	1.43	0.114	0.14
Protein, kg/d	1.14	1.13	0.054	0.84
Lactose, kg/d	1.69	1.70	0.073	0.92
Total solids, kg/d	4.52	4.26	0.228	0.43

#### ***2.4.5.2. Blood Metabolic Marker Concentrations***

Vitamin supplementation ( $P=0.8$ ) and feed restriction ( $P=0.16$ ) did not affect the blood concentration of BHB (Figure 11A). Blood BHB concentration tended to be higher at the beginning of the experiment (d -1) than at the end of the treatment period ( $P=0.06$ ). As it was the case for BHB, vitamin supplementation did not affect the blood concentration of NEFA ( $P>0.8$ ; Figure 11B). The concentration of NEFA was higher before the treatment period than at the end of it ( $P=0.04$ ). Blood NEFA concentration was greater during feed restriction than on d -1 and 26 ( $P<0.001$ ). Plasma concentration of glucose was analyzed and is presented in a companion paper (Girard et al., JDS 2019 In press). It was not affected by treatments, or feed restriction.



**Figure 11. Serum concentrations of BHB (A) and non-esterified fatty acids (NEFA) (B) in cows injected weekly with either saline (white bars) or a mix of folic acid and vitamin B<sub>12</sub> (gray bars), as measured before the experiment (d -1), just before feed restriction (d 26), and after 3 d of feed restriction (d 29).**

\*\*\*NEFA concentrations were greater on d 29 than on d -1 and d 26 ( $P < 0.001$ ).

#### **2.4.5.3. Immunological Parameters**

Leukocyte populations were not affected by vitamin supplementation (Table 3). However, we observed a time effect ( $P < 0.05$ ) for leukocyte, lymphocyte, and basophil concentrations and a trend ( $P < 0.1$ ) for eosinophil concentration. Leukocyte concentration was higher at the end of

the treatment period than on d -1 ( $P = 0.01$ ) or during feed restriction ( $P = 0.01$ ). Lymphocyte and basophil concentrations were lower before the treatment period than at the end of it ( $P < 0.05$ ). Nevertheless, all values were within the normal physiological ranges (Roland et al., 2014).

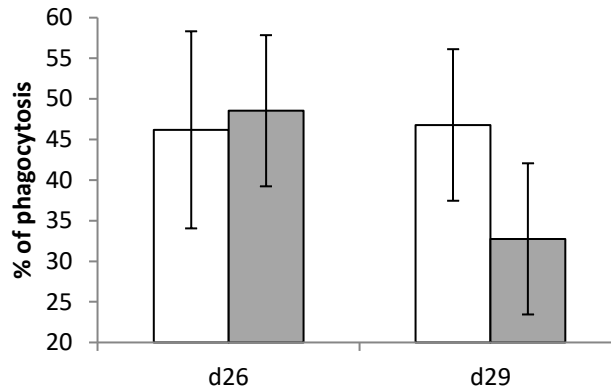
**Table 3. Concentrations of the leukocyte populations of cows injected weekly with either saline (control, C) or a mix of folic acid and vitamin B<sub>12</sub> (V), as measured before the experiment (d -1), just before feed restriction (d 26), and after 3 d of feed restriction (d 29).**

Cells ( $\times 10^9/L$ )	d -1		d 26		d 29		SEM	<i>P</i> -value			Normal Range
	C	V	C	V	C	V		T <sup>1</sup>	P <sup>2</sup>	T*P	
Leukocytes	6.6 7	7.4	7.63	8.23	6.45	7.7	0.49	0.117	0.0016	0.47	5–1.77
Neutrophils	2.5 3	3.03	2.6	2.27	1.91	2.54	0.38	0.44	0.23	0.20	1.5–5.2
Lymphocytes	3.6 5	3.72	4.23	5.17	3.98	4.41	0.47	0.31	0.014	0.39	1.9–6.4
Monocytes	0.3 0	0.33	0.38	0.31	0.28	0.26	0.069	0.76	0.44	0.69	0–0.6
Eosinophils	0.1 8	0.24	0.39	0.36	0.27	0.43	0.10	0.57	0.06	0.32	0–3.6
Basophils	0.0 5	0.03	0.06	0.11	0.04	0.06	0.017	0.22	0.03	0.22	0–0.2

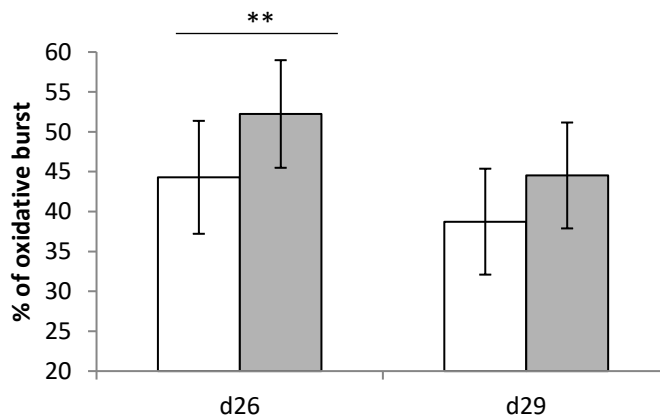
<sup>1</sup>Treatment.

<sup>2</sup>Period.

Vitamin supplementation and feed restriction did not affect the percentage of PMN positive for phagocytosis ( $P > 0.5$ ; Figure 12). The percentage of PMN that were positive for oxidative burst after stimulation with phorbol 12-myristate 13-acetate was not affected by vitamin supplementation ( $P = 0.4$ ) but was reduced by feed restriction ( $P = 0.03$ ; Figure 13). The proliferation of PBMC was lower when the cell culture medium was supplemented with sera collected during the feed restriction ( $P < 0.001$ ; Figure 14). Vitamin supplementation did not affect PBMC proliferation ( $P = 0.11$ ). There was a negative correlation between blood NEFA concentration and lymphocyte proliferation ( $r = -0.42$ ;  $P = 0.003$ ).

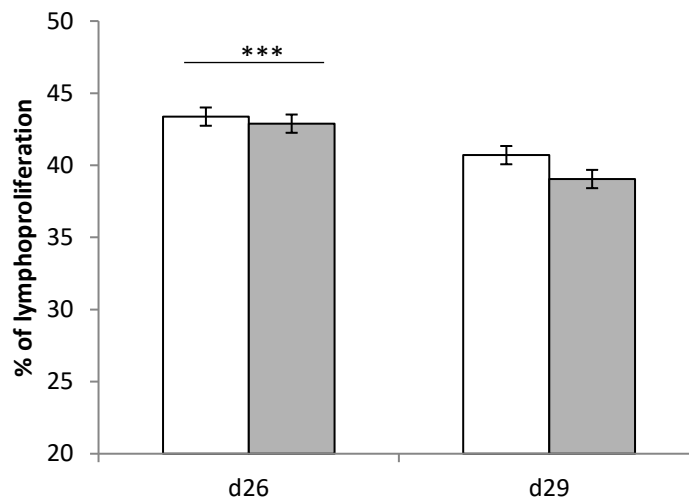


**Figure 12. Percentages of PMN positive for phagocytosis in cows injected weekly with either saline (white bars) or a mix of folic acid and vitamin B<sub>12</sub> (gray bars), as measured just before feed restriction (d 26) and after 3 d of feed restriction (d 29).**



**Figure 13. Percentages of PMN stimulated with phorbol 12-myristate 13-acetate that were positive for oxidative burst in cows injected weekly with either saline (white bars) or a mix of folic acid and vitamin B<sub>12</sub> (gray bars), as measured just before feed restriction (d 26) and after 3 d of feed restriction (d 29).**

\*\*The percentages of PMN that were positive for oxidative burst after stimulation with phorbol 12-myristate 13-acetate were reduced by the feed restriction ( $P = 0.03$ ).



**Figure 14. Percentages of proliferative peripheral blood mononuclear cells (PBMC) in cows injected weekly with either saline (white bars) or a mix of folic acid and vitamin B<sub>12</sub> (gray bars), as measured just before feed restriction (d 26) and after 3 d of feed restriction (d 29).**

\*\*\*The proliferation of PBMC was lower when the cell culture medium was supplemented with sera collected during the feed restriction (d 29) ( $P < 0.001$ ).

#### **2.4.6. Discussion**

Several studies (Kehrli, Jr., et al., 1989; Moreira da Silva et al., 1998; Hoeben et al., 2000; LeBlanc, 2010; Carbonneau et al., 2012; Esposito et al., 2014) have looked at the immune response during the transition period. Although a NEB is an important cause of suppression of the immune response during the transition period, it is difficult to isolate the effect of a NEB from those of the physiological and endocrine changes that occur. From a more practical point of view, conducting experiments to alleviate periparturient suppression are complicated by the fact that the exact calving time cannot be predicted and by the high incidence of health problems. In the present study, even though milk production decreased when the feed restriction was applied, all the cows were in a NEB, as indicated by the blood metabolite concentrations. Although all the cows were in a state of NEB, none of them became ill. The energy balance after

3 d of the feed restriction averaged  $-83.07$  Mcal/d, which is comparable to the energy balance found at the beginning of lactation in high-producing cows (McGuire et al., 2004). Therefore, the experimental design that was chosen to induce a state of energy balance similar to the one experienced by cows after parturition seems to be adequate.

Injections of folic acid and vitamin B<sub>12</sub> did not affect energy balance or plasma concentrations of NEFA and BHB. In previous experiments, similar vitamin supplements given during the peripartum period and in early lactation changed energy partitioning either by increasing milk production without increasing DMI and losses of BW or BCS (Graulet et al., 2007; Preynat et al., 2009; Gagnon et al., 2015) or by decreasing BW or BCS losses without affecting DMI and milk component yields (Duplessis et al., 2017). However, the effects of these supplements on plasma concentrations of NEFA and BHB differed among those studies. Moreover, in the present experiment, it cannot be ruled out that the duration of the NEB (4 d) was too short for an effect of the vitamin supplement on energy partitioning to be detected.

As expected, feed restriction resulted in a NEB and an increase in blood NEFA concentration. Blood BHB concentration was not increased by feed restriction. In previous studies, our research team observed that a NEB induced by feed restriction (Ollier et al., 2016) or by feeding only dry hay (Bernier-Dodier et al., 2011; Ollier et al., 2014) induce a sharp increase in blood NEFA but a limited increase in blood BHB. Therefore, the feed restriction period in the present was probably too short for an increase in BHB to be seen.

We observed a decrease in the ability of PBMC to proliferate after 3 d of feed restriction. Similarly, a decrease in lymphoproliferation was previously observed when PBMC were incubated with sera from early-postpartum or feed-restricted cows (Ster et al., 2012; Ollier et al., 2014, 2016). In all those studies, there was a negative correlation between blood NEFA concentration and PBMC proliferation, suggesting that circulating NEFA impair PBMC function. Ster et al. (2012) reported that serum harvested at 61 DIM but supplemented with enough NEFA to reach the level present in serum harvested at 5 DIM resulted in PBMC proliferation similar to that obtained with the latter serum. Consequently, the lack of effect of



vitamin injections on blood NEFA concentration in the present study likely explains their lack of effect on PBMC proliferation.

We observed a decrease in the ability of PMN to enter into oxidative burst after 3 d of feed restriction. This effect was not observed in previous studies (Moreira da Silva et al., 1998; Hoeben et al., 2000). Nevertheless, using a dose-effect assay, Ster et al. (2012) reported that concentrations of NEFA above 500  $\mu\text{M}$  were able to inhibit oxidative burst, which suggests that although PMN are less sensitive to NEFA than PBMC are, PMN may still be affected by a high NEFA level. In the assays carried out by Ster et al. (2012) and Carbonneau et al. (2012), tested serum was added to PMN from healthy cows at a low concentration, such that the final concentration was low owing to dilution. In the present study, PMN functions were evaluated in whole-blood assays where the dilution factor was much lower. This likely resulted in greater sensitivity for the assays. In addition, whole-blood assays would also detect if the immune cells themselves were affected by the treatments. Those results support the finding that a NEB affects PMN functions.

In conclusion, feed restriction affected the functions of PMN and PBMC, supporting the hypothesis that the greater risk of infectious diseases in cows experiencing a NEB is related to the impairment of PMN and PBMC functions by NEFA or other components of blood that are still unknown. These results suggest that a severe feed restriction could be used as a model in order to study the effect of the NEB on the immune system of dairy cows. In the tested conditions, supplementation with folic acid and vitamin B<sub>12</sub> did not affect the increase in NEFA or BHB concentration and did not reduce the impairment of immune cell functions.

#### **2.4.7. Acknowledgments**

The authors would like to thank the following people from Agriculture and Agri-Food Canada (Sherbrooke, QC, Canada): Valérie Beaudet, Catherine Thibault, and Véronique Roy for providing technical assistance, and the dairy barn staff for taking care of the animals. The authors are grateful to Mary Varcoe, from the Translation Bureau, Public Services and Procurement Canada, for her careful editing of this manuscript. This research was financially supported by Agriculture and Agri-Food Canada (Ottawa, ON, Canada) and by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (Ottawa, ON, Canada). Preliminary results have been published in an abstract form (Vanacker et al., 2017a).

#### **2.4.8. References**

Bernier-Dodier P, Girard CL, Talbot BG and Lacasse P 2011. Effect of dry period management on mammary gland function and its endocrine regulation in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 94, 4922–4936.

Canadian Council on Animal Care 1993. Guide to the care and use of experimental animals, volume 1, 2nd edition. CCAC, Ottawa, ON, Canada.

Carbonneau E, de Passillé AM, Rushen J, Talbot BG and Lacasse P 2012. The effect of incomplete milking or nursing on milk production, blood metabolites, and immune functions of dairy cows. *Journal of Dairy Science* 95, 6503–6512.

Duplessis M, Girard CL, Santschi DE, Laforest J-P, Durocher J and Pellerin D 2014. Effects of folic acid and vitamin B<sub>12</sub> supplementation on culling rate, diseases, and reproduction in commercial dairy herds. *Journal of Dairy Science* 97, 2346–2354.

Duplessis M, Lapierre H, Pellerin D, Laforest J-P, and Girard CL 2017. Effects of intramuscular injections of folic acid, vitamin B<sub>12</sub>, or both, on lactational performance and energy status of multiparous dairy cows. *Journal of Dairy Science* 100, 4051–4064.

Esposito G, Irons PC, Webb EC and Chapwanya A 2014. Interactions between negative energy balance, metabolic diseases, uterine health and immune response in transition dairy cows. *Animal Reproduction Science* 144, 60–71.

Gagnon, A, Khan DR, Sirard M-A, Girard CL, Laforest J-P and Richard FJ 2015. Effects of intramuscular administration of folic acid and vitamin B<sub>12</sub> on granulosa cells gene expression in postpartum dairy cows. *Journal of Dairy Science* 98, 7797–7809.

Girard C, Vanacker N, Beaudet V, Duplessis M and Lacasse P 2019. Glucose and insulin responses to an intravenous glucose tolerance test administered to fed-restricted dairy cows receiving folic acid and vitamin B<sub>12</sub> supplements. *Journal of Dairy Science*.

Goff JP and Horst RL 1997. Physiological changes at parturition and their relationship to metabolic disorders. *Journal of Dairy Science* 80, 1260–1268.

Graulet B, Matte JJ, Desrochers A, Doepel L, Palin M-F and Girard CL 2007. Effects of dietary supplements of folic acid and vitamin B<sub>12</sub> on metabolism of dairy cows in early lactation. *Journal of Dairy Science* 90, 3442–3455.

Hoeben D, Burvenich C, Trevisi E, Bertoni G, Hamann J, Bruckmaier RM and Blum JW 2000. Role of endotoxin and TNF- $\alpha$  in the pathogenesis of experimentally induced coliform mastitis in periparturient cows. *Journal of Dairy Research* 67, 503–514.

Kehrli ME Jr, Nonnecke BJ and Roth JA 1989. Alterations in bovine lymphocyte function during the periparturient period. *American Journal of Veterinary Research* 50, 215–220.

Lacetera N, Scalia D, Bernabucci U, Ronchi B, Pirazzi D and Nardone A 2005. Lymphocyte functions in overconditioned cows around parturition. *Journal of Dairy Science* 88, 2010–2016.

Leblanc S 2010. Monitoring metabolic health of dairy cattle in the transition period. *Journal of Reproduction and Development* 56, S29–S35.

Leblanc SJ, Lissemore KD, Kelton DF, Duffield TF and Leslie KE 2006. Major advances in disease prevention in dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 89, 1267–1279.

McGuire MA, Theurer M, Vicini JL and Crooker B 2004. Controlling energy balance in early lactation. *Advances in Dairy Technology* 16, 241–252.

Moreira da Silva F, Burvenich C, Massart Leën AM and Brossé L 1998. Assessment of blood neutrophil oxidative burst activity in dairy cows during the period of parturition. *Animal Science* 67, 421–426.

Nonnecke BJ, Kimura K, Goff JP and Kehrli ME Jr 2003. Effects of the mammary gland on functional capacities of blood mononuclear leukocyte populations from periparturient cows. *Journal of Dairy Science* 86, 2359–2368.

National Research Council 2001. Nutrient requirements of dairy cattle 7th revue edition. National Academies Press, Washington, DC, USA.

Ollier S, Beaudoin F, Vanacker N and Lacasse P 2016. Effect of reducing milk production using a prolactin-release inhibitor or a glucocorticoid on metabolism and immune functions in cows subjected to acute nutritional stress. *Journal of Dairy Science* 99, 9949–9961.

Ollier S, Zhao X and Lacasse P 2014. Effects of feed restriction and prolactin-release inhibition at drying off on metabolism and mammary gland involution in cows. *Journal of Dairy Science* 97, 4942–4954.

Preynat A, Lapierre H, Thivierge MC, Palin MF, Matte JJ, Desrochers A and Girard CL 2009. Effects of supplements of folic acid, vitamin B<sub>12</sub>, and rumen-protected methionine on whole body metabolism of methionine and glucose in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 92, 677–689.

Roland L, Drillich M and Iwersen M 2014. Hematology as a diagnostic tool in bovine medicine. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 26, 592–598.

Scott JM 1999. Folate and vitamin B<sub>12</sub>. *Proceedings of Nutrition Society* 58, 441-448.

Ster C, Loisel M-C and Lacasse P 2012. Effect of postcalving serum nonesterified fatty acids concentration on the functionality of bovine immune cells. *Journal of Dairy Science* 95, 708–717.

Vanacker N, Girard CL, Duplessis M and Lacasse P 2017b. Effects of supplementary folic acid and vitamin B<sub>12</sub> feed-restriction on immune cell functions and blood cell population in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 100 (Suppl. 2), 277.

Vanacker N, Ollier S, Beaudoin F, Blouin R and Lacasse P 2017a. Effect of inhibiting the lactogenic signal at calving on milk production and metabolic and immune perturbations in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 100, 5782–5791.

## CHAPITRE 3

### EFFECT OF DIFFERENT FATTY ACIDS ON THE PROLIFERATION AND CYTOKINE PRODUCTION OF DAIRY COW PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS

#### 3.1 Originalité du travail par rapport à la science

De précédentes études (Kehrl et al., 1989, Hammon et al., 2006, Ster et al., 2012) ont permis de déterminer que les AGNE ont un impact négatif sur le système immunitaire. En effet, dans leur étude de 2012, Ster et al. ont montré que la lymphoprolifération était inversement corrélée à la concentration en AGNE dans le sérum. En 1990, Calder et al. ont étudié l'effet de différents acides gras sur la prolifération des lymphocytes de ganglions lymphatiques de rat stimulés par la ConA. Ils ont conclu que tous les acides gras testés ont inhibé la réponse au mitogène, et que l'étendue de l'inhibition dépendait de la concentration en acides gras. Ils ont également montré que les acides gras polyinsaturés avaient de manière générale un plus grand effet inhibiteur que les acides gras saturés (Calder et al., 1994). Cependant, parmi toute la littérature disponible, les résultats des études visant à évaluer l'effet des AGNE sur les fonctions immunitaires varient considérablement. Ces variations peuvent être expliquées par la diversité des protocoles utilisés : différents acides gras utilisés, soit en tant qu'acides gras libres soit en étant complexé à de l'albumine, différentes concentrations et différents temps d'incubation des lymphocytes T en présence des acides gras. À notre connaissance, aucune étude n'a jusqu'à présent abordé l'effet de différents acides gras sur les fonctions lymphocytaires bovines. Comme il existe une grande variabilité des réponses entre les espèces (Tsang et al., 1977), il est important d'évaluer l'effet des acides gras retrouvés dans les profils sanguins des vaches durant la période péripartum. En effet, les AGNE libérés en période péripartum sont de différentes origines et possèdent des structures différentes. Dès lors, il était intéressant de déterminer si, outre la concentration en AGNE, le type de l'acide gras aurait également un impact. L'objectif de ce projet était de tester l'impact de différents acides gras libérés au vêlage à différentes concentrations ainsi qu'un mélange d'acides gras représentant le

profil en acides gras retrouvés en période péripartum sur certains paramètres du système immunitaire des vaches laitières.

