

## Thèse de Doctorat

Thomas MEIGNAN

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du  
grade de Docteur d'Oniris - École Nationale Vétérinaire Agroalimentaire et de  
l'Alimentation Nantes-Atlantique  
sous le sceau de l'Université Bretagne Loire*

École doctorale : *Ecologie, Géosciences, Agronomie, Alimentation*

Spécialité : *Epidémiologie, évaluation des risques*

Unité de recherche : *Biologie, Epidémiologie et Analyse de Risque en santé animale (BIOEPAR), INRA, Oniris*

Soutenue le 31 janvier 2018

## Evaluation des effets de l'utilisation de la graine de lin extrudée en élevages bovins laitiers

### JURY

Rapporteurs : **Anne FERLAY**, Directeur de recherches, INRA  
**Henri SEEGERS**, Directeur de recherches, INRA

Examineurs : **Sandrine FRÉRET**, Ingénieur de recherche, INRA  
**Lucile MARTIN**, Professeur, Oniris

Invité(s) : **Guillaume CHESNEAU**, Directeur R&D, Valorex

Directeur de Thèse : **Nathalie BAREILLE**, Professeur, Oniris

Co-directeur de Thèse : **Cyril LECHARTIER**, Maître de conférences, ESA d'Angers



## Liste de productions

### Articles dans périodiques à comité de lecture internationaux

Meignan T., Lechartier C., Chesneau G., Bareille N. 2017. Effects of feeding extruded linseed on production performance and milk fatty acid profile in dairy cows: a meta-analysis. *Journal of Dairy Science*, 100(6):4394-4408 [IF16=2.474] DOI: 10.3168/jds.2016-11850.

Meignan T., Madouasse A., Beaudeau F., Lechartier C., Bareille N. Supplementing dairy cow diet with extruded linseed is associated with increased milk yield: an observational study. *Animal*, Soumis.

Meignan T., Madouasse A., Beaudeau F., Lechartier C., Bareille N. Does feeding extruded linseed to dairy cows improve reproductive performance in dairy herds? An observational study. *Theriogenology*, Soumis.

### Communications avec actes dans un congrès ou symposium international

Meignan T., Lechartier C., Chesneau G., Bareille N. 2017. Effects of feeding extruded linseed on milk production and composition in dairy cow: a meta-analysis. In, 68. *Annual Meeting of the European Federation of Animal Science (EAAP)*, Tallinn, Estonie, 2017/08/28-2017/09/01, 333.

Meignan T., Madouasse A., Chesneau G., Bareille N. 2017. Does feeding extruded linseed to dairy cows improve reproductive performance - an observational study. In, 68. *Annual Meeting of the European Federation of Animal Science (EAAP)*, Tallinn, Estonie, 2017/08/28-2017/09/01, 455.

### Communications par affiche dans un congrès international ou national

Meignan T., Lechartier C., Couvreur S., Chesneau G., Bareille N. 2016. Méta-analyse des effets de l'apport de graines de lin extrudées sur les performances laitières et la composition en acides gras du lait chez la vache laitière. In, 23. *Rencontres Recherches Ruminants (RRR)*, Paris, France, 2016/12/07-08, 54.

## Table des matières

Chapitre I. Introduction générale.....	14
A. Contexte et enjeux .....	14
1. Création d'une filière nutrition-santé afin d'améliorer le profil en acides gras du lait via l'alimentation des animaux .....	14
2. Création d'une filière nutrition-santé afin d'améliorer la productivité des vaches laitières via l'alimentation animale .....	17
B. Identification des besoins de recherche .....	18
1. Des interactions entre la dose de graines de lin extrudées, les caractéristiques de la ration et la digestion chez la vache laitière.....	18
2. Des effets d'une supplémentation en graines de lin extrudées sur les performances de production variables et difficiles à extrapoler sur le terrain .....	19
3. Des effets d'une supplémentation en graines de lin extrudées ou de ses constituants observés sur la fonction de la reproduction mais rarement sur les performances de reproduction.....	21
4. Des effets de la GLE sur la santé de la vache laitière très peu étudiés .....	26
5. Une seule étude des effets de la GLE sur le bilan économique d'une exploitation agricole réalisée à partir d'hypothèses peu documentées.....	27
C. Objectifs scientifiques et démarche de recherche.....	29
Chapitre II. Les effets de l'utilisation de la graine de lin extrudée sur les performances de production	33
A. Caractérisation de la variabilité des effets de l'utilisation de la graine de lin extrudée en conditions expérimentales par méta-analyse .....	33
B. Détermination des effets moyens de l'utilisation de la graine de lin extrudée sur les performances de production en conditions commerciales par une étude épidémiologique.	49
1. Abstract.....	50
2. Implications.....	51
3. Introduction.....	51

4.	Material and methods .....	52
5.	Results .....	55
6.	Discussion .....	64
7.	Acknowledgments.....	67
Chapitre III. Les effets de l'utilisation de la graine de lin extrudée sur les performances de reproduction et les mammites subcliniques .....		
68		
A.	Détermination des effets moyens de l'utilisation de la graine de lin extrudée sur les performances de reproduction en conditions commerciales par une étude épidémiologique	68
68		
1.	Abstract .....	69
2.	Introduction.....	70
3.	Material and Methods .....	72
4