### **3.2 Contribution de l'auteur**

Pour cet article, j'ai réalisé la phase expérimentale au Centre de Recherche et de développement de Sherbrooke. Les essais cellulaires finaux utilisés pour la publication de l'article ont été réalisés par Henrique Barbosa Hooper et Catherine Thibault. Des essais préliminaires avaient été réalisés par moi-même ainsi que par d'autres membres de notre équipe notamment Séverine Ollier et Geneviève Drouin. La compilation des données a été faite par moi-même en collaboration avec Catherine Thibault. Enfin, j'ai écrit l'article dont je suis la première auteure sous la supervision du Dr Pierre Lacasse.

### **3.3 Référence de l'article**

Vanacker, N., Blouin, R., Ster, C., & Lacasse, P. (2022). Effect of different fatty acids on the proliferation and cytokine production of dairy cow peripheral blood mononuclear cells. *Journal of dairy science*, *105*(4), 3508–3517.

<https://doi.org/10.3168/jds.2021-21296>

### 3.4 Manuscrit de l'article

#### **FATTY ACIDS AND MONONUCLEAR CELL FUNCTIONS**

#### **Effect of different fatty acids on the proliferation and cytokine production of dairy cow peripheral blood mononuclear cells**

**Noémie Vanacker\*†, Richard Blouin†, Céline Ster\* and Pierre Lacasse\*<sup>1</sup>**

\*Sherbrooke Research and Development Centre, Agriculture and Agri-Food Canada, Sherbrooke, Québec, Canada J1M 0C8

†Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC, Canada J1K 2R1

<sup>1</sup>Corresponding author: [Pierre.Lacasse@agr.gc.ca](mailto:Pierre.Lacasse@agr.gc.ca)



### **3.4.1. Interpretive Summary**

During the transition period, dairy cows often experience negative energy balance, which induces metabolic and immunological disturbances caused among others things by the increase in blood NEFA concentration. In this study, we evaluated the effect of 11 fatty acids (palmitoleic, myristic, palmitic, stearic, oleic, linoleic, docosahexaenoic, conjugated linoleic, lauric, eicosapentanoic and linolenic acids) as well as a mix that represents the NEFA profile observed during the transition period on proliferation and cytokines secretion of lymphocytes. Overall, our study confirms that NEFA have a negative impact on some lymphocyte functions and that their inhibitory effect on cytokine secretion increases with the degree of unsaturation.

### **3.4.2. Abstract**

During the transition period, dairy cows often experience negative energy balance, which induces metabolic and immunological disturbances. Our previous work has shown a relationship between the inhibition of immune functions and increased blood non-esterified fatty acid (NEFA) levels. In this study, we evaluated the effect of 11 fatty acids (palmitoleic, myristic, palmitic, stearic, oleic, linoleic, docosahexaenoic, conjugated linoleic, lauric, eicosapentanoic and linolenic acids) as well as a mix that represents the NEFA profile observed during the transition period at different concentrations (0, 50, 100 and 250  $\mu\text{M}$ ) on proliferation and cytokines secretion of lymphocytes. To assess lymphoproliferation, peripheral blood mononuclear cell (PBMC) from five healthy cows (166–189 days in milk) were isolated, stimulated with the mitogenic lectin ConA, incubated for 72 h with or without fatty acids and subjected to flow cytometry analysis. Our results showed that all fatty acids, except lauric acid, significantly reduced proliferation of PBMC in a dose-dependent manner. The most detrimental effect was observed with linoleic and stearic acids, where proliferation of PBMC was already inhibited at the lowest dose (50  $\mu\text{M}$ ). For cytokine secretion, we found that IL-4 (interleukine- 4) levels in culture supernatant of ConA-stimulated PBMC were considerably

reduced after a 24-h exposure to the lowest dose (50  $\mu\text{M}$ ) of oleic and palmitoleic acids. A dose of 100  $\mu\text{M}$  of eicosapentanoic acid, NEFA mixture and myristic acid was necessary to observe a reduction in IL-4 levels. PBMC also showed a decrease in the secretion of INF- $\gamma$  in response to lauric, linolenic, palmitoleic and stearic acids at 50  $\mu\text{M}$  and myristic acid at 100  $\mu\text{M}$ . Overall, polyunsaturated fatty acids were more potent inhibitors of cytokine secretions than saturated fatty acids. In addition, there was an inverse relationship between the melting points of fatty acids and their ability to inhibit IL-4 and INF- $\gamma$  secretions, as evidenced by greater inhibition with low-melting-point fatty acids. Overall, our study confirms that NEFA have a negative impact on some lymphocyte functions and that their inhibitory effect on cytokine secretions increases with the degree of unsaturation.

**Key words:** transition period, immune functions, degree of saturation, lymphocyte

### **3.4.3. Introduction**

For high-producing dairy cows, the transition from gestation to peak lactation is associated with a high susceptibility to infectious diseases such as mastitis and metritis, likely caused by a state of immunodepression. Indeed, parturition in dairy cattle is associated with a decreased responsiveness of blood lymphocytes to stimulation with mitogenic agents (Carbonneau et al., 2012; Ster et al., 2012; Vanacker et al., 2017) and with decreased immunoglobulin production by B cells (Nonnecke et al., 2003; Lacetera et al., 2005). Accordingly, about 75% of diseases occur during the first month following calving, and 36% of deaths occur within the first 60 d after calving (Leblanc et al., 2006). Another study of Hammon et al. (2006) showed that there is a relationship between uterine health disorders and the energy status in Holstein cows. Therefore, it is important to determine the causes of periparturient immunodepression to improve the health of dairy cows.

In early lactation, the nutrients provided by the diet are not sufficient to provide the energy required for milk production, resulting in a negative energy balance. Consequently, cows must mobilize fat reserves to balance the energy deficit. A cause-and-effect relationship between

energy deficit and the impairment of immune functions was evidenced by Nonnecke et al. (2003). Ster et al. (2012) showed that lymphocyte proliferation and interferon- $\gamma$  secretion were lower when the cells were incubated with sera harvested in the postpartum period and that those parameters were inversely correlated with serum non-esterified fatty acid (NEFA) concentration. In addition, a dose-effect relationship was found between NEFA concentrations and the inhibition of both lymphocyte proliferation and interferon- $\gamma$  secretion (Lacetera et al., 2004; Ster et al., 2012). These results suggest that the increase in blood NEFA concentration is implicated in the peripartum immunodepression. Accordingly, the odds of developing a metritis (Ospina et al., 2010) and mastitis (Moyes et al., 2009) in early lactation increase when the blood NEFA concentration is elevated.

Previous studies have shown an inhibitory effect of different fatty acids on lymphoproliferation (Calder et al., 1990; Calder et al., 1994; Ster et al., 2012). However, the mechanism by which fatty acids affect bovine immune cell functions is still unknown. Calder and Willemsen (2016) suggested that changing immune cell membrane composition can affect the physical properties, the aptitude to form signaling platforms, and the activity of membrane lipid-derived signaling molecules. Indeed, phospholipid membrane functions are strongly involved in the ability of cells to proliferate. Therefore any change in the fatty acid composition of the membrane lipids has an impact on the proliferative functions. Another way by which NEFA could impact immune function is through the binding and activation of receptors such as the peroxisome proliferator-activated receptor (**PPAR**).

The results vary considerably among studies evaluating the effect of NEFA on immune functions. These variations can be explained by the wide range of protocols used: different fatty acids used as either free fatty acid or as an albumin complex, different concentrations and different exposure times of the T-lymphocyte to the fatty acids. Calder et al. (1991) studied the effect of fatty acids on the proliferation of ConA-stimulated rat lymph node lymphocytes. In general, the effect was both dose- and time-of-exposure-dependent. Unsaturated fatty acids had greater inhibitory power than saturated fatty acids. To our knowledge, no studies have so far addressed the effect of fatty acids on bovine lymphocyte functions. Since there is a great

variability of the responses between species (Tsang et al., 1977), it is important to assess the effect of the fatty acids found in the blood profiles of cows during the peripartum period. Therefore, the aim of this study was to determine the effect of several fatty acids on bovine lymphocyte functions.

### **3.4.4. Materials and Methods**

#### ***3.4.4.1. Reagents***

All fatty acids (palmitoleic acid, myristic acid, palmitic acid, stearic acid, oleic acid, linoleic acid, docosahexaenoic acid, lauric acid, eicosapentanoic acid and linolenic acid; Table 4) were purchased from Sigma-Aldrich Canada Ltd. (Oakville, ON, Canada), except for conjugated linoleic acid, which was purchased from Cederlane (Burlington, ON, Canada). A NEFA mix containing 36% stearic acid, 30% palmitic acid, 25% oleic acid, 3% linoleic acid, 2.5% palmitoleic acid, 2% myristic acid and 1.5% docosahexaenoic acid was prepared. These proportions reflect those encountered in bovine serum during the periparturient period based on different *in vivo* studies (Leroy et al., 2011; Contreras et al., 2012; Hostens et al., 2012; Watts et al., 2013). Each fatty acid was prepared in a solution of 100% ethanol to reach a concentration of 100 mM and then stored at -20°C until utilization. The day of the experiment, each fatty acid was diluted in a media of RPMI 1640 supplemented with 1% BSA, glutamine, antibiotics and 1% ethanol to reach the tested concentration and placed at 37°C on agitation for 1 h before utilization. The final concentration of ethanol in the wells was 0.25%, and we have previously determined that this concentration of ethanol does not affect the tested parameters.

**Table 4. Fatty acids used in this study.**

Fatty acid	Class	Lipid number	% Mix <sup>1</sup>	Melting point (°C)
Lauric acid	Saturated	C12:0	0	43.2
Myristic acid	Saturated	C14:0	2	54.4
Palmitic acid	Saturated	C16:0	30	62.9
Stearic acid	Saturated	C18:0	36	69.3
Palmitoleic acid	Mono-unsaturated	C16:1	2.5	-0.1
Oleic acid	Mono-unsaturated	C18:1	25	13.4
Linoleic acid	Poly-unsaturated	C18:2	3	-5
Conjugated linoleic acid	Poly-unsaturated	C18:2 <sub>cis 9, trans 11</sub>	0	42.5
Linolenic acid	Poly-unsaturated	C18:3	0	-11
Eicosapentanoic acid	Poly-unsaturated	C20:5	0	-53 to -54
Docosahexaenoic acid	Poly-unsaturated	C22:6	1.5	-44.5 to -44.7

1 % Mix: percentage of each fatty acid used in the Mix.

#### ***3.4.4.2. Animals and Experimental Procedures***

The study was conducted in accordance with the guidelines of the Canadian Council on Animal Care (1993) and approved by Sherbrooke Research and Development Centre animal care committee (#486). Five healthy, multiparous Holstein cows (166–189 days in milk, with somatic cell count < 240,000/mL) housed at Agriculture and Agri-Food Canada’s Sherbrooke Research and Development Centre (Sherbrooke, QC, Canada) were used as immune cell donors. Blood samples were collected from the jugular vein in blood-collection bags containing citrate–phosphate–dextrose–adenine anticoagulant (Animal Blood Resources International, Dixon, CA). PBMC were isolated as described by Vanacker et al. (2017). The plasma NEFA concentration for each donor cow was determined by an enzymatic colorimetric method using a Randox kit (Scientifiques ESBE, Saint-Laurent, QC, Canada) as previously

described by Vanacker et al. (2020). The plasma NEFA concentration was similar in all five donor cows, ranging between 210 to 228  $\mu\text{M}$ .

#### ***3.4.4.3. PBMC Proliferation Assay***

Peripheral blood mononuclear cells proliferation was assayed as described by Ollier et al. (2016), with some modifications. Briefly, isolated PBMC were labelled with 1  $\mu\text{M}$  carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester using the CellTrace CFSE Cell Proliferation Kit (Thermo Fisher Scientific, Burlington, ON, CA). To assess the effect of the fatty acid on PBMC proliferation, labelled PBMC were incubated in triplicate within 6 hours after blood collection with the fatty acid of interest or the mix at different concentrations (0, 50, 100 and 250  $\mu\text{M}$ ) and in presence of the mitotic agent ConA, (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, CA) at a concentration of 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in a 96-well plate ( $1.5 \times 10^5$  cells per well) at 38.5°C with 5%  $\text{CO}_2$  for 72 h. In each plate, three wells were incubated with PBMC stimulated with ConA as positive control, and three well containing PBMC without mitogen stimulation as a negative control. After a 72-h incubation, proliferation was analyzed using the FACSCanto II flow cytometer (BD Biosciences, Mississauga, ON, Canada). The number of PBMC recorded was 15 000.

Prior to data acquisition, multiple validation tests were done to localize the gates for the dead cells (staining with propidium iodine). These gates were used in the present experiment to evaluate cell death percentage.

#### ***3.4.4.4. PBMC production of IFN- $\gamma$ and IL-4***

To assess the effect of the fatty acid on PBMC cytokine secretion, PBMC, from the same donors cows as for the proliferation assay, were incubated with the fatty acid of interest or the mix at different concentrations (0, 50, 100 and 250  $\mu\text{M}$ ) and in presence of the mitotic agent ConA, (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, CA) at a concentration of 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in a 24-well plate

( $1.2 \times 10^6$  cells per well) at 38.5°C with 5% CO<sub>2</sub> for 24 h. The supernatant was then collected by pooling the two wells with the same condition and stored at -80°C until measurement. Supernatant cytokine content was determined with commercial kits for each cytokine: INF- $\gamma$  (Bovine Interferon-  $\gamma$  Specific ELISA Assay Kit, Cedarlane Laboratories Limited, Burlington, ON, Canada); IL-4 (Bovine IL-4 ELISA Kit, RayBiotech Life, Norcross, GA, USA).

#### **3.4.4.5. Statistical Analysis**

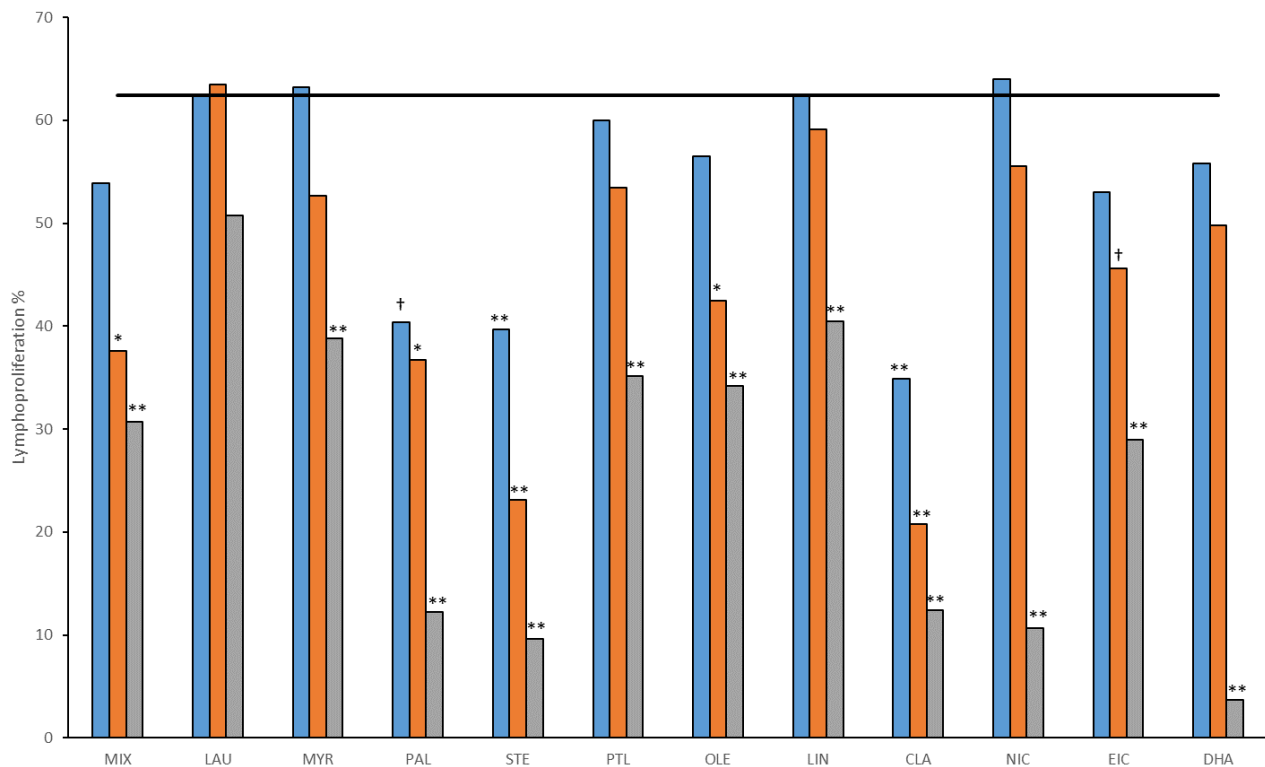
Since all doses were tested within each of the donor cows, data for percent proliferation were analyzed as complete block design in a one-way factorial with four levels (doses) for each fatty acid separately. Each dose was then compared to the positive control (no fatty acid supplementation ConA stimulated) result using a Dunnett adjustment. For the cytokine data, due to variation among cell donor cows, the effect of each dose was tested using a Student t-test on the within-cow delta values calculated between the result at a specific concentration and the no added NEFA ( $n = 5$ ). The fatty acids were separated according to their saturation degree (saturated, monounsaturated and polyunsaturated), and for each concentration their average response was analyzed with the MIXED procedure of SAS. In addition, regression analysis was performed on the melting point of the fatty acids (Table 4) and the average response using the REG procedure of SAS. Differences were considered statistically significant when  $P < 0.05$  and were considered a trend when  $P < 0.10$

### **3.4.5. Results**

#### **3.4.5.1. PBMC Proliferation**

Except for lauric acid ( $P > 0.1$ ), all fatty acids inhibited proliferation within the tested range (Figure 15). The inhibitory effect of conjugated linoleic acid and stearic acid was already significant ( $P < 0.01$ ) at the smallest dose tested (50  $\mu$ M). At a concentration of 100  $\mu$ M, NEFA mixture, oleic acid and palmitic acid significantly decreased ( $P \leq 0.05$ ) PBMC proliferation,

while eicosapentanoic acid tended to decrease it ( $P = 0.06$ ). At the highest tested concentration, 250  $\mu\text{M}$ , every fatty acid except for lauric acid significantly decreased lymphoproliferation ( $P < 0.01$ ). No specific effect on the saturation degree ( $P > 0.5$ ) or the melting point ( $P \geq 0.2$ ) of fatty acids was observed on lymphoproliferation.

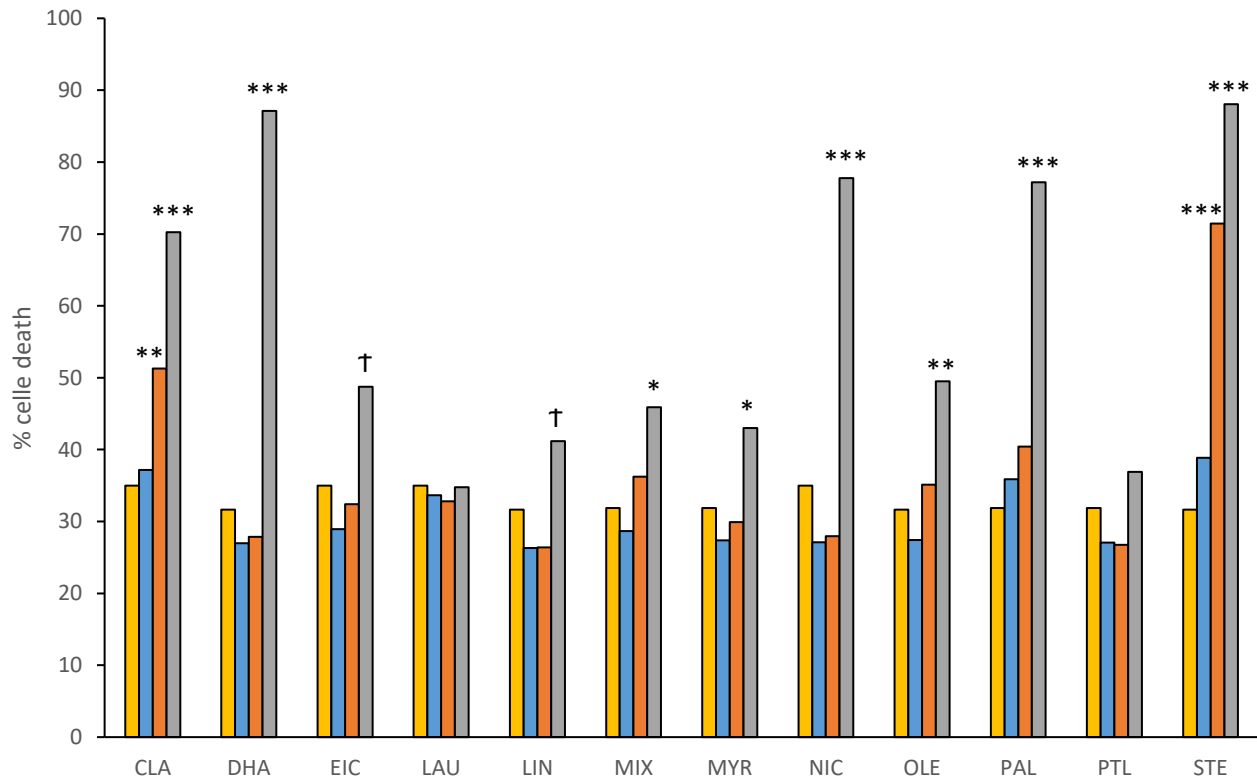


**Figure 15. Percentage of lymphoproliferation in the presence of fatty acids at different concentrations (blue = 50  $\mu\text{M}$ ; orange = 100  $\mu\text{M}$  and grey = 250  $\mu\text{M}$ ) compared to untreated control (straight line).**

(\*\*  $P < 0.01$ ; \*  $P < 0.05$ ; †  $P < 0.1$ ), SEM  $\leq 10.5$ . MIX = mix of NEFA, LAU = Lauric acid, MYR = myristic acid, PAL = palmitic acid, STE = stearic acid, PTL = palmitoleic acid, OLE = oleic acid, LIN = linoleic acid, CLA = conjugated linoleic acid, NIC = linolenic acid, EIC = eicosapentanoic acid, DHA = docosahexaenoic acid.



Without fatty acids added, cell death ranged between 31.6 and 35.0 %. At 50  $\mu\text{M}$ , none of the fatty acids increased cell death (Figure 16). At a concentration of 100  $\mu\text{M}$ , cell death was increased ( $P < 0.01$ ) by conjugated linoleic acid and stearic acid. At the highest concentration, conjugated linoleic acid, docosahexaenoic acid, NEFA mixture, myristic acid, linolenic acid, oleic acid, palmitic acid and stearic acid significantly increased cell death ( $P \leq 0.05$ ), while eicosapentanoic acid and linoleic acid tended ( $P < 0.1$ ) to increase it. Lauric acid and palmitoleic acid did not increase ( $P > 0.4$ ) cell death at any of the doses tested.



**Figure 16. Percentage of cell death during the lymphoproliferation in either absence (yellow= 0 μM) or presence of fatty acids at different concentrations (blue = 50 μM; orange = 100 μM and grey = 250 μM).**

(\*\*  $P < 0.01$ ; \*  $P < 0.05$ ; †  $P < 0.1$ ), SEM  $\leq 5.6$ . MIX = mix of NEFA, LAU = Lauric acid, MYR = myristic acid, PAL = palmitic acid, STE = stearic acid, PTL = palmitoleic acid, OLE = oleic acid, LIN = linoleic acid, CLA = conjugated linoleic acid, NIC = linolenic acid, EIC = eicosapentanoic acid, DHA = docosahexaenoic acid.

#### 3.4.5.2. Cytokine Secretion

Concentration of INF- $\gamma$  in the supernatant of PBMC incubated without ConA were very low and below the detection limit of the test (not shown). Without NEFA added to the media, stimulation of PBMC with ConA induced a secretion of INF- $\gamma$  (3220 pg/mL  $\pm$  641). At a concentration of 50 μM, lauric acid, linolenic acid, palmitoleic acid, myristic acid and stearic

acid significantly decreased INF- $\gamma$  secretion ( $P \leq 0.05$ ) when compared to that observed in cells incubated without fatty acids (Table 5). At this same concentration, conjugated linoleic acid, eicosapentanoic acid, linoleic acid and tended to decrease the levels of INF- $\gamma$  in the supernatant ( $P < 0.1$ ). Furthermore, at a concentration of 100  $\mu\text{M}$ , lauric acid, linolenic acid and myristic acid significantly decreased INF- $\gamma$  secretion ( $P \leq 0.05$ ), while all the other fatty acids except for stearic acid and oleic acid tended to decrease it ( $P < 0.1$ ). On the contrary, palmitic acid tended to increase INF- $\gamma$  secretion ( $P < 0.1$ ). Oleic acid as well as stearic acid had no impact on INF- $\gamma$  secretion. At the highest concentration, no significant changes were observed, however eicosapentanoic acid, lauric acid, myristic acid, linolenic acid and palmitoleic acid tended to decrease INF- $\gamma$  secretion ( $P < 0.1$ ). We observed that polyunsaturated fatty acids were more potent inhibitors of INF- $\gamma$  secretion than the saturated ones ( $P \leq 0.05$ ) at all concentrations (Figure 17). Similarly, the inhibitory effect of fatty acid on INF- $\gamma$  production increased when the melting point of the fatty acids decreased ( $P \leq 0.05$ ). Polyunsaturated fatty acids were more inhibitory than saturated fatty acids at 50  $\mu\text{M}$  ( $P = 0.02$ ), 100  $\mu\text{M}$  ( $P = 0.05$ ) and 250  $\mu\text{M}$  ( $P = 0.03$ ). Monounsaturated fatty acids tend to be more inhibitory than saturated fatty acids at 50  $\mu\text{M}$  ( $P = 0.07$ )

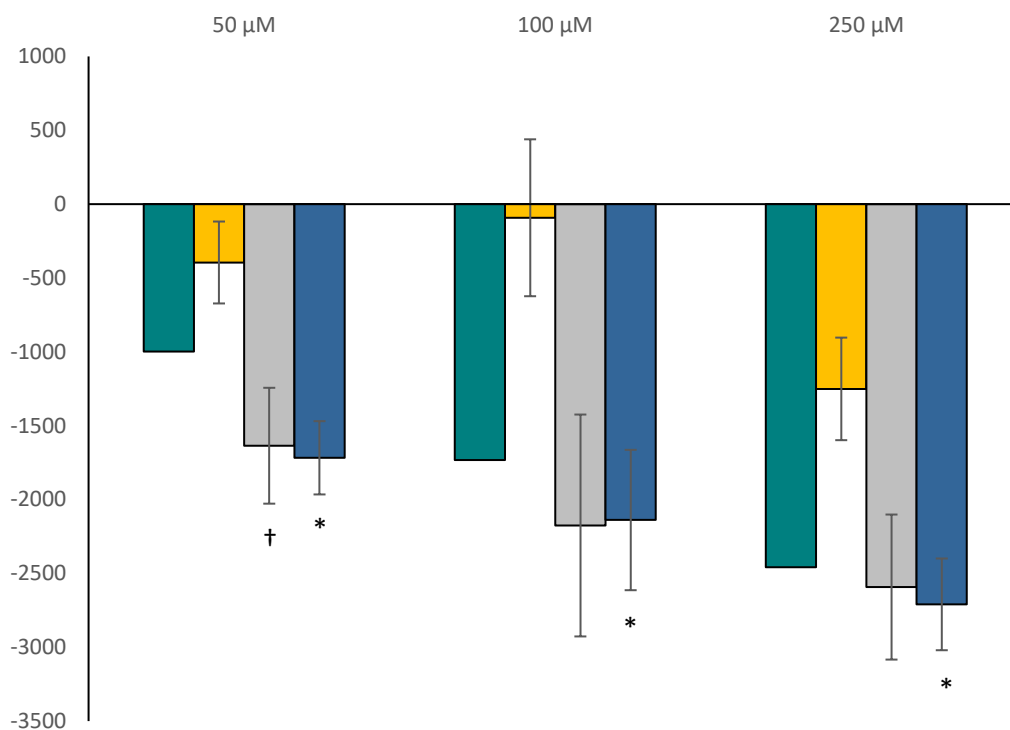
**Table 5. Interferon- $\gamma$  concentration (pg/mL) in the culture media of PBMC exposed to different concentrations of fatty acids compared with untreated control.**

Fatty acid	50 $\mu$ M			100 $\mu$ M			250 $\mu$ M		
	Mean <sup>1</sup>	sem	P value	Mean <sup>1</sup>	sem	P value	Mean <sup>1</sup>	sem	P value
Mix of NEFA	-997.2	509.12	0.12	-1731.6*	738.95	0.08	-2459.2	1305.93	0.13
Lauric acid (C12:0)	-678.8*	219.71	0.04	-1340*	412.25	0.03	-2256.8	948.39	0.08
Myristic acid (C14:0)	-1032.2*	363.34	0.05	-952.8*	270.14	0.02	-1825.2	811.94	0.09
Palmitic acid (C16:0)	743.6	385.28	0.13	2365.6	979.81	0.07	303.2	1672.83	0.87
Stearic acid (C18:0)	-612.4*	193.24	0.03	-441.6	427.38	0.36	-1224	1264.12	0.39
Palmitoleic acid (C16:1)	-1088*	356.16	0.04	-1764.8	739.34	0.08	-2421.6	1081.31	0.09
Oleic acid (C18:1)	-2183.2	1025.73	0.10	-2586.4	1290.61	0.12	-2763.2	1453.36	0.13
Linoleic acid (C18:2)	-1598.4	703.88	0.09	-2326.4	1065.10	0.09	-2763.6	1312.81	0.10
Conjugated Linoleic acid (C18:2)	-1707.6	731.82	0.08	-2172.4	979.28	0.09	-2713.2	1281.49	0.10
Linolenic acid (C18:3)	-1692.8*	564.82	0.04	-2176.8*	795.70	0.05	-2585.2	1086.56	0.08
Eicosapentanoic acid (C20:5)	-1840	775.70	0.08	-2288.4	892.83	0.06	-2640.8	1152.59	0.08
Docosahexaenoic acid (C22:6)	-1747.6	1266.13	0.24	-1728.8	656.06	0.06	-2844.4	1420.57	0.12

Values presented in the table represent the mean obtained by all five cow donors.

<sup>1</sup>Calculated as the difference between the concentration of INF- $\gamma$  at a given dose and its concentration at 0 mM.

\*\*  $P < 0.01$ ; \*  $P \leq 0.05$ ; †  $P \leq 0.1$



**Figure 17. Mean value of Interferon- $\gamma$  production according to the class of NEFA.**

(Green = MIX, yellow = Saturated, grey = monounsaturated, blue = polyunsaturated). Calculated as the difference between the concentration of interferon- $\gamma$  at a given dose and its concentration without fatty acids. Polyunsaturated fatty acids were more inhibitory than saturated fatty acids at 50  $\mu$ M ( $P = 0.02$ ), 100  $\mu$ M ( $P = 0.05$ ) and 250  $\mu$ M ( $P = 0.03$ ). Monounsaturated fatty acids tend to be more inhibitory than saturated fatty acids at 50  $\mu$ M ( $P = 0.07$ ).

Concentration of IL-4 in the supernatant of PBMC incubated without ConA were very low and below the detection limit of the test (not shown). Without NEFA added to the media, stimulation of PBMC with ConA induced a secretion of IL-4 (2207 pg/mL  $\pm$  366). At a concentration of 50  $\mu$ M, oleic acid, myristic acid and palmitoleic acid significantly decreased IL-4 secretion ( $P \leq 0.05$ ) when compared with the control (Table 6). At a concentration of 100  $\mu$ M, NEFA mixture, myristic acid, palmitoleic acid, oleic acid, linolenic acid and eicosapentanoic acid significantly decreased IL-4 secretion ( $P \leq 0.05$ ), while lauric and linoleic acids tended to decrease it ( $P < 0.1$ ). At the highest concentration, NEFA mixture, myristic acid, palmitoleic acid and oleic acid significantly decreased IL-4 secretion ( $P \leq 0.05$ ), while all other fatty acids except for palmitic acid and stearic acid tended to decrease it ( $P < 0.1$ ). Stearic acid was the only fatty acid showing no effect on IL-4 secretion at all doses tested. At a concentration of 250  $\mu$ M, we observed that polyunsaturated fatty acids tended to be inhibitors of IL-4 secretion ( $P = 0.09$ ) (Figure 18). At the concentrations of 50 and 100  $\mu$ M, the inhibitory effect of fatty acids on IL-4 production tended to increase when the melting point of the fatty acid decreased ( $P < 0.1$ ). At a concentration of 250  $\mu$ M, that effect became significant ( $P < 0.01$ ).

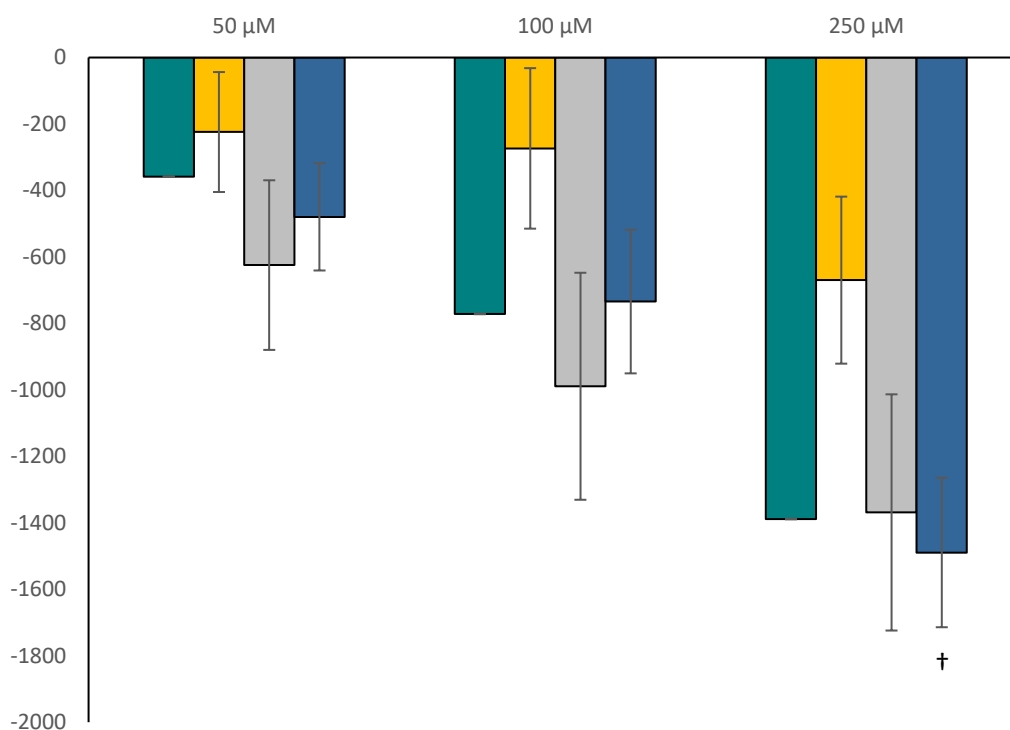
**Table 6. Interleukine-4 concentration (pg/mL) in the culture media of PBMC exposed to different concentrations of fatty acids compared with untreated control.**

Fatty acid	50 $\mu$ M			100 $\mu$ M			250 $\mu$ M		
	Mean	sem	P value	Mean	sem	P value	Mean	sem	P value
Mix of NEFA	-358.34	167.83	0.10	-771.37*	248.83	0.04	-1388.56*	506.89	0.05
Lauric acid (C12:0)	-553.29	290.46	0.13	-1080.1	433.43	0.07	-1636.11	714.03	0.08
Myristic acid (C14:0)	-438.45*	159.57	0.05	-510.88*	120.20	0.01	-745.61*	272.99	0.05
Palmitic acid (C16:0)	174.56	207.44	0.45	231.91	212.91	0.34	-216.89	515.60	0.70
Stearic acid (C18:0)	-79.59	201.55	0.71	265.28	257.98	0.36	-80.73	417.38	0.86
Palmitoleic acid (C16:1)	-318.89*	86.82	0.02	-826.1*	245.67	0.03	-1213.43*	367.39	0.03
Oleic acid (C18:1)	-930.23*	260.22	0.02	-1152.27*	304.05	0.02	-1524.21*	491.51	0.04
Linoleic acid (C18:2)	-203.41	179.20	0.32	-653.87	273.65	0.08	-1148.6	454.75	0.07
Conjugated Linoleic acid (C18:2)	-133.22	169.56	0.48	-408	243.42	0.17	-1102.33	493.46	0.09
Linolenic acid (C18:3)	-966.5	377.29	0.06	-1220.44*	445.07	0.05	-1758.28	736.02	0.08
Eicosapentanoic acid (C20:5)	-745.19	356.00	0.10	-1017.29*	336.40	0.04	-1855.27	820.63	0.09
Docosahexaenoic acid (C22:6)	-348.87	399.32	0.43	-372.49	238.55	0.19	-1582.91	697.16	0.09

Values presented in the table represent the mean obtained by all five cow donors.

<sup>1</sup>Calculated as the difference between the concentration of IL-4 at a given dose and its concentration without fatty acids.

\*\*  $P < 0.01$ ; \*  $P \leq 0.05$ ; †  $P \leq 0.1$



**Figure 18. Mean value of interleukin-4 production according to the class of NEFA.**

(Green = MIX, yellow = Saturated, grey = monounsaturated, blue = polyunsaturated). Calculated as the difference between the concentration of interleukin-4 at a given dose and its concentration without fatty acids. Polyunsaturated fatty acids tend to be more inhibitory than saturated fatty acids at 250 μM ( $P = 0.09$ ).

### 3.4.6. Discussion

The mix of NEFA had an impact on lymphocyte functions at a concentration of 100 μM that is much lower than the concentration observed during the periparturient period, when blood concentrations can reach up to 700 μM (Adewuyi et al., 2005; McCarthy et al., 2015). In vivo, most NEFA are complexed to serum albumin (BSA). Although BSA was added to the cell media, its concentration in the well (0.25%) was low in comparison to its concentration in the bloodstream (3%; Labouche, 1964). Therefore, for the same concentration, the amount of free



fatty acid available is likely to be higher in vitro compared to in vivo which could explain the biological effects observed in vitro with lower doses. The negative impact of the NEFA mix on lymphoproliferation showed that the model chosen for this assay was adequate. The results support the concept that NEFA have a role in the impairment of the immune system during the periparturient period.

In the present study, most fatty acids inhibited IL-4 and INF- $\gamma$  secretion. Although they reported an inhibitory effect of fatty acids on bovine PBMC proliferation, Renner et al. (2013), did not reported an effect of fatty acids on IL-4 and INF- $\gamma$ . The difference observed between their study is likely related the methodology used. Indeed, we measured cytokines secretion in the culture supernatant using ELISA tests while Renner et al. (2013) measured cytokine gene expression in the PBMC after 72h of incubation by real time RT-PCR. The effect that could have been observed in cytokines secretion might have been mitigate by the long incubation. In addition, ELISA method is a direct measurement of the cytokine concentration present in the supernatant while the amount of RNA doesn't equal the amount of protein that is actually translated (Alberts B. et al, 2002; Al-Ali R. et al. 2016)

Inhibition of cytokine secretion was greater for polyunsaturated fatty acids than for saturated fatty acids. Similarly, studies have reported that polyunsaturated fatty acids were more effective inhibitors of rat lymphocyte functions than saturated fatty acids (Calder et al., 1990). Because phospholipids are the main component of the cell membrane (Nicolson, 2014), a change in the fatty acid composition alters its biophysical properties. Calder et al. (1994) showed that by adding fatty acids to the media, the fatty acid composition and the membrane fluidity were changed. They found that long chain saturated fatty acids decreased membrane fluidity while unsaturated fatty acids increased it. Calder and Willemsen (2016) have proposed that those changes in membrane fluidity could be responsible for the inhibition of lymphocyte functions. In support of this hypothesis, the regression analysis of our results has shown an inverse relationship between the melting point and the ability to inhibit IL-4 and INF- $\gamma$  secretion. Nevertheless, the inhibitory activity of conjugated linoleic acid, a polyunsaturated fatty acid with a relatively high melting point, was not clearly lower than that of linoleic acid,

which has the same chemical composition but a much lower melting point. Fan et al. (2003) showed that polyunsaturated fatty acids changed lipid raft composition, soluble membrane phospholipids and fatty acyl composition, which could lead to a modulation of T-cell activation. Lipid rafts are specialized plasma-membrane microdomains containing high concentrations of cholesterol and sphingolipid, and their polar lipids are predominantly formed of saturated fatty acyl residues (Martins de Lima et al., 2007). Lipid rafts are important in signal transduction pathways such as the T-cell receptor (TCR) pathway, which is indirectly involved in the regulation of T-cell functions like proliferation, differentiation, death and cytokine release. Therefore, a change in their composition could explain the negative effect of fatty acids observed on IL-4 and INF- $\gamma$  production. We also found that stearic and palmitic acids were potent inhibitors of proliferation but have less effects on the inhibition of cytokines secretions, indicating that although membrane fluidity may affect lymphocyte functions, other mechanisms are also probably involved.

We found a negative dose-dependent effect of all fatty acids, except lauric acid, on lymphoproliferation. Accordingly, Ster et al. (2012) showed that NEFA had a negative effect on lymphoproliferation, oxidative burst and interferon- $\gamma$  production. Additionally, Calder et al. (1990) studied the effect of different fatty acids on the proliferation of ConA-stimulated rat lymph node lymphocytes. They concluded that all tested fatty acids inhibited mitogen response and the extent of the inhibition was dependent on the fatty acid concentration. However, unlike Calder et al. (1990), we did not observe a link between the chain length or the saturation degree and the inhibitory activity of fatty acids on lymphoproliferation. Indeed, lymphoproliferation is inhibited by docosahexaenoic acid, a long polyunsaturated fatty acid, and by myristic acid, a short saturated fatty acid. Tsang et al. (1977) showed that the effect of fatty acids on lymphoproliferation differs between species. For example, in humans, there is no inhibition when cells are exposed to a mixture containing saturated and unsaturated fatty acids. In ewes, oleic, stearic and palmitic acids inhibit proliferation of PBMC, but linoleic and palmitoleic acids did not (Lacetera et al., 2002). Studies have shown that fatty acids can even stimulate the proliferation of phytohaemagglutinin-stimulated lymphocytes when using a combination of

palmitate and oleate in rats. Therefore, it was not unexpected that results obtained with bovine cells are different than those obtained previously with rodent and human cells.

Our results did not show that a specific class of fatty acids was more potent to inhibit lymphoproliferation, suggesting that other mechanisms may be involved. One possibility is activation of PPAR, a nuclear receptor that exist in three different isoforms,  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$ . Each isoform is differentially expressed in diverse tissues and cell types and regulates the transcription of genes implicated in metabolism, cell proliferation, differentiation inflammation control and immune responses (Le Menn and Neels, 2018). A large variety of ligands, including unsaturated fatty acids, lipids and lipid-like molecules are capable of binding the PPAR ligand-binding domain (Grygiel-Górniak, 2014). Peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  has notably been demonstrated to impair T-cell proliferation in humans and mice. Although there is no direct evidence that PPARs are involved in NEFA-induced inhibition of bovine lymphocyte functions, we found that docosahexaenoic acid and eicosapentanoic acid, two known natural ligands of PPAR- $\gamma$ , reduced lymphoproliferation in bovine cells.

The mechanisms causing immunodepression in cows during the periparturient period are diverse and complex. A better understanding of these mechanisms requires studies examining different parameters, such as immune function, fatty acid concentrations and time of exposure, all of which can impact the results. Indeed, we cannot clearly identify a class of fatty acid for its negative effect on every immune function tested. However, polyunsaturated class appears to be more detrimental, and the melting point seems to play a role. It is possible that changes in the physiological composition of the NEFA blood profile cause an imbalance, which then leads to immune function deficiencies. Overall, our study confirms that NEFA individually have a negative impact on the tested parameters and that their inhibitory effects on cytokine secretions increases with the degree of unsaturation.

### **3.4.7. Funding**

This research was financially supported by the Canadian Bovine Mastitis Research Network, Agriculture and Agri-Food Canada, Dairy Farmers of Canada, and the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (Ottawa, ON, Canada). Noémie Vanacker received a scholarship from Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada-CREATE on milk quality.

### **3.4.8. Acknowledgments**

The authors would like to thank the following people from Agriculture and Agri-Food Canada (Sherbrooke, QC, Canada): Catherine Thibault, Henrique Hooper, Clémence Bitu, Marie-Pascale Morin, Samantha Bennett and Samuel Lanctôt for providing technical assistance; Steve Méthot for helping with statistical analyses; and the dairy barn staff for taking care of the animals.

### **3.4.9. References**

Adewuyi, A., E. Gruys, and F. Van Eerdenburg. 2005. Non esterified fatty acids (NEFA) in dairy cattle. A review. *Vet. Quart.* 27:117-126.

Ruslan Al-Ali and Rogelio González-Sarmiento, 2016. Proximity of AUG sequences to initiation codon in genomic 5' UTR regulates mammalian protein expression. *Gene.* 594: 268-271, Issue 2.

Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, and Peter Walter. 2002. From RNA to Protein. *Molecular Biology of the Cell.* 4th edition. Garland Science, New York.

Calder, P. C., J. A. Bond, and E. A. Newsholme. 1990. Fatty acid inhibition of lipopolysaccharide-stimulated B lymphocyte proliferation. *Biochem. Soc. Trans.* 18:904-905.

Calder, P. C., J. A. Bond, S. J. Bevan, S. V. Hunt, and E. A. Newsholme. 1991. Effect of fatty acids on the proliferation of concanavalin A-stimulated rat lymph node lymphocytes. *Int. J. Biochem.* 23:579-588.

Calder, P. C. and L. E. M. Willemsen. 2016. Immunopharmacology of fatty acids. *Eur. J. Pharmacol.* 15:785:1.

Calder, P. C., P. Yaqoob, D. J. Harvey, A. Watts, and E. A. Newsholme. 1994. Incorporation of fatty acids by concanavalin A-stimulated lymphocytes and the effect on fatty acid composition and membrane fluidity. *Biochem. J.* 300:509-518.

Canadian Council on Animal Care. 1993. Guide to the care and use of experimental animals. Vol. 1. 2nd ed. E. D. Olfert, B. M. Cross, and A. A. McWilliam, ed. CCAC, Ottawa, ON, Canada.

Carbonneau, E., A. M. de Passillé, J. Rushen, B. G. Talbot, and P. Lacasse. 2012. The effect of incomplete milking or nursing on milk production, blood metabolites, and immune functions of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 95:6503-6512.

Contreras, G. A., W. Raphael, S. A. Mattmiller, J. Gandy, and L. M. Sordillo. 2012. Nonesterified fatty acids modify inflammatory response and eicosanoid biosynthesis in bovine endothelial cells. *J. Dairy Sci.* 95:5011-5023.

Fan, Y. Y., D. N. McMurray, L. H. Ly, and R. S. Chapkin. 2003. Dietary (n-3) polyunsaturated fatty acids remodel mouse T-cell lipid rafts. *J. Nutr.* 133:1913-1920.

Grygiel-Górniak, B. 2014. Peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands: nutritional and clinical implications--a review. *Nutr. J.* 14:13:17.

Hammon DS, Evjen IM, Dhiman TR, Goff JP, Walters JL. 2006. Neutrophil function and energy status in Holstein cows with uterine health disorders. *Vet Immunol Immunopathol.* 15;113(1-2):21-9.

Hostens, M., V. Fievez, J. L. Leroy, J. Van Ranst, B. Vlaeminck, and G. Opsomer. 2012. The fatty acid profile of subcutaneous and abdominal fat in dairy cows with left displacement of the abomasum. *J. Dairy Sci.* 95:3756-3765.

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

Lacetera N., O. Franci, D. Scalia, U. Bernabucci, B. Ronchi and A. Nardone, 2002. Effects of nonesterified fatty acids and  $\beta$ -hydroxybutyrate on functions of mononuclear cells obtained from ewes. *Am. J. Vet. Res.* 63, 414-418.

Lacetera N., D. Scalia, O. Franci, U. Bernabucci, B. Ronchi and A. Nardone, 2004b. Effects of nonesterified fatty acids on lymphocyte functions in dairy heifers. *J. Dairy Sci.* 87: 1012-1014.

Lacetera, N., D. Scalia, U. Bernabucci, B. Ronchi, D. Pirazzi, and A. Nardone. 2005. Lymphocyte functions in overconditioned cows around parturition. *J. Dairy Sci.* 88:2010-2016.

Le Menn, G. and J. G. Neels. 2018. Regulation of Immune Cell Function by PPARs and the Connection with Metabolic and Neurodegenerative Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 19:1575.

Leblanc, S. J., K. D. Lissemore, D. F. Kelton, T. F. Duffield, and K. E. Leslie. 2006. Major advances in disease prevention in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 89:1267-1279.

Leroy, J. L., P. Bossaert, G. Opsomer, and P. E. Bols. 2011. The effect of animal handling procedures on the blood non-esterified fatty acid and glucose concentrations of lactating dairy cows. *Vet. J.* 187:81-84.

Martins de Lima, T., R. Gorjão, E. Hatanaka, M. F. Cury-Boaventura, E. P. Portioli Silva, J. Procopio, and R. Curi. 2007. Mechanisms by which fatty acids regulate leucocyte function. *Clin. Sci. (Lond.)* 113:65-77.

McCarthy, M. M., S. Mann, D. V. Nydam, T. R. Overton, and J. A. McArt. 2015. Short communication: Concentrations of nonesterified fatty acids and beta-hydroxybutyrate in dairy cows are not well correlated during the transition period. *J. Dairy Sci.* 98:6284-6290.

Nicolson, G. L. 2014. The Fluid-Mosaic Model of Membrane Structure: still relevant to understanding the structure, function and dynamics of biological membranes after more than 40 years. *Biochim. Biophys. Acta* 1838:1451-1466.

Nonnecke, B. J., K. Kimura, J. P. Goff, and M. E. Kehrli, Jr. 2003. Effects of the mammary gland on functional capacities of blood mononuclear leukocyte populations from periparturient cows. *J. Dairy Sci.* 86:2359-2368.

Ollier, S., F. Beaudoin, N. Vanacker, and P. Lacasse. 2016. Effect of reducing milk production using a prolactin-release inhibitor or a glucocorticoid on metabolism and immune functions in cows subjected to acute nutritional stress. *J Dairy Sci.* 99:9949-9961.

Renner L, Kersten S, Duevel A, Schuberth HJ, Dänicke S. 2013. Effects of cis-9,trans-11 and trans-10,cis-12 conjugated linoleic acid, linoleic acid, phytanic acid and the combination of various fatty acids on proliferation and cytokine expression of bovine peripheral blood mononuclear cells. *Nutr.* 5(7), 2667-83.

Ster, C., M. C. Loiselle, and P. Lacasse. 2012. Effect of postcalving serum nonesterified fatty acids concentration on the functionality of bovine immune cells. *J. Dairy Sci.* 95:708-717.

Tsang, W. M., C. Weyman, and A. D. Smith. 1977. Effect of fatty acid mixtures on phytohaemagglutinin-stimulated lymphocytes of different species. *Biochem. Soc. Trans.* 5:153-154.

Vanacker, N., C. L. Girard, R. Blouin, and P. Lacasse. 2020. Effects of feed restriction and supplementary folic acid and vitamin B(12) on immune cell functions and blood cell populations in dairy cows. *Animal* 14:339-345.

Vanacker, N., S. Ollier, F. Beaudoin, R. Blouin, and P. Lacasse. 2017. Effect of inhibiting the lactogenic signal at calving on milk production and metabolic and immune perturbations in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 100:5782-5791.

Watts, J. S., P. Rezamand, D. L. Sevier, W. Price, and M. A. McGuire. 2013. Short-term effects of dietary trans fatty acids compared with saturated fatty acids on selected measures of inflammation, fatty acid profiles, and production in early lactating Holstein dairy cows. *J. Dairy Sci.* 96:6932-6943.



## **CHAPITRE 4**

### **EFFECT OF INTRAVENOUS LIPID INFUSION ON INSULIN RESISTANCE AND IMMUNE FUNCTIONS OF DAIRY COWS**

#### **4.1. Originalité du travail par rapport à la science**

Un défi majeur dans l'étude de l'impact de la concentration sanguine élevée en AGNE sur les fonctions immunitaires in vivo est de se libérer des effets confondants d'autres perturbations métaboliques induites par le bilan énergétique négatif et la gestation. Le développement d'un modèle animal pourra, en plus d'établir clairement l'impact des AGNE) sur le système immunitaire, permettre d'étudier différentes approches permettant de bloquer les effets de ceux-ci. Nous avons donc développé un nouveau modèle animal nous permettant d'augmenter la concentration en AGNE à des niveaux similaires à ceux observés en période péripartum sans modifier les autres facteurs biochimiques habituellement observés lorsque la vache est en balance énergétique négative.

#### **4.2. Contribution de l'auteure**

Pour cette étude j'ai réalisé la planification et la mise en place de la phase animale. Lors de ce projet, une grande partie du travail a été de mettre au point le dispositif d'infusion du gras sur les vaches. J'ai réalisé ces mises au point avec l'aide d'Henrique Barbosa Hooper (coauteur de l'article). Ensuite, j'ai aidé à la formation des autres membres du laboratoire aux dosages de phagocytose et de flambée oxydative. En effet, étant des dosages directs, toute l'équipe s'est mobilisée afin de m'appuyer lors des jours d'expérimentation. Catherine Thibault ainsi qu'Alison-May Deacon se sont principalement occupées des dosages en sang complet pendant qu'Henrique et moi étions à l'étable pour les infusions et les échantillonnages. Par la suite, j'ai réalisé avec l'aide de Catherine Thibault les essais de lymphoprolifération, et de sécrétion de

cytokines. Les dosages du glucose, des AGNE et du BHB ont été réalisés par Henrique Barbosa Hooper alors que Catherine Thibault s'est occupée de l'insuline. J'ai réalisé la compilation des données. Enfin, j'ai écrit l'article dont je suis la première auteure sous la supervision du Dr Pierre Lacasse.

### **4.3.Référence de l'article**

Article soumis au Journal of Dairy Science le 18 mai 2022.

### **4.4.Manuscrit de l'article**

#### **4.4.1. Interpretive Summary**

**Effect of intravenous lipid infusion on insulin resistance and immune functions of dairy cows.** *By Vanacker et al.* During the transition period, dairy cows often experience metabolic and immunological disturbances. Several evidences suggest that the decrease of immune functions is the result of an increase in blood non-esterified fatty acid (NEFA) concentration. Nevertheless, it is difficult to determine the exact effect of NEFA on the immune system as other metabolic and hormonal perturbations occur simultaneously during the transition period. In this study, the impact of NEFA was determined using an experimental model designed to assess its effects independently of energy balance and hormonal changes. The results confirm that NEFA causes immunological disturbances and suggest that they cause insulin resistance.

## LIPID EFFECT ON IMMUNE FUNCTIONS AND METABOLISM

**Effect of intravenous lipid infusion on biomarkers of insulin resistance and immune functions of dry and non-pregnant dairy cows.**

**Noémie Vanacker,<sup>1,2</sup> Henrique Barbosa Hooper,<sup>3</sup> Richard Blouin,<sup>2</sup> and Pierre Lacasse<sup>1,2\*</sup>**

<sup>1</sup> Sherbrooke Research and Development Centre, Agriculture and Agri-Food Canada, Sherbrooke, Québec, Canada J1M 0C8

<sup>2</sup> Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC, Canada J1K 2R1

<sup>3</sup> Centro Universitário Max Planck, Universidade de São Paulo, Leme, São Paulo, Brazil

\*Corresponding author: [pierre.lacasse@agr.gc.ca](mailto:pierre.lacasse@agr.gc.ca)

#### 4.4.2. Abstract

During the transition period, dairy cows often experience negative energy balance, which can induce metabolic and immunological disturbances. Previous work has shown that there is a relationship between the dysfunction of immune cells and the increase in blood non-esterified fatty acid (NEFA) concentration. Nevertheless, it is difficult to determine the exact effect of NEFA on the immune system as other metabolic and hormonal perturbations occur simultaneously during the transition period. In the present study, we have determined the impact of NEFA on immune functions using an experimental model designed to assess its effects independently of energy balance, as well as hormonal and metabolic changes due to parturition. Six dry and non-pregnant cows were infused with either sterile water (control treatment) or a lipid emulsion (Intralipid<sup>®</sup> 20%, lipid treatment) at a rate of 1 mL/kg/h for 6h according to a Cross-over design. Blood concentrations of NEFA,  $\beta$ -hydroxybutyrate (BHBA), and glucose were measured every hour throughout the infusion period, and 1h and 18h after the end of infusion. Proliferation and interferon- $\gamma$  secretion of lymphocytes, phagocytosis, and oxidative burst of neutrophils and blood insulin concentration were evaluated before, during, and at the end of the infusion. For NEFA, BHBA, and glucose, treatment\*time interactions were present. When compared to the control condition, NEFA and BHBA levels were greater in the plasma of cows infused with lipids from 1h after the start of infusion until 1h after the end of infusion. Glucose level also increased in response to lipid infusion from 2h of infusion until 1h after the end of treatment. For sterile water and lipid infusions, respectively, maximal concentrations were  $0.06 \pm 0.10$  mM and  $1.39 \pm 0.10$  mM for NEFA,  $0.70 \pm 0.05$  mM and  $1.06 \pm 0.05$  mM for BHBA, and  $4.56 \pm 0.27$  mM and  $6.90 \pm 0.27$  mM for glucose. For all blood metabolites, there were no differences between treatments 18h post-infusion. Lipid infusion significantly increased blood insulin concentration at 3h and 6h of infusion. However, it returned to its basal concentration 24h after the end of the infusion. Lymphoproliferation declined as early as 3h after the start of the lipid infusion. At 3h and 6h of infusion, lipid treatment significantly reduced INF- $\gamma$  concentration in the culture cell supernatant. The lipid infusion did not affect neutrophil phagocytosis. Nevertheless, the efficacy of the response was

impacted by a reduction of neutrophils' oxidative burst. These results confirm that NEFA inhibits immune functions independently of energy balance and other changes that occur during the transition period. They also indicate that high blood lipid concentration causes insulin resistance.

Key words: energy balance, lymphocyte, neutrophil, glucose, immunosuppression.

#### **4.4.3. Introduction**

It is known that during the periparturient period, cows are at high risk of developing health problems. Indeed, 75% of diseases occur in the first month following calving and 36% of deaths in the 60 days following parturition (Leblanc et al., 2010). Cows undergo physiological and endocrine changes and experience a negative energy balance state (**NEB**). The mobilization of body reserves to meet the energy needs required for milk production leads to an increase in blood non-esterified fatty acid (**NEFA**) concentration. Previous work has shown a relationship between the dysfunction of lymphocytes after calving and the increase in the concentration of NEFA in the blood (Carbonneau et al., 2012; Vanacker et al., 2017). Other studies have also shown that the addition of NEFA to cell culture media inhibits the functions of both neutrophils and lymphocytes (Ster et al., 2012; Vanacker et al., 2022). These suggest a causative relationship between the inhibition of immune functions and the increase in blood NEFA concentrations during the peripartum period.

During the periparturient period, cows also experienced insulin resistance. Insulin is required for glucose uptake into most peripheral tissues, such as adipose tissue, liver, and muscle, but not the mammary gland and the gravid uterus (De Koster and Opsomer, 2013). Therefore, this targeted insulin resistance can be considered as a homeorhetic adaptation to ensure a sufficient supply of glucose is provided to the growing offspring before and after birth (Bell and Bauman, 1997). However, a strong insulin resistance that lasts over time is detrimental to cow health as it can lead to a more widespread mobilization of NEFA as a primary source of energy for other

tissues (Bell and Bauman, 1997). As a result, the concentration of NEFA in blood increases, bringing with it a higher risk of health issues such as ketosis, abomasal displacement, hepatolipidosis, and impaired ovulation cycle (Bossaert et al., 2008). Although insulin resistance is linked to obesity and can be induced by lipid infusion in lean humans (Liang et al., 2018), the etiology of this phenomenon in cows remains unclear.

In a recent review, Horst et al. (2021) questioned the hypothesis that fatty acids are responsible for the immune deficiencies and insulin resistance observed during the periparturient period. Indeed, they believe that most of the studies conducted on this topic point too quickly to a cause-and-effect relationship between NEFA concentrations at parturition and immune dysfunction. Horst et al. (2021) propose an alternative explanation in which systemic inflammation is responsible for the immune dysfunction and poor health status of periparturient dairy cows. According to this explanation, the high NEFA and BHB concentrations are a consequence, and not the cause, of the problem.

Our hypothesis is that the increase in blood NEFA concentration observed during the transition period is at least partially responsible for the immune dysfunction and insulin resistance associated with that period. The aim of this study was to determine the effect of increasing blood NEFA concentration on metabolism, immunity, and insulin resistance independently of hormonal, environmental, and physiological changes as well as of NEB occurring during the peripartum period.

#### **4.4.4. Materials and Methods**

##### ***4.4.4.1. Animals and Experimental Procedures***

The study was conducted in accordance with the guidelines of the Canadian Council on Animal Care (1993), and the experimental protocol was approved by Sherbrooke Research and Development Centre animal care committee (#542). Six healthy, non-pregnant Holstein cows housed at Agriculture and Agri-Food Canada's Sherbrooke Research and Development Centre

(Sherbrooke, QC, Canada) were used (descriptive statistics of the cows are available in Supplemental Table S1). The cows were dried off at least 2 weeks before the experiment. The cows were fed a TMR containing (on a DM basis) 75.5% dry hay, 9.1% corn silage, 10.2% soybean meal, 3.5% beet pulp, 0.4% urea, and 1.3% mineral supplement. The TMR contained (on a DM basis) 12.4% CP, 35.7% ADF, 55.9% NDF, 0.6% of Ca, 0.3% of P, and provided 1.20 Mcal/kg of NE<sub>L</sub>. Cows were infused with either sterile water (control treatment) or a lipid emulsion (Intralipid© 20%, Fresenius Kabi, lipid treatment) at a rate of 1 mL/kg/h for 6h according to a Cross-over design. The dose was determined during preliminary assays to induce an increase in blood NEFA concentration of similar magnitude to that found in early postpartum period. There was a 68h interval between the 2 infusion periods.

The cows were infused through 2 catheters placed in each jugular vein 4 days before the first infusion. Prior to insertion of the catheter, the skin was shaved and disinfected, first with 70% ethanol and then with 10% iodine. All catheter and infusion parts were previously gas sterilized (Andersen Sterilizers, Inc). The part of the catheters that was inserted into the jugular vein via a sterile 12 G trocar was a 22 cm silastic tube (size 0.040 inches ID x 0.085 inches OD, VWR). This tube was connected to a removable connector for silicone catheter (1.2 x 2.0 mm, Vygon), which was attached to the cow's skin with 2 stitches (Supramid #2, CDMV Inc.). As the infusion was scheduled for 4 days after, 2 cc of heparin at a concentration of 500 UI was pushed through the connector prior to closing in order to clean blood from the tube and avoid clotting. The device was then covered with sterile gauze and held in place with Elastoplast (CDMV Inc.) wrapped around the neck of the cow until the day of infusion.

The day of the infusion, the catheters were checked to ensure that they were still in place and functional. An extension made of flexible plastic tubing (Tygon® 0.040 inches ID x 0.070 inches OD, VWR) was then connected to the catheter via a male-to-male Luer-lock system (V-893.00-R0, SURGI-PHARM) using a truncated 19G needle as a connector. A larger piece of tubing (Masterflex Tygon E-Lab, E-3603, Pump Tubing, L/S 16, Cole-Parmer) was placed in a sterile glass bottle containing either sterile water or Intralipid through a typical 25 mL plastic serological pipette in order to keep it straight and in place. This tube was then coupled to a peristaltic pump (Masterflex L/S TM, model 75-19-15 cartridge pump from Cole-Parmer) and

connected to the smaller tubing, which was connected to the catheter via another male-to-male Luer-lock system using a truncated 19G needle as a connector. The flow rate was adjusted prior to beginning infusion by calculating the volume that was pumped into a 15 mL Falcon tube over a period of 30 seconds.

#### ***4.4.4.2. Blood Collection***

Blood samples were collected from one of the jugular catheter. Blood samples were taken just before the beginning of the infusion (h0) and every hour during the infusion (h1 to h6). Two other blood samples were taken 1h (h7) and 18h (h24) after the end of the infusion. Samples were collected in EDTA-coated Vacutainer tubes (Becton-Dickinson) for metabolites and insulin determinations, in heparin-coated Vacutainer tubes for the phagocytosis and oxidative burst assays, and in uncoated tubes for the serum preparation required for the peripheral blood mononuclear cell (**PBMC**) proliferation and cytokine secretion assays.

#### ***4.4.4.3. Blood Metabolite Assays***

Plasma BHB and NEFA concentrations were evaluated with a BHB reagent kit (Pointe Scientific Inc.) and an enzymatic colorimetric method using a Randox kit (Randox Laboratories Limited), respectively. Both of these methods are described by Vanacker et al. (2020); however, the two incubation times were increased to 10 minutes for the NEFA assay. Absorptions were read using a SpectraMax 250 microplate reader (Molecular Devices). The intra-assay Cv and inter-assay CV were respectively 3.63%, 3.45% for BHB, 3.48% and 5.41% for NEFA and 1.33% and 0.94% for glucose.

#### ***4.4.4.4. Blood Insulin Assay***

Plasma insulin concentration was measured by ELISA with an insulin reagent kit (Merckodia), according to the manufacturer's instructions. Samples above the upper detection limit were



diluted at a rate of ½. Absorptions were read using a SpectraMax 190 microplate reader (Molecular Devices). The intra-assay CV% was 1.62% and the inter-assay CV was 2.63%.

#### ***4.4.4.5. Polymorphonuclear Leukocyte Phagocytosis and Oxidative Burst Assays***

The phagocytosis assay was performed in whole blood by flow cytometry using BioParticles Conjugated for Phagocytosis (Life Technologies Inc), as described by Vanacker et al. (2017). The oxidative burst assay was also performed in whole blood by flow cytometry, as described by Vanacker et al. (2017).

#### ***4.4.4.6. Peripheral Blood Mononuclear Cell Isolation***

To assess the effect of the serum from the treated cows on PBMC proliferation, PBMCs were isolated from the jugular blood of 4 healthy lactating donor cows not included in the experiment. The blood was collected in EDTA-coated Vacutainer tubes. Isolation of PBMC was performed as described by Vanacker et al. (2017b).

#### ***4.4.4.7. Peripheral Blood Mononuclear Cell Proliferation Assay***

To assess the effect of the serum from the treated cows on PBMC proliferation, PBMC isolated from 2 healthy cows were incubated for 72 h with 7.5% sera sampled at h0, h3, or h6 from each cow in a 96-well plate ( $1 \times 10^5$  cells per well) at 38.5°C as described by Ollier et al. (2016), except that the sera were not decomplemented. For each serum tested, the PBMC of 3 wells were incubated with Concanavalin A (Sigma-Aldrich) at 1 µg/mL, and the PBMC of another 3 wells were incubated without the mitogen as a negative control. The assay was repeated for each cell donor cow. For the immune parameters (lymphoproliferation, phagocytosis and oxidative burst), we used the same controls as described by Vanacker et al., (2017).

#### ***4.4.4.8. Interferon- $\gamma$ Production***

To assess the effect of the lipid infusion on PBMC cytokine secretion, isolated PBMC from the 4 healthy cows were incubated with sera (7.5%) collected from experimental cows at h0, h3, and h6. They were stimulated with Concanavalin A at a concentration of 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and incubated in a 24-well plate ( $1.2 \times 10^6$  cells per well) at 38.5°C with 5% CO<sub>2</sub> for 24 h. This was done in duplicate. The supernatant was collected by pooling the two wells with the same condition and then stored at -80°C until measurement. Supernatant INF- $\gamma$  cytokine content was determined using a commercial kit, Bovine Interferon- $\gamma$  specific ELISA Assay Kit (Bio-Rad, Life science group), in accordance with the manufacturer's instructions. Preliminary assays were first performed to determine the optimal dilution of the supernatant. The dilutions varied between 1/12 and 1/25 depending on the donor cow. For INF- $\gamma$  determination the quality control pool had to be diluted at a rate of 1/2, the intra-assay CV was 1,30 and inter-assay CV was 9,20%.

#### ***4.4.4.9. Statistical Analysis***

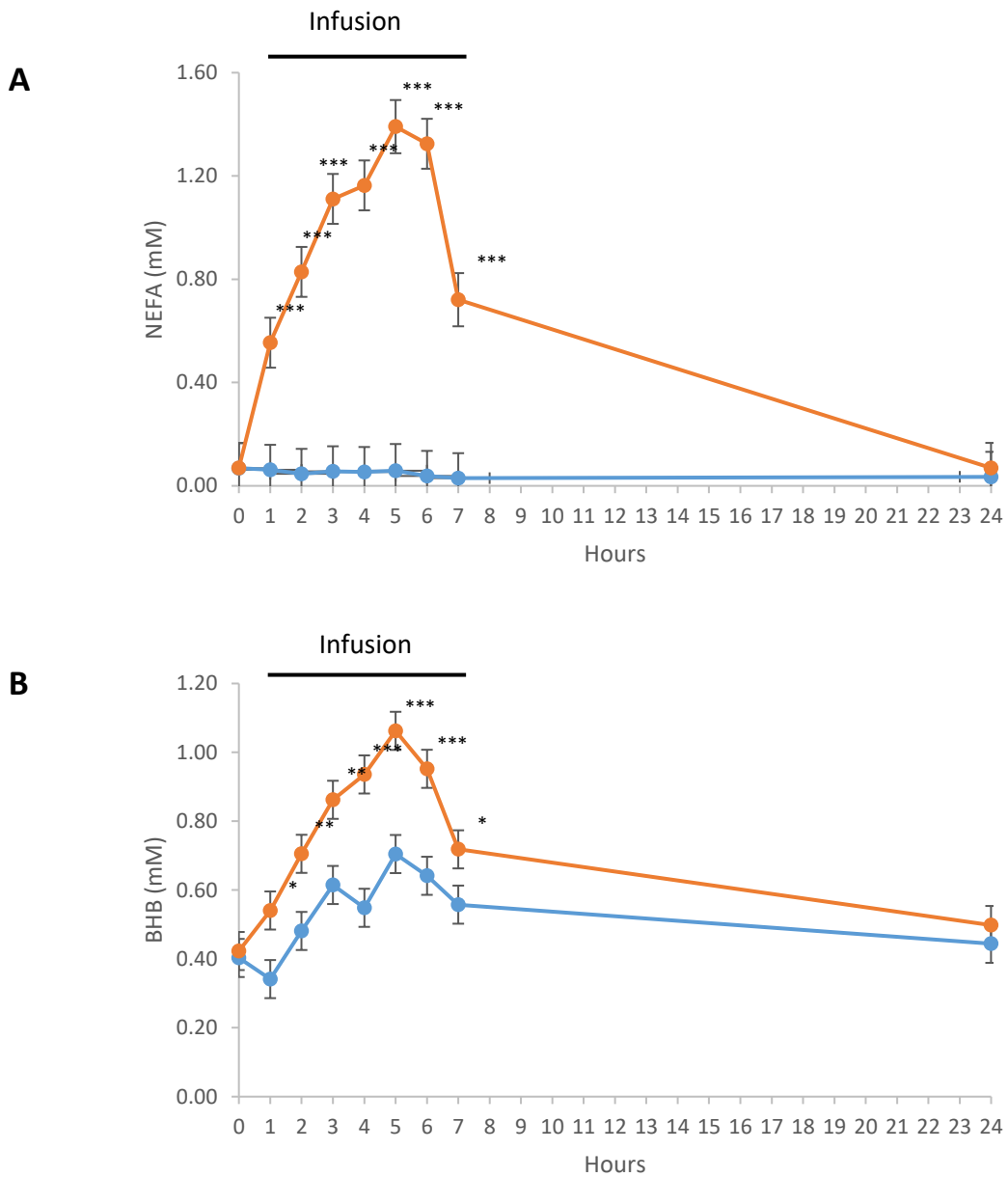
Data were analyzed by ANOVA as a Cross-over design using the MIXED procedure of the SAS software package (SAS Institute Inc.). For most variables, the model included the fixed effect of treatments, sampling time, sampling day (period), block and treatment\*time interaction. Sampling time was used as a repeated effect, and animal(treatment) was used as the subject. For PBMC's function parameters, the model included the fixed effect of treatments, sampling time, sampling day (period), block and the cell donor cows and treatment\*time, treatment\*donor and treatment\*donor\*time interactions. Sampling time was used as a repeated effect and animal(treatment\*donor) was used as the subject. The statistical model assumes (1) independence of observations, (2) normal distribution of the log<sub>10</sub> transformed data, and (3) homogeneity of variance. When multiple comparisons were made, the TUKEY adjustment was used. When significant, the value before the start of the infusion

was used as a covariable. Differences were considered statistically significant when  $P < 0.05$  and were considered a trend when  $P < 0.10$ .

#### **4.4.5. Results**

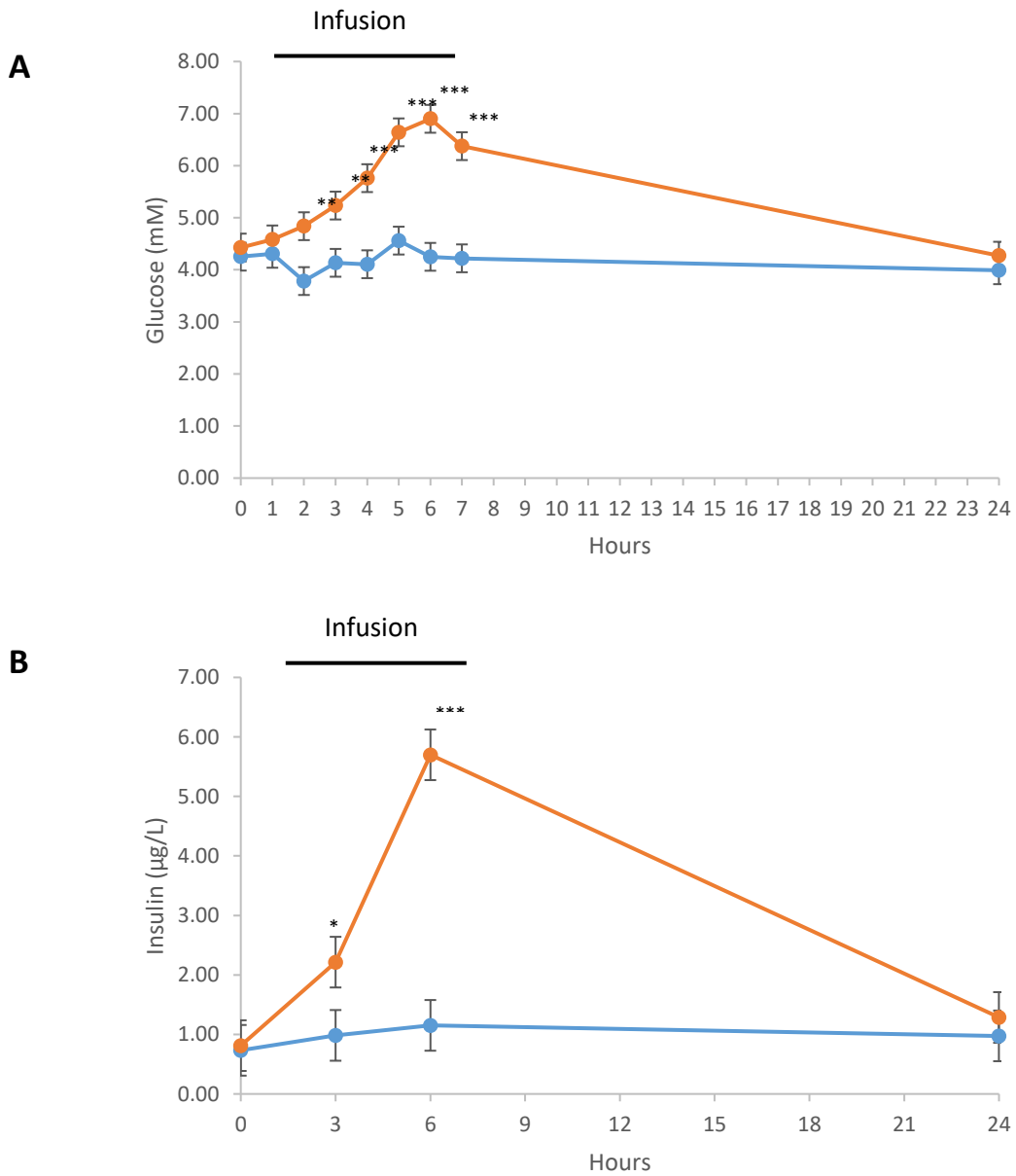
##### ***4.4.5.1. Blood metabolite assays***

Lipid infusion caused a gradual increase in blood NEFA (treatment\*time  $P < 0.001$ , Figure 19A), BHB (treatment\*time  $P = 0.03$ , Figure 19B), and glucose (treatment\*time  $P < 0.001$ , Figure 20A) concentrations. Concentrations of NEFA and BHB were already higher after 1 h ( $P < 0.001$ ) of lipid infusion, while that of glucose was higher after 2 h of lipid infusion. All metabolites reached a peak after 5 h, and their concentration decreased beginning at the end of the infusion. No significant difference was observed between the treatment and control 18 h after the end of the infusion (NEFA,  $P = 0.8$ ; BHB,  $P = 0.5$ ; glucose,  $P = 0.4$ ).



**Figure 19. Blood concentration of NEFA (panel A) and BHB (panel B) in cows infused with a lipid solution (Intralipid<sup>®</sup> 20% 1 ml/kg/h; orange line; n = 6) or sterile water (control; blue line; n = 6) for 6h.**

\*\*\*  $P \leq 0.001$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*  $P \leq 0.05$ . Data presented as LSM  $\pm$  SEM.



**Figure 20. Blood concentration of glucose (panel A) or insuline (panel B) in cows infused with a lipid solution (Intralipid© 20% 1 ml/kg/h; orange line; n = 6) or sterile water (control; blue line; n = 6) for 6h.**

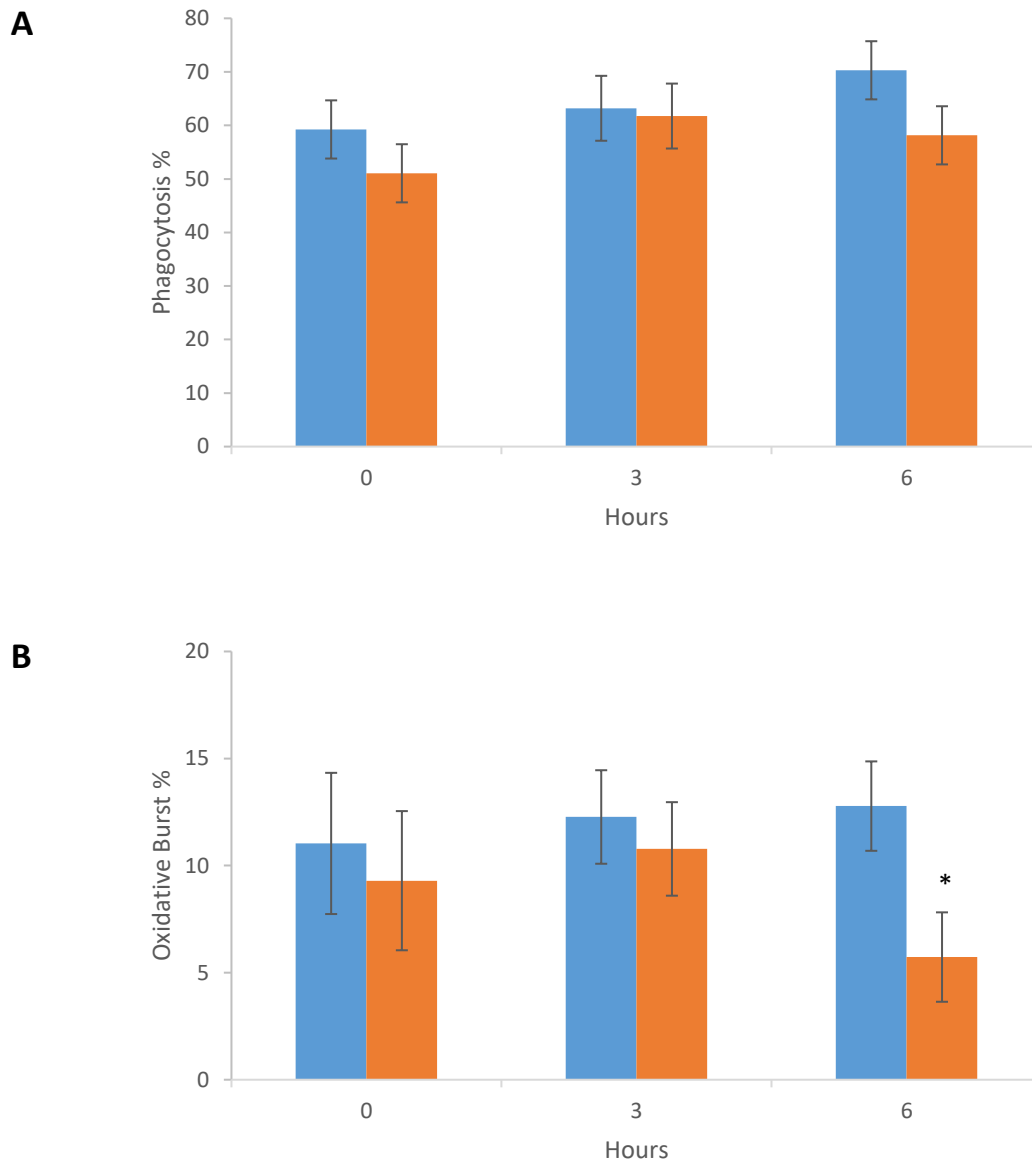
\*\*\*  $P \leq 0.001$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*  $P \leq 0.05$ . Data presented as LSM  $\pm$  SEM.

#### ***4.4.5.2. Blood Insulin***

Lipid infusion also caused a gradual increase in blood insulin concentration (treatment\*time  $P < 0.001$ , Figure 20B). Blood insulin concentration increased after 3h of lipid infusion ( $P = 0.05$ ) and was 5 times greater after 6h of infusion ( $P < 0.001$ ). At 18 h after the end of the infusion, blood insulin concentration was no longer elevated ( $P = 0.6$ ).

#### ***4.4.5.3. Polymorphonuclear Leukocyte Phagocytosis and Oxidative Burst Assays***

The percentage of phagocytic neutrophils was not affected ( $P = 0.15$ , Figure 21A). The percentage of PMN producing an oxidative burst when stimulated with Phorbol 12-myristate 13-acetate was lower ( $P = 0.02$ , Figure 21B) during lipid infusion. However, the amount of reactive oxygen species produced was not affected by the treatments ( $P = 0.4$ , data not shown).

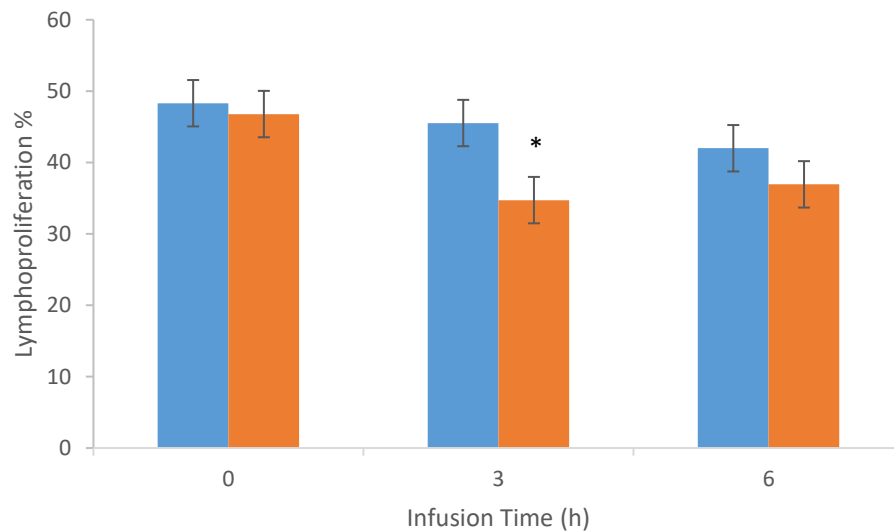


**Figure 21. Percentage of polymorphonuclear cells positive for phagocytosis (panel A) and oxidative burst (panel B) assayed from the blood of cows infused with a lipid solution (Intralipid© 20% 1 ml/kg/h; orange bars; n = 6) or sterile water (control; blue bars; n = 6) for 6h.**

Data presented as LSM ± SEM. \* P ≤ 0.05

#### 4.4.5.4. Peripheral Blood Mononuclear Cell Proliferation and Interferon- $\gamma$ Production

Incubation of PBMC with sera harvested during the infusion affected lymphoproliferation (treatment\*time  $P = 0.005$ , Figure 22). Lymphoproliferation was decreased ( $P = 0.02$ ) after 3h, but not after 6h ( $P = 0.27$ ) of lipid infusion.

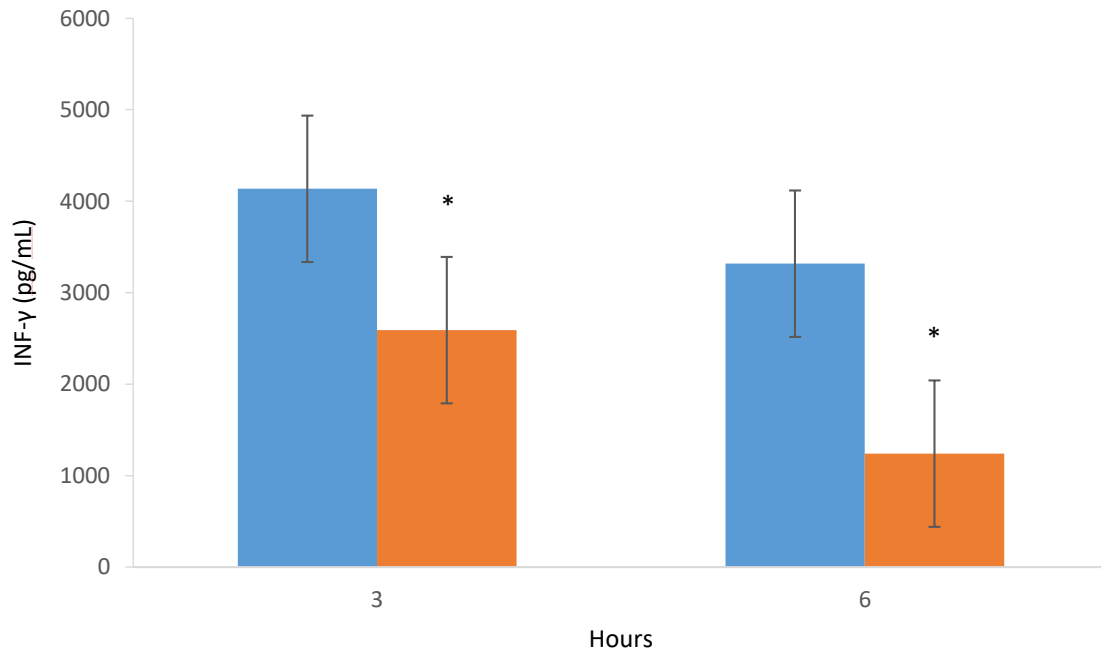


**Figure 22. Percentage of proliferative peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from two donors cows incubated with the sera of cows infused with a lipid solution (Intralipid© 20% 1 ml/kg/h; orange bars; n = 6) or sterile water (control; blue bars; n = 6) for 6h.**

\*  $P \leq 0.05$ . Data presented as LSM  $\pm$  SEM.

Incubation of PBMC with sera harvested during the lipid infusion decreased ( $P = 0.03$ ) secretion of INF- $\gamma$  (Figure 23).





**Figure 23. Concentration of INF- $\gamma$  in the culture cell supernatant of PBMC from four donors cows incubated with sera of cows infused with a lipid solution (Intralipid© 20% 1 ml/kg/h; orange bars; n = 6) or sterile water (control; blue bars; n = 6) for 6h.**

\*  $P \leq 0.05$ . Data presented as LSM  $\pm$  SEM

#### **4.4.6. Discussion**

This study was aimed at evaluating the effect of a lipid infusion on blood metabolites and immune function of dairy cows. The experiment was designed in order to mimic the blood metabolites profile of periparturient cows independently of the NEB, hormonal changes, and other physiological changes occurring during the periparturient period. The experiment was carried-out in non-lactating cows for practical reasons and this could be considered a limitation of this study.

When infused with the lipid, blood NEFA concentration increased and reached a peak of 1.39 mM after 5h of infusion. The week before parturition, NEFA concentrations are around 0.5 to 1.0 mM and reach concentrations of around 0.8–1.2 mM the day of the parturition. Indeed, NEFA concentrations at the end of the infusion period are comparable to what is observed in high-yielding cows after parturition. Infusion of lower doses of lipids to dry (Pires et al., 2007; Caixeta et al., 2017) or lactating (Chelikani et al., 2003; Lamp et al., 2018) cows also increased, albeit to a lesser degree, the concentration of NEFA. The increase in NEFA concentration was sufficient, as in the transition period, to saturate the liver's capacity to completely oxidize the acetyl CoA generated by the  $\beta$ -oxidation of fatty acids, as shown by the increase of BHB. Blood ketone bodies increases when the amount of fatty acids taken by the liver exceed its capacity to completely oxidize or esterified them. In our experiment, blood BHB concentrations increased from the beginning of the infusion, with a peak at 5h of infusion and a concentration of 1.06 mM. Cows with a BHB concentration above 1.2 mM are considered to be in a state of hyperketonemia (Duffield, 2000; McArt et al., 2013; Shin et al., 2015). Although Chelikani et al. (2003) reported that BHB increased within 3h of lipid infusion, Caixeta et al. (2017) reported only a trend, while Lamp et al. (2018) reported no increase in BHB concentration. The variability of results between the lactating cows appears to be related to energy balance, as the increase in BHB was greater in cows in early lactation compared to those in late lactation (Chelikani et al., 2003). However, in the present study as well as in the study by Caixeta et al. (2017), the different responses are most likely related to the dose of lipids infused, as the cows were neither lactating nor gestating.

Increased NEFA and BHB blood concentrations are believed to play a key role in periparturient immune dysfunction (Hammon et al, 2006; Duffield et al.,2009; Leblanc, 2010; Ster et al, 2012). Since the infusion of lipids was able to increase the levels of these two metabolites to concentrations comparable to those found in the blood of periparturient cows, we can conclude that the animal model we have developed is representative of the metabolic profile of periparturient cows. Thus, our model would be suitable for testing approaches aimed at reducing peripartum immune dysfunction and metabolic dysfunctions caused by the rise of

blood NEFA and BHB concentrations independently of hormonal, environmental, and physiological changes, and NEB occurring during the peripartum period.

Lymphoproliferation and INF- $\gamma$  production decreased in PBMC incubated with sera collected after 3h of lipid infusion. Carbonneau et al. (2012), Ster et al. (2012), and Vanacker et al. (2017) observed that serum collected during the peripartum period had a negative effect on PBMC proliferation and that this effect was correlated with the serum's NEFA and BHB content. Supplementation of cell culture media with NEFA and/or BHB has shown that low concentrations of NEFA led to a drastic decrease in proliferation, whereas only high concentrations of BHB affected proliferation (Ster et al., 2012). In the same study, adding NEFA to serum collected at 61 DIM to reach the level present in 5 DIM serum decreased proliferation to the level observed with 5 DIM serum while a similar supplementation with BHB had no effects. Accordingly, other studies reported that high NEFA concentrations inhibited the proliferation of ovine (Lacetera et al., 2002) and bovine PBMC (Lacetera et al., 2004). The production of INF- $\gamma$  was decreased in PBMC collected during the peripartum period (Loiselle et al., 2009) as well as in PBMC incubated with serum collected during this same period (Ster et al., 2012). As for proliferation, INF- $\gamma$  secretion also decreased as the NEFA concentration in the medium increased (Lacetera et al., 2004; Ster et al., 2012). Therefore, impairment of PBMC functions during the transition period appears to be related to the increase in blood NEFA concentration.

Infusion did not produce any observable effect on PMN phagocytosis, but the number of PMN able to produce an oxidative burst was reduced by lipid infusion. Kehrli et al. (1989) reported that PMN functions are impaired during the peripartum period. Hammon et al. (2006) also reported that high NEFA blood concentrations after parturition were associated with decreased PMN functions. Nevertheless, the increased PMN demand during this period results in the rapid mobilization of bone marrow PMN and an increase in the proportion of immature PMN in circulation. However, this cannot explain the results of the present study, since cows were dry and not gestating. In vitro, the presence of high concentrations of NEFA was shown to adversely affect oxidative burst of PMN, but the concentrations of NEFA required were much greater (Ster et al., 2012). This finding suggests that PMN are less sensitive to NEFA than are

PBMC, but as shown by our results, PMN may nevertheless be affected by the very high NEFA levels reached in the early postpartum period.

The lipid infusion caused an exponential increase in blood glucose concentration, despite an increase in insulin concentration. Although we have not performed a glucose tolerance test, this suggests the establishment of insulin resistance, since the increase in insulin secretion observed in response to lipid treatment does not translate to a reduction of glucose level. Insulin resistance is commonly observed during the peripartum period; nevertheless, glucose concentration remains low (De Koster and Opsomer, 2013). Although peripheral tissues become insulin resistant, this is not the case for the mammary tissue, which allow the utilization of glucose by the mammary gland for milk production (De Koster and Opsomer, 2013). In the present experiment, the absence of demand for milk production allows an increase of glucose in the circulation. Accordingly, although intravenous infusion of lipids increased insulin without increasing glucose concentration in lactating cows (Chelikani et al., 2003; Caixeta et al., 2017), it increased both insulin and glucose in dry cows (Pires et al., 2007). In the latter study, insulin resistance was confirmed by an intravenous glucose tolerance test. In humans, obesity is a well-known cause of insulin resistance. Therefore, this suggest that the insulin resistance around parturition in dairy cows traces its origins to the increase in the concentration of NEFA. The exact mechanism by which NEFA induce insulin resistance in dairy cows is still unclear, but it surely involves decreased insulin sensitivity in peripheral tissue and has some characteristics in common with type 2 diabetes in humans (Youssef and El-Ashker, 2017). In lean non-diabetic human subjects, infusion of a low dose of lipids induces insulin resistance and a pro-inflammatory response (Liang et al., 2018). These authors also reported that the infusion of lipids up-regulated Toll-like receptor-4 (TLR4) levels and downstream signaling in monocytes. TLR4 mediates LPS-induced inflammatory response (Chow et al., 1999); however, fatty acids are also potent activators of this receptor (Shi et al., 2006). In bovine adipose tissue explants, LPS induces insulin resistance (Chirivi et al., 2022); suggesting that the TLR4 pathway is part of the mechanism by which insulin resistance is induced in dairy cows.

In a recent review, Horst et al. (2021) argued against the view that an increase of NEFA is responsible for the immune dysfunction observed in dairy cows during the periparturient period. They hypothesized that immune dysfunction stems from traumas to the uterus, mammary gland, and gastrointestinal tract and which allow the transfer of pathogen-associated molecular patterns (such as LPS) and damage-associated molecular patterns, which would be at the origin of the systemic inflammation that naturally occurs during this period. Thus, increased NEFA, hyperketonemia, and hypocalcemia are homeorhetic adaptations to parturition. Horst et al. (2021) based their hypothesis on the fact that most studies concerning the effect of NEFA on immune function are either *in vitro* studies or examine the association between blood metabolites concentrations and transition cow problems instead of looking for a cause-and-effect relationship using a controlled environment. However, in the present experiment, inflammation or adaptation to parturition was ruled out, given that cows were in a stable physiological state and that the Cross-over design makes it possible to control for individual variations. Accordingly, intravenous infusion of lipids to steers decreases the cortisol and interleukin-6 response to an LPS challenge (Sanchez et al., 2015). We also observed decreased PBMC proliferation and cytokine secretion when NEB and high NEFA concentrations were induced by feed restriction (Ollier et al., 2014; Ollier et al., 2016). Again, these results support the hypothesis that NEFA are immunosuppressive in dairy cows and that this effect is independent from the NEB or physiological changes. Although we cannot rule out that trauma-induced systemic inflammation is immunosuppressive, its contribution is likely small, since the removal of the mammary gland considerably reduced the impact of calving on the number of immune cells and their associated functions (Kimura et al., 1999; Kimura et al., 2002; Nonnecke et al., 2003). Nevertheless, metabolic stress in the postpartum period is associated with an up-regulation of inflammatory pathways (Mann et al., 2019). These authors also reported that calving and metabolic stress were associated with an up-regulation of Toll-like receptor signaling, including TLR4 signaling in particular. Therefore, systemic inflammation may indeed be an important immunosuppressive factor, but this may be more of a response to high NEFA levels than to traumas.

In conclusion, the results of this study support the hypothesis that NEFA induces immune cell dysfunction independently of energy balance and other changes occurring during the transition period. They also suggest that high blood lipid concentration causes insulin resistance. Therefore, strategies that limit the rise of the NEFA concentration during the transition period might be helpful to limit immune dysfunctions and insulin resistance.

#### **4.4.7. Fundings**

This research was financially supported by the Canadian Bovine Mastitis Research Network (St-Hyacinthe, QC, Canada), Agriculture and Agri-Food Canada (Ottawa, ON, Canada), Dairy Farmers of Canada (Ottawa, ON, Canada), and the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (Ottawa, ON, Canada). Noémie Vanacker received a scholarship from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada-CREATE on milk quality.

#### **4.4.8. Acknowledgments**

The authors would like to thank the following people from Agriculture and Agri-Food Canada (Sherbrooke, QC, Canada): Catherine Thibault and Alison-May Deacon for providing technical assistance, and the dairy barn staff for taking care of the animals. The authors have not stated any conflicts of interest. The authors are grateful to Wingshun Pang, from the Translation Bureau, Public Services and Procurement Canada, for her careful editing of this manuscript.

#### 4.4.9. Declaration of interest

The authors declare having no conflict of interest.

#### 4.4.10. References

Bell, A. W., and Bauman, D. E. 1997. Adaptations of glucose metabolism during pregnancy and lactation. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia.* 2:265–278. <https://doi.org/10.1023/a:1026336505343>

Bossaert, P., Leroy, J. L., De Vliegher, S., and Opsomer, G. 2008. Interrelations between glucose-induced insulin response, metabolic indicators, and time of first ovulation in high-yielding dairy cows. *J. Dairy Sci.* 91:3363–3371. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-0994>

Caixeta, L. S., S. L. Giesy, C. S. Krumm, J. W. Perfield, A. Butterfield, K. M. Schoenberg, D. C. Beitz, and Y. R. Boisclair. 2017. Effect of circulating glucagon and free fatty acids on hepatic FGF21 production in dairy cows. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 313:R526–R534. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00197.2017>

Canadian Council on Animal Care. 1993. Guide to the Care and Use of Experimental Animals. Vol. 1. 2nd ed. E. D. Olfert, B. M. Cross, and A. A. McWilliam, eds. CCAC.

Carbonneau, E., A. M. de Passillé, J. Rushen, B. G. Talbot, and P. Lacasse. 2012. The effect of incomplete milking or nursing on milk production, blood metabolites, and immune functions of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 95:6503–6512. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5643>

Chelikani, P. K., D. H. Keisler, and J. J. Kennelly. 2003. Response of plasma leptin concentration to jugular infusion of glucose or lipid is dependent on the stage of lactation of Holstein cows. *J. Nutr.* 133:4163–4171. <https://doi.org/10.1093/jn/133.12.4163>

Chirivi, M., C. J. Rendon, M. N. Myers, C. M. Prom, S. Roy, A. Sen, A. L. Lock, and G. A. Contreras. 2022. Lipopolysaccharide induces lipolysis and insulin resistance in adipose tissue from dairy cows. *J. Dairy Sci.* 105:842–855. <https://doi.org/10.3168/jds.2021-20855>

- Chow, J. C., D. W. Young, D. T. Golenbock, W. J. Christ, and F. Gusovsky. 1999. Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. *J. Biol. Chem.* 274:10689–10692. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.16.10689>
- De Koster, J. D., and G. Opsomer. 2013. Insulin resistance in dairy cows. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 29:299–322. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2013.04.002>
- Duffield, T. 2000. Subclinical ketosis in lactating dairy cattle. *Vet. Clin. North. Am. Food Anim. Pract.* 16:231–53. [https://doi.org/10.1016/s0749-0720\(15\)30103-1](https://doi.org/10.1016/s0749-0720(15)30103-1)
- Duffield, T. F., K. D. Lissemore, B. W. McBride, and K. E. Leslie. 2009. Impact of hyperketonemia in early lactation dairy cows on health and production. *J. Dairy Sci.* 92:571–580. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1507>
- Hammon, D. S., I. M. Evjen, T. R. Dhiman, J. P. Goff, and J. L. Walters. 2006. Neutrophil function and energy status in Holstein cows with uterine health disorders. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 113:21–29. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2006.03.022>
- Horst, E. A., S. K. Kvidera, and L. H. Baumgard. 2021. *Invited review*: The influence of immune activation on transition cow health and performance—A critical evaluation of traditional dogmas. *J. Dairy Sci.* 104:8380–8410. <https://doi.org/10.3168/jds.2021-20330>
- Kehrli Jr., M. E., B. J. Nonnecke, and J. A. Roth. 1989. Alterations in bovine neutrophil function during the periparturient period. *Am. J. Vet. Res.* 50:207–214.
- Kimura, K., J. P. Goff, and M. E. Kehrli Jr. 1999. Effects of the presence of the mammary gland on expression of neutrophil adhesion molecules and myeloperoxidase activity in periparturient dairy cows. *J. Dairy Sci.* 82:2385–2392. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(99\)75489-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(99)75489-5)
- Kimura, K., J. P. Goff, M. E. Kehrli Jr., J. A. Harp, and B. J. Nonnecke. 2002. Effects of mastectomy on composition of peripheral blood mononuclear cell populations in periparturient dairy cows. *J. Dairy Sci.* 85:1437–1444. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(02\)74211-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74211-2)



Lacetera, N., D. Scalia, O. Franci, U. Bernabucci, B. Ronchi, and A. Nardone. 2004. *Short communication*: Effects of nonesterified fatty acids on lymphocyte function in dairy heifers. *J. Dairy Sci.* 87:1012–1014. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73246-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73246-4)

Lacetera, N., O. Franci, D. Scalia, U. Bernabucci, B. Ronchi, and A. Nardone,. 2002. Effects on functions of ovine blood mononuclear cells for each of several fatty acids at concentrations found in plasma of healthy and ketotic ewes. *Am. J. Vet. Res.* 63:958–962. <https://doi.org/10.2460/ajvr.2002.63.958>

Lamp, O., H. Reyer, W. Otten, G. Nürnberg, M. Derno, K. Wimmers, C. C. Metges, and B. Kuhla. 2018. Intravenous lipid infusion affects dry matter intake, methane yield, and rumen bacteria structure in late-lactating Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 101:6032–6046. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-14101>

Leblanc, S. 2010. Monitoring metabolic health of dairy cattle in the transition period. *J. Reprod. Dev.* 56 Suppl., S29–S35. <https://doi.org/10.1262/jrd.1056s29>

Liang, H., H. Lum, A. Alvarez, J. J. Garduno-Garcia, B. J. Daniel, and N. Musi. 2018. A low dose lipid infusion is sufficient to induce insulin resistance and a pro-inflammatory response in human subjects. *PLoS One* 13:e0195810. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195810>

Loiselle, M. C., C. Ster, B. G. Talbot, X. Zhao, G. F. Wagner, Y. R. Boisclair, and P. Lacasse. 2009. Impact of postpartum milking frequency on the immune system and the blood metabolite concentration of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 92:1900–1912. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1399>

Mann, S., A. S. Sipka, and J. K. Grenier. 2019. The degree of postpartum metabolic challenge in dairy cows is associated with peripheral blood mononuclear cell transcriptome changes of the innate immune system. *Dev. Comp. Immunol.* 93:28–36. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2018.11.021>

McArt, J. A., D. V. Nydam, G. R. Oetzel, T. R. Overton, and P. A. Ospina. 2013. Elevated non-esterified fatty acids and  $\beta$ -hydroxybutyrate and their association with transition dairy cow performance. *Vet. J.* 198:560–570. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.08.011>

Nonnecke, B. J., K. Kimura, J. P. Goff, and M. E. Kehrli Jr. 2003. Effects of the mammary gland on functional capacities of blood mononuclear leukocyte populations from periparturient cows. *J. Dairy Sci.* 86:2359–2368. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73829-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73829-6)

Ollier, S., F. Beaudoin, N. Vanacker, and P. Lacasse. 2016. Effect of reducing milk production using a prolactin-release inhibitor or a glucocorticoid on metabolism and immune functions in cows subjected to acute nutritional stress. *J. Dairy Sci.* 99:9949–9961. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11711>

Ollier, S., X. Zhao, and P. Lacasse. 2014. Effects of feed restriction and prolactin-release inhibition at drying off on metabolism and mammary gland involution in cows. *J. Dairy Sci.* 97:4942–4954. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-7914>

Pires, J. A. A., A.H. Souza, and R. R. Grummer. 2007. Induction of hyperlipidemia by intravenous infusion of tallow emulsion causes insulin resistance in Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 90: 2735–2744. <https://doi.org/10.3168/jds.2006-759>

Sanchez, N. C. B., J. A. Carroll, J. R. Donaldson, J. O. Buntyn, and T. B. Schmidt. 2015. Exogenous administration of lipids to steers alters aspects of the innate immune response to endotoxin challenge. *Innate Immun.* 21:512–522. <https://doi.org/10.1177/1753425914552741>

Shi, H., M. V. Kokoeva, K. Inouye, I. Tzamelis, H. Yin, and J. S. Flier. 2006. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 116:3015–3025. <https://doi.org/10.1172/JCI28898>

Shin, E. K., J. K. Jeong, I. S. Choi, H. G. Kang, T. Y. Hur, Y. H. Jung, and I. H. Kim. 2015. Relationships among ketosis, serum metabolites, body condition, and reproductive outcomes in dairy cows. *Theriogenology.* 84: 252–260. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.03.014>

Ster, C., M.-C. Loisel, and P. Lacasse. 2012. Effect of postcalving serum nonesterified fatty acids concentration on the functionality of bovine immune cells. *J. Dairy Sci.* 95:708–717. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4695>

Vanacker, N., C. L. Girard, R. Blouin, and P. Lacasse. 2020. Effects of feed restriction and supplementary folic acid and vitamin B12 on immune cell functions and blood cell populations in dairy cows. *Animal*. 14:339–345. <https://doi.org/10.1017/S1751731119002301>

Vanacker, N., R. Blouin, C. Ster, and P. Lacasse. 2022. Effect of different fatty acids on the proliferation and cytokine production of dairy cow peripheral blood mononuclear cells. *J. Dairy Sci.* 105:3508–3517. <https://doi.org/10.3168/jds.2021-21296>

Vanacker, N., S. Ollier, F. Beaudoin, R. Blouin, and P. Lacasse. 2017. Effect of inhibiting the lactogenic signal at calving on milk production and metabolic and immune perturbations in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 100:5782–5791. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12570>

Youssef, M., and M. El-Ashker. 2017. Significance of insulin resistance and oxidative stress in dairy cattle with subclinical ketosis during the transition period. *Trop. Anim. Health Prod.* 49:239–244. <https://doi.org/10.1007/s11250-016-1211-6>

**Supplemental Table S1: Descriptive statistics of cows infused with a lipid solution (Intralipid© 20% 1 ml/kg/h; n = 6) or sterile water (1 mL/kg/h; n=6).**

ID Vaches	Lactation number	Weight (kg)	Age (year)	Days since drying off
246	3	798	5,5	17
523	2	790	4,2	26
7130	5	754	7,4	18
209	4	694	5,4	17
4944	3	810	5,6	37
242	2	811	4,2	29

## CHAPITRE 5

### DISCUSSION ET CONCLUSION

#### 5.1 Résumé des objectifs et des principaux résultats

L'objectif général de cette thèse était de caractériser plus spécifiquement l'effet des AGNE sur les systèmes immunitaire et métabolique des vaches laitières. Les travaux réalisés durant cette thèse ont permis d'améliorer les connaissances sur plusieurs aspects.

#### 5.2 L'acide folique et la vitamine B12

Le premier objectif de cette thèse était de tester une stratégie qui permettrait d'améliorer la balance énergétique en début de lactation. Pour ce faire, une supplémentation en acide folique et en vitamine B12 a été administrée à des vaches soumises à une restriction alimentaire. Bien que le modèle animal choisi ait permis de mettre les vaches en balance énergétique négative, l'apport de vitamine B12 et d'acide folique n'a pas eu d'impact sur la mobilisation des réserves adipeuses. En effet, aucune différence concernant la concentration en AGNE et en BHB n'a été observée entre le groupe traité et le groupe témoin. Cependant, une des raisons possibles est que la balance énergétique n'a été négative que durant 4 jours et donc la mobilisation des AGNE a été relativement courte comparée à celle se produisant durant la période péripartum. Aussi, comparativement à Graulet et al. (2007), la supplémentation en acide folique et en vitamine B12 s'est faite sur une période plus courte ce qui peut expliquer l'absence d'effet sur le métabolisme énergétique. Dans les conditions testées, cette stratégie n'a malheureusement pas fonctionné. Cependant, la restriction alimentaire a eu un effet négatif sur la lymphoprolifération et la flambée oxydative, supportant une fois encore l'hypothèse que la balance énergétique négative a un impact important sur le système immunitaire. Ceci démontrant que les 2 systèmes, le métabolisme et l'immunité, sont des systèmes dynamiques

et étroitement liés, et que dès lors ils doivent être considérés comme un ensemble et non pas comme 2 systèmes indépendants.

### **5.3 Les acides gras ... tous égaux?**

Un autre objectif de cette thèse a été de confirmer à nouveau que les AGNE ont bel et bien un impact négatif sur le système immunitaire de la vache laitière, mais aussi, de tester certains acides gras afin de voir s'ils pouvaient avoir un effet positif. Les effets de différents acides gras ainsi qu'un mélange d'AGNE sur la capacité de lymphoprolifération et la production de certaines cytokines par des PBMC bovins ont été déterminés. Nos résultats confirment que tous les acides gras ne sont pas égaux. Pour la lymphoprolifération, l'acide laurique ne semble avoir aucun effet que ce soit négatif ou positif alors que l'acide linoléique conjugué et l'acide stéarique semblent être de puissants inhibiteurs de cette fonction. Contrairement à Calder et al (1990), nous n'avons observé aucun lien entre la longueur de la chaîne ou le nombre de saturations et l'activité inhibitrice de l'acide gras sur ce paramètre. En effet, la lymphoprolifération est inhibée par l'acide docosahexaénoïque, qui est un acide gras à longue chaîne insaturée, et par l'acide myristique qui est un acide gras à courte chaîne saturée. Tsang et al. (1977) ont montré que l'effet des acides gras sur la lymphoprolifération diffère selon les espèces. En effet, chez l'homme, il n'y a pas d'inhibition lorsque les cellules sont exposées à un mélange contenant de l'acide gras saturé en combinaison avec de l'acide gras insaturé. Chez le rat, ils ont même montré qu'une combinaison de palmitate et d'oléate peut améliorer l'activité des lymphocytes stimulés par la phytohémataglutinine. Par conséquent, le fait que nous ne travaillions pas avec la même espèce pourrait expliquer les différences dans nos observations en comparaison avec ces études. En revanche, quand on regarde la production de certaines cytokines, un résultat sort du lot: les acides gras saturés semblent jouer un rôle moindre dans la modulation de la réponse immunitaire à ce niveau. En effet, la production d'INF- $\gamma$  était moins affectée par ce type d'acide gras, mais aussi par les acides gras à chaînes courtes. Tandis que pour l'IL-4 la longueur de chaîne n'a pas été un facteur déterminant, mais là aussi, les acides gras saturés avaient moins d'effet négatif sur la production de cette cytokine.

Plusieurs mécanismes possibles expliquant cet effet plus important des acides gras monosaturés et polyinsaturés ont été évoqués, notamment une altération de la fluidité membranaire. En effet, lorsque ces acides gras sont présents en grande concentration dans le sang, ils se retrouveraient incorporés en plus grand nombre dans les membranes cellulaires provoquant une altération de sa structure. Cependant, dans le cas de cette étude, puisque les résultats ont varié en fonction du paramètre testé, on peut donc dire que ce mécanisme est possible, mais qu'il n'est certainement pas le seul. Il y a tout de même une limite à notre étude. En effet, tous ces tests ont été réalisés sur des PBMC isolés et restent donc des tests *in vitro*. On doit donc être prudent lors de l'extrapolation des résultats à l'animal. Par exemple, au niveau de la vache, une grande portion des acides gras circule dans le sang sous forme liée à l'albumine, ce qui n'a pas été le cas dans notre étude. De manière générale, la lymphoprolifération et la production de cytokines sont des paramètres importants dans la défense d'un organisme contre des pathogènes. Lorsque ces défenses sont affaiblies, la vache s'en retrouve diminuée et de ce fait plus susceptible de développer des problèmes de santé.

Nous espérons identifier des acides gras ayant un impact positif sur les paramètres du système immunitaire que nous avons testé afin de pouvoir éventuellement modifier la ration alimentaire. En effet, si certains acides gras avaient été bénéfiques, une formulation alimentaire favorisant la mise en réserve de ce type d'acide gras au détriment d'acides gras plus nocifs aurait permis, lors de la lipolyse, d'améliorer le statut immunitaire de la vache laitière. Malheureusement, notre étude n'a pas permis de développer ce type de stratégie.

#### **5.4 Les AGNE seuls responsables?**

Dernièrement, une revue de littérature a remis en question l'idée que les AGNE sont responsables de l'immunodépression péripartum. Ce questionnement est légitime étant donné tous les changements se produisant durant la période péripartum qu'ils soient environnementaux; changement de stalle, physiologiques; fluctuation des hormones, début de la lactation, physiques; traumatismes liés au vêlage, etc. Je pense en effet que c'est une question que je me suis moi-même posée. Il est difficile d'isoler l'impact des AGNE sur le système

immunitaire. Une des techniques couramment utilisées est la restriction alimentaire. Cependant, celle-ci provoque également une balance énergétique négative, des perturbations hormonales et du stress. Il est donc devenu évident qu'il fallait développer un modèle animal nous permettant d'isoler l'effet de l'augmentation des AGNE sur le système immunitaire des vaches laitières afin de mieux comprendre leur impact. Le modèle animal que nous avons développé a montré son efficacité quant à sa capacité à augmenter la concentration sanguine en AGNE à des taux comparables, voire supérieurs aux concentrations observées chez des vaches en période péripartum. Dès lors, il nous a été possible d'évaluer l'impact des AGNE sur le métabolisme et le système immunitaire. En effet, les vaches utilisées pour ce projet étant des vaches non gestantes et tariées, les effets dus au vêlage, aux changements hormonaux, au stress ont pu être éliminés. Les résultats ont montré que l'augmentation drastique de la concentration sanguine en AGNE sature le foie étant donné que l'on a observé une augmentation de la concentration sanguine en BHB. On a également observé une augmentation de la glycémie et de l'insuline lorsque la concentration en AGNE était augmentée, montrant que ces derniers provoquent une insulino-résistance. L'augmentation de la concentration en glucose peut être du moins en partie expliquée par la néoglucogenèse qui s'effectue à partir des acides gras fournis par l'infusion. Cependant, l'augmentation de l'insuline aurait dû permettre, au moins en partie, de diminuer la concentration sanguine en glucose. En effet, lors du projet en collaboration avec le Dr Girard (chapitre 2), un test de tolérance au glucose a été réalisé. Celui-ci consiste en l'administration intraveineuse de glucose sur un court laps de temps. Lors de ce test, les concentrations en glucose et en insuline ont atteint respectivement environ 14 mM et 4µg/L contre 7 mM et 6µ/L lors de notre infusion de lipides. Lors du test de tolérance au glucose réalisé avec le Dr Girard, la concentration en insuline augmente rapidement suite à l'augmentation en glucose pour ensuite chuter au fur et à mesure que la concentration en glucose chute. Dans notre cas le glucose continue à augmenter malgré l'augmentation de la concentration en insuline. Ceci peut être en partie expliqué par le fait que l'on continue à apporter des acides gras à l'organisme. Il serait donc intéressant de mesurer d'autres marqueurs de l'insulino-résistance tels que GLP-1 (glucagon-like peptide-1) ou la DPP-IV (dipeptidyl-peptidase IV). Il est important de noter qu'une insulino-résistance est un

phénomène que l'on peut observer de manière transitoire chez les vaches périparturientes. On a également pu démontrer que certains paramètres immunitaires ont été atteints par l'augmentation en AGNE telles la lymphoprolifération, la flambée oxydative et la production d'INF- $\gamma$ . Nous n'avons pas observé d'effet pour la mesure de la phagocytose. Cependant, il ne faut pas oublier que dans notre cas, l'infusion s'est étalée sur une période de 6h. Or, pour une vache laitière, la mobilisation de ses réserves adipeuses s'étale sur plusieurs jours, l'impact est donc beaucoup plus important. Il serait donc intéressant de tester l'infusion sur une période plus étendue afin de voir si les effets sont plus marqués. Le modèle animal que nous avons développé a montré qu'il était adapté dans le but de tester de futures approches visant à réduire l'impact des AGNE sur le système immunitaire. Ce dispositif nous permettra également de mieux comprendre les voies biologiques impliquées dans la modulation des réponses immunitaires par les AGNE. En effet, des agonistes et antagonistes de certaines voies pourraient être testés dans ce cadre-là.

## 5.5 Perspectives

Les travaux effectués durant ma thèse ont permis de mieux caractériser l'impact des acides gras sur le système immunitaire et sur le métabolisme de la vache laitière. Cependant, d'autres travaux pourraient être réalisés. Par exemple, une possibilité serait de tester la supplémentation en acide folique et vitamine B12 avec des conditions se rapprochant de celles que Graulet et al. (2007) ont utilisées, soit une administration sur une plus longue durée en période péripartum. De plus, puisqu'ils n'avaient pas analysé les fonctions immunitaires dans leur étude, je pense donc qu'il pourrait être important d'approfondir ce point-là. Il serait également intéressant de combiner le projet de la supplémentation en acide folique et vitamine B12 avec le projet d'infusion de lipide. On pourrait par exemple infuser 2 groupes de vaches, le premier ayant reçu la supplémentation en acide folique et vitamine B12 et l'autre ayant reçu la saline, avec l'intralipide afin d'observer si la supplémentation permet d'améliorer la capacité du foie à métaboliser les acides gras. Cela nous permettrait d'évaluer de manière plus directe la possibilité d'utiliser ces 2 suppléments dans les élevages.



Un projet sur lequel j'ai travaillé (mais que je n'ai pas abordé dans cette thèse) visait à identifier la voie de transduction du signal des AGNE sur les cellules immunitaires et leurs effets sur l'expression des gènes. Pour ce faire, des lymphocytes et les PMN ont été isolés à partir du sang de vaches saines et incubées en présence d'un agent mitogène avec soit une concentration inhibitrice de notre mélange d'AGNE soit du solvant. L'ARN a été extrait du milieu de culture à différents temps d'incubation pour être envoyé en séquençage. Bien que j'aie conscience que ce projet *in vitro* ne nous donnera pas de réponse claire concernant les voies impliquées, je suis persuadée que les résultats obtenus nous donneront des pistes à explorer. On pourrait par exemple étudier l'effet de notre mélange d'acides gras sur la régulation des différentes voies trouvées grâce à ce projet ou évoquées ci-dessus tels les TLR-4, les PPARs, les voies apoptotiques, mais aussi la fluidité membranaire... Enfin, le modèle animal développé pourrait nous permettre de tester des agonistes/antagonistes des voies biologiques qui ont été identifiées comme étant des voies potentielles par lesquelles les AGNE agissent sur le système immunitaire. En effet, mieux comprendre le mécanisme impliqué nous permettrait d'établir des stratégies qu'elles soient alimentaires, de gestion ou de régie permettant d'améliorer la santé des vaches en période péripartum. Cela permettrait de faciliter la transition de la gestation à la lactation pour la vache et pour l'éleveur.

Ces travaux nous ont montré que l'augmentation de la concentration sanguine en AGNE est impliquée dans l'immunodépression et l'insulinorésistance péripartum. Dès lors, il apparaît clair que limiter l'accumulation de gras sous forme de réserve corporelle au tarissement est important pour en diminuer la libération lors de la balance énergétique négative subie par les vaches en période péripartum. Il est également important d'étudier les possibilités d'améliorer la capacité du foie à métaboliser les AGNE afin d'en réduire leur concentration sanguine.

Plusieurs voies peuvent être étudiées afin de limiter l'engraissement des vaches au tarissement. La première est d'augmenter l'activité physique afin de favoriser l'utilisation des ressources au détriment de leur accumulation. Anderson et al. (1979) ont étudié l'effet de l'exercice en période péripartum sur la prise alimentaire et la production laitière de vaches multipares. Ils ont montré que les vaches n'ayant pas fait d'exercice avaient un poids plus élevé à la parturition

en comparaison avec les vaches ayant fait de l'exercice. Adewuyi et al. (2006) ont établi qu'il existait une corrélation négative entre le nombre de pas pour une période de 2h et la concentration plasmatique en AGNE chez les vaches en période postpartum. De plus, l'activité physique favorise l'utilisation des AGNE via la voie oxydative (Adewuyil et al., 2005). D'autre part, Hartwiger et al. (2019) ont mené plusieurs études sur l'effet de la transition d'une régie dite classique (vache en stabulation libre, nourrie avec une ration totale mélangée) vers une alimentation au pâturage supplémentée ou non en concentré. Ils ont montré que les vaches au pâturage présentaient une augmentation à court terme de la concentration sanguine en AGNE et en BHB ainsi qu'une plus forte lipomobilisation et une perte de poids. Ceci implique qu'il existe un déficit énergétique durant la transition d'un système vers l'autre. Cependant, ces études ont été réalisées sur des vaches en lactation. Dès lors, il pourrait être envisagé d'utiliser le pâturage au moment du tarissement comme un moyen de réduire l'apport énergétique de manière temporaire. On pourrait également proposer d'augmenter l'activité physique et ainsi réduire l'accumulation des réserves adipeuses pour améliorer certaines fonctions du système immunitaire. Au vu de ces différentes études, augmenter l'activité physique en période de tarissement et utiliser la mise au pâturage apparaissent comme des possibilités de diminuer la concentration en AGNE au vêlage. À notre connaissance, l'effet de l'activité physique et de la mise au pâturage durant la période de tarissement sur le profil métabolique et immunitaire en période péripartum n'a pas encore été évalué. Une des hypothèses qui pourrait être testée est une régie de tarissement alternatif. En effet, une régie de tarissement de la vache laitière favorisant l'activité physique et permettant la réduction de la lipogenèse mènerait à une réduction de la lipomobilisation en période péripartum, diminuant ainsi la concentration sanguine en AGNE et leur impact sur le système immunitaire.

## BIBLIOGRAPHIE

Adewuyi, AA., Gruys E. & van Eerdenburg, F.J.C.M. 2005. Non esterified fatty acids (NEFA) in dairy cattle. A review, *Vet Q.* 27:3, 117-126.

Adewuyi, AA., Roelofs, JB., Gruys, E., Toussaint, MJ., van Eerdenburg, F.J.C.M . 2006. Relationship of plasma nonesterified fatty acids and walking activity in postpartum dairy cows. *J. Dairy Sci.* 89:2977-9.

Anderson, M. J., Lamb, R. C., & Walters, J. L. 1979. Effect of prepartum exercise on feed intake and milk production of multiparous cows. *J. Dairy Sci.* 62: 1420-1423

Akers R.M. 2002. Lactation and the mammary gland. First edition, Iowa State Press.

<https://agriculture.canada.ca/fr/secteurs-agricoles-du-canada/production-animale/centre-canadien-dinformation-laitiere-ccil/apercu-lindustrie-laitiere> consulté le 09, mai 2022

Alvarez-Curto, E. and G. Milligan. 2016. Metabolism meets immunity: The role of free fatty acid receptors in the immune system. *Biochem. Pharmacol.* 114:3-13.

Andersen, J. B., Friggens, N. C., Larsen, T., Vestergaard, M., & Ingvarsen, K. L. 2004. Effect of energy density in the diet and milking frequency on plasma metabolites and hormones in early lactation dairy cows. *Journal of veterinary medicine. A, Physiology, pathology, clinical medicine*, 51(2), 52–57. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0442.2004.00605.x>

Ballou MA. Growth and Development Symposium: Inflammation: Role in the etiology and pathophysiology of clinical mastitis in dairy cows. *J Anim Sci.* 2012 May;90(5):1466-78. doi: 10.2527/jas.2011-4663. Epub 2011 Nov 11. PMID: 22079996.

Bauman, D. E., & Currie, W. B. 1980. Partitioning of nutrients during pregnancy and lactation: a review of mechanisms involving homeostasis and homeorhesis. *Journal of dairy science*, 63(9), 1514–1529. [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(80\)83111-0](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(80)83111-0)

Baumgard, L. H., Hausman, G. J., & Sanz Fernandez, M. V. 2016. Insulin: pancreatic secretion and adipocyte regulation. *Domest. Anim. Endocrinol.* 54:76–84. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2015.07.001>

Bell A. W. 1995. Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation. *J. Anim. Sci.* 73(9): 2804–2819. <https://doi.org/10.2527/1995.7392804x>

Bell, A.W., Bauman, D.E. 1997. Adaptations of Glucose Metabolism During Pregnancy and Lactation. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 2, 265–278. <https://doi.org/10.1023/A:1026336505343>

Bertoni, G., E. Trevisi, X. Han, and M. Bionaz. 2008. Effects of inflammatory conditions on liver activity in puerperium period and consequences for performance in dairy cows. *J Dairy Sci* 91(9):3300-3310.

Bertoni, G., E. Trevisi, and F. Piccioli-Cappelli. 2004. Effects of acetyl-salicylate used in post-calving of dairy cows. *Vet Res Commun* 28 Suppl 1:217-219.

Bionaz, M., G. J. Hausman, J. J. Looor, and S. Mandard. 2013. Physiological and Nutritional Roles of PPAR across Species. *PPAR Res.* 2013:807156.

Brinkmann, V., U. Reichard, C. Goosmann, B. Fauler, Y. Uhlemann, D. S. Weiss, Y. Weinrauch, and A. Zychlinsky. 2004. Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science* 303(5663):1532-1535.

Calder, P. C., Bond, J. A., Harvey, D. J., Gordon, S., & Newsholme, E. A. 1990. Uptake and incorporation of saturated and unsaturated fatty acids into macrophage lipids and their effect upon macrophage adhesion and phagocytosis. *The Biochemical journal*, 269(3): 807–814. <https://doi.org/10.1042/bj2690807>

Calder, P. C., Yaqoob, P., Harvey, D. J., Watts, A., & Newsholme, E. A. 1994. Incorporation of fatty acids by concanavalin A-stimulated lymphocytes and the effect on fatty acid composition and membrane fluidity. *The Biochemical journal*, 300: 509–518. <https://doi.org/10.1042/bj3000509>

Carbonneau, E., de Passillé, A. M., Rushen, J., Talbot, B. G., & Lacasse, P. 2012. The effect of incomplete milking or nursing on milk production, blood metabolites, and immune functions of dairy cows. *Journal of dairy science*, 95(11): 6503–6512. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5643>

Carlos A. Risco, Robert S. Youngquist, M. Dawn Shore, Chapter 44 - Postpartum Uterine Infections, Editor(s): Robert S. Youngquist, Walter R. Threlfall, *Current Therapy in Large Animal Theriogenology (Second Edition)*, W.B. Saunders, 2007, Pages 339-344, ISBN 9780721693231, <https://doi.org/10.1016/B978-072169323-1.50047-7>.

Chow, J. C., D. W. Young, D. T. Golenbock, W. J. Christ, and F. Gusovsky. 1999. Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. *J. Biol. Chem.* 274:10689–10692. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.16.10689>

Contreras G.A., O’Boyle N.J., Herdt T.H., Sordillo L.M. 2010. Lipomobilization in periparturient dairy cows influences the composition of plasma nonesterified fatty acids and leukocyte phospholipid fatty acids. *J. Dairy Sci.* 93 (6); 2508-2516. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2876>.

Covington, D. K., C. A. Briscoe, A. J. Brown, and C. K. Jayawickreme. 2006. The G-protein-coupled receptor 40 family (GPR40-GPR43) and its role in nutrient sensing. *Biochem Soc Trans* 34(Pt 5):770-773.

Cuvelier C., C. J.-F., Dufrasne I., Hornick J.-L., Istasse L. Acides gras : nomenclature et sources alimentaires. 2004. *Ann. Méd. Vét.*, 148:133-140.

Dann, H. M. and J. K. Drackley. Carnitine Palmitoyltransferase I in Liver of Periparturient Dairy Cows: Effects of Prepartum Intake, Postpartum Induction of Ketosis, and Periparturient Disorders. *J. Dairy Sci.* 88(11):3851-3859.

De Koster, J. D., and G. Opsomer. 2013. Insulin resistance in dairy cows. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 29:299–322. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2013.04.002>

Douglas, G. N., Rehage, J., Beaulieu, A. D., Bahaa, A. O., Drackley, J. K. 2007. Prepartum nutrition alters fatty acid composition in plasma, adipose tissue, and liver lipids of periparturient dairy cows. *J. Dairy Sci.* 90(6), 2941–2959. <https://doi.org/10.3168/jds.2006-225>

Drackley, J.K., Overton T.R., Douglas, G.N. 2001. Adaptations of Glucose and Long-Chain Fatty Acid Metabolism in Liver of Dairy Cows during the Periparturient Period. *J. Dairy Sci.* 84 :100-112.

Drackley, J. K., H. M. Dann, G. N. Douglas, N. A. J. Guretzky, N. B. Litherland, J. P. Underwood, and J. J. Loo. 2005. Physiological and pathological adaptations in dairy cows that may increase susceptibility to periparturient diseases and disorders. *Italian Journal of Animal Science*, 4(4), 323-344.

Duplessis, M., H. Lapierre, B. Ouattara, N. Bissonnette, D. Pellerin, J. P. Laforest, and C. L. Girard. 2017. Whole-body propionate and glucose metabolism of multiparous dairy cows receiving folic acid and vitamin B12 supplements. *J. Dairy Sci.* 100(10):8578-8589.

Elda Dervishi, Guanshi Zhang, Dagnachew Hailemariam, Seyed Ali Goldansaz, Qilan Deng, Suzanna M. Dunn, Burim N. Ametaj, Alterations in innate immunity reactants and carbohydrate and lipid metabolism precede occurrence of metritis in transition dairy cows, *Research in Veterinary Science*, Volume 104, 2016, Pages 30-39, ISSN 0034-5288, <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2015.11.004>.

Friedrichs, P., B. Saremi, S. Winand, J. Rehage, S. Dänicke, H. Sauerwein, and M. Mielenz. 2014. Energy and metabolic sensing G protein–coupled receptors during lactation-induced changes in energy balance. *Domest. Anim. Endocrinol.* 48:33-41.

Girard, C. L. and J. J. Matte. 2005. Effects of Intramuscular Injections of Vitamin B12 on Lactation Performance of Dairy Cows Fed Dietary Supplements of Folic Acid and Rumen-Protected Methionine\*. *J. Dairy Sci.* 88(2):671-676.

Girard, C. L., Vanacker, N., Beaudet, V., Duplessis, M., & Lacasse, P. 2019. Glucose and insulin responses to an intravenous glucose tolerance test administered to feed-restricted dairy cows receiving folic acid and vitamin B12 supplements. *Journal of dairy science*, 102(7), 6226–6234. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16298>

C.L. Girard, B. Graulet, Methods and approaches to estimate B vitamin status in dairy cows: Knowledge, gaps and advances, *Methods*, Volume 186, 2021, Pages 52-58, ISSN 1046-2023, <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2020.05.021>.

Goff, J. P. and R. L. Horst. 1997. Physiological changes at parturition and their relationship to metabolic disorders. *J. Dairy Sci.* 80(7):1260-1268.

Goff JP. The monitoring, prevention, and treatment of milk fever and subclinical hypocalcemia in dairy cows. *Vet J.* 2008 Apr;176(1):50-7. doi: 10.1016/j.tvjl.2007.12.020. Epub 2008 Mar 14. PMID: 18342555.

Gordon, J. L., Leblanc, S. J., & Duffield, T. F. 2013. Ketosis treatment in lactating dairy cattle. *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice*, 29(2): 433–445. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2013.03.001>

Graulet, B., J. J. Matte, A. Desrochers, L. Doepel, M. F. Palin, and C. L. Girard. 2007. Effects of Dietary Supplements of Folic Acid and Vitamin B12 on Metabolism of Dairy Cows in Early Lactation. *J. Dairy Sci.* 90(7):3442-3455.

Grinberg, N., S. Elazar, I. Rosenshine, and N. Y. Shpigel. 2008. Beta-hydroxybutyrate abrogates formation of bovine neutrophil extracellular traps and bactericidal activity against mammary pathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 76(6):2802-2807.

Grummer, R. R. 1995. Impact of changes in organic nutrient metabolism on feeding the transition dairy cow. *J Anim Sci* 73(9):2820-2833.

Hammon, D. S., I. M. Evjen, T. R. Dhiman, J. P. Goff, and J. L. Walters. 2006. Neutrophil function and energy status in Holstein cows with uterine health disorders. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 113(1):21-29.

Harp JA, Kehrl ME Jr, Hurley DJ, Wilson RA, Boone TC. Numbers and percent of T lymphocytes in bovine peripheral blood during the periparturient period. *Vet Immunol Immunopathol.* 1991 Mar;28(1):29-35. doi: 10.1016/0165-2427(91)90040-j. PMID: 1711252.



Hartwiger, J., Schären, M., Frahm, J., Kersten, S., Hüther, L., Sauerwein, H., Meyer, U., Breves, G., Dänicke, S. 2019. Effects of a Change from an Indoor-Based Total Mixed Ration to a Rotational Pasture System Combined with a Moderate Concentrate Feed Supply on Immunological Cell and Blood Parameters of Dairy Cows. *Veterinary Sciences*. 6(2):47.

Hoeben, D., R. Heyneman, and C. Burvenich. 1997. Elevated levels of  $\beta$ -hydroxybutyric acid in periparturient cows and in vitro effect on respiratory burst activity of bovine neutrophils. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 58(2):165-170.

Hoeben, D., C. Burvenich, E. Trevisi, G. Bertoni, J. Hamann, R. M. Bruckmaier, and J. W. Blum. 2000. Role of endotoxin and TNF- $\alpha$  in the pathogenesis of experimentally induced coliform mastitis in periparturient cows. *J. Dairy Res.* 67(4):503-514.

Huzzey, J. M., S. Mann, D. V. Nydam, R. J. Grant, and T. R. Overton. 2015. Associations of peripartum markers of stress and inflammation with milk yield and reproductive performance in Holstein dairy cows. *Prev Vet Med* 120(3-4):291-297.

Ingvartsen, K. L. and K. Moyes. 2013. Nutrition, immune function and health of dairy cattle. *Animal* 7 Suppl 1:112-122.

Kehrli, M. E., Jr., B. J. Nonnecke, and J. A. Roth. 1989. Alterations in bovine neutrophil function during the periparturient period. *Am. J. Vet. Res.* 50(2):207-214.

Kennedy, D.O. B Vitamins and the Brain: Mechanisms, Dose and Efficacy—A Review. *Nutrients* 2016, 8, 68. <https://doi.org/10.3390/nu8020068>

Kimura, K., J. P. Goff, M. E. Kehrli, J. A. Harp, and B. J. Nonnecke. 2002. Effects of Mastectomy on Composition of Peripheral Blood Mononuclear Cell Populations in Periparturient Dairy Cows<sup>1</sup>. *J. Dairy Sci.* 85(6):1437-1444.

Kleppe, B. B., R. J. Aiello, R. R. Grummer, and L. E. Armentano. 1988. Triglyceride Accumulation and Very Low Density Lipoprotein Secretion by Rat and Goat Hepatocytes In Vitro. *J. Dairy Sci.* 71(7):1813-1822.

Leblanc, S. 2010. Monitoring metabolic health of dairy cattle in the transition period. *The Journal of reproduction and development* 56 Suppl:S29-35.

Lema-Pérez, Laura. Main Organs Involved in Glucose Metabolism. *Sugar Intake - Risks and Benefits and the Global Diabetes Epidemic*, edited by Ian Martins, IntechOpen, 2021. 10.5772/intechopen.94585.

Liang, H., H. Lum, A. Alvarez, J. J. Garduno-Garcia, B. J. Daniel, and N. Musi. 2018. A low dose lipid infusion is sufficient to induce insulin resistance and a pro-inflammatory response in human subjects. *PLoS One* 13:e0195810. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195810>

Loiselle, MC., Ster, C., Talbot, B.G., Zhao, X., Wagner, G.F., Boisclair, Y.R, Lacasse, P. 2009. Impact of postpartum milking frequency on the immune system and the blood metabolite concentration of dairy cows. *J. Dairy Sci.* Volume 92 (5): 1900-1912, <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1399>.

Mallard, B. A., J. C. Dekkers, M. J. Ireland, K. E. Leslie, S. Sharif, C. L. Vankampen, L. Wagter, and B. N. Wilkie. 1998. Alteration in immune responsiveness during the peripartum period and its ramification on dairy cow and calf health. *J Dairy Sci* 81(2):585-595.

Mandard, S. and D. Patsouris. 2013. Nuclear control of the inflammatory response in mammals by peroxisome proliferator-activated receptors. *PPAR Res* 2013:613864.

Martinet J., Houdebine L-M. 1993. *Biologie de la lactation*. INSERM/INRA Éditions

Massey CD, Wang C, Donovan GA, Beede DK. Hypocalcemia at parturition as a risk factor for left displacement of the abomasum in dairy cows. *J Am Vet Med Assoc.* 1993 Sep 15;203(6):852-3. PMID: 8226240.

McArt, J. A. A., D. V. Nydam, G. R. Oetzel, T. R. Overton, and P. A. Ospina. 2013. Elevated non-esterified fatty acids and  $\beta$ -hydroxybutyrate and their association with transition dairy cow performance. *Vet. J.* 198(3):560-570.

Nonnecke, B. J., K. Kimura, J. P. Goff, and M. E. Kehrli, Jr. 2003. Effects of the mammary gland on functional capacities of blood mononuclear leukocyte populations from periparturient cows. *J. Dairy Sci.* 86(7):2359-2368.

Norman, J. E., S. Bollapragada, M. Yuan, and S. M. Nelson. 2007. Inflammatory pathways in the mechanism of parturition. *BMC Pregnancy and Childbirth* 7(1):S7.

O'Driscoll, K., Olmos, G., Llamas Moya, S., Mee, J. F., Earley, B., Gleeson, D., O'Brien, B., & Boyle, L. 2012. A reduction in milking frequency and feed allowance improves dairy cow immune status. *Journal of dairy science*, 95(3): 1177–1187. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4408>

Oikawa, S., & Oetzel, G. R. 2006. Decreased insulin response in dairy cows following a four-day fast to induce hepatic lipidosis. *Journal of dairy science*, 89(8): 2999–3005. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72572-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72572-3)

Ospina, P. A., D. V. Nydam, T. Stokol, and T. R. Overton. 2010. Evaluation of nonesterified fatty acids and  $\beta$ -hydroxybutyrate in transition dairy cattle in the northeastern United States: Critical thresholds for prediction of clinical diseases. *J. Dairy Sci.* 93(2):546-554.

Patton, J., Kenny, D. A., Mee, J. F., O'Mara, F. P., Wathes, D. C., Cook, M., & Murphy, J. J. 2006. Effect of milking frequency and diet on milk production, energy balance, and reproduction in dairy cows. *Journal of dairy science*, 89(5): 1478–1487. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72215-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72215-9)

Pires, J. A., Souza, A. H., & Grummer, R. R. 2007. Induction of hyperlipidemia by intravenous infusion of tallow emulsion causes insulin resistance in Holstein cows. *Journal of dairy science*, 90(6): 2735–2744. <https://doi.org/10.3168/jds.2006-759>

Phyn, C. V., Kay, J. K., Rius, A. G., Morgan, S. R., Roach, C. G., Grala, T. M., & Roche, J. R. 2014. Temporary alterations to postpartum milking frequency affect whole-lactation milk production and the energy status of pasture-grazed dairy cows. *Journal of dairy science*, 97(11): 6850–6868. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7836>

Preynat, A., H. Lapierre, M. C. Thivierge, M. F. Palin, N. Cardinault, J. J. Matte, A. Desrochers, and C. L. Girard. 2010. Effects of supplementary folic acid and vitamin B12 on hepatic metabolism of dairy cows according to methionine supply<sup>1</sup>. *J. Dairy Sci.* 93(5):2130-2142.

Pullen, D. L., J. S. Liesman, and R. S. Emery. 1990. A species comparison of liver slice synthesis and secretion of triacylglycerol from nonesterified fatty acids in media<sup>2</sup>. *J. Anim. Sci.* 68(5):1395-1399.

Reynolds, C. K., P. C. Aikman, B. Lupoli, D. J. Humphries, and D. E. Beaver. 2003. Splanchnic metabolism of dairy cows during the transition from late gestation through early lactation. *J. Dairy Sci.* 86:1201-1217. doi:10.3168/jds.S0022-0302(03)73704-7.

Sanderson, L. M., M. V. Boekschoten, B. Desvergne, M. Muller, and S. Kersten. 2010. Transcriptional profiling reveals divergent roles of PPARalpha and PPARbeta/delta in regulation of gene expression in mouse liver. *Physiol Genomics* 41(1):42-52.

Schoenberg, K. M., Ehrhardt, R. M., & Overton, T. R. 2012. Effects of plane of nutrition and feed deprivation on insulin responses in dairy cattle during late gestation. *Journal of dairy science*, 95(2): 670–682. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4529>.

Sordillo, L. M. and S. L. Aitken. 2009. Impact of oxidative stress on the health and immune function of dairy cattle. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 128(1):104-109.

Ster, C., M. C. Loiselle, and P. Lacasse. 2012. Effect of postcalving serum nonesterified fatty acids concentration on the functionality of bovine immune cells. *J. Dairy Sci.* 95(2):708-717.

Suriyasathaporn, W., C. Heuer, E. N. Noordhuizen-Stassen, and Y. H. Schukken. 2000. Hyperketonemia and the impairment of udder defense: a review. *Vet Res* 31(4):397-412.

Trevisi, E., Ferrari, A., Piccioli-Capelli, P., Grossi, P., Bertoni, G., 2010. An additional study on the relationship between the inflammatory condition at calving time and net energy efficiency in dairy cow. In “Energy and Protein Metabolism and Nutrition. EAAP publication No. 127”. Wageningen Academic Publishers. Pp 489-490

Tsang, W. M., C. Weyman, and A. D. Smith. 1977. Effect of fatty acid mixtures on phytohaemagglutinin-stimulated lymphocytes of different species. *Biochem. Soc. Trans.* 5:153-154.

Wert, N. and Farms S. (2017) Portrait de l’industrie laitière. Les producteurs laitiers du Canada. [https://www.producteurslaitiers.ca/content/.../Dairy\\_Sector\\_Overview\\_2017\\_FR.pdf](https://www.producteurslaitiers.ca/content/.../Dairy_Sector_Overview_2017_FR.pdf)

Youssef, M., and M. El-Ashker. 2017. Significance of insulin resistance and oxidative stress in dairy cattle with subclinical ketosis during the transition period. *Trop. Anim. Health Prod.* 49:239–244. <https://doi.org/10.1007/s11250-016-1211-6>

Zhao X, Lacasse P. Mammary tissue damage during bovine mastitis: causes and control. *J Anim Sci.* 2008 Mar;86(13 Suppl):57-65. doi: 10.2527/jas.2007-0302. Epub 2007 Sep 4. PMID: 17785603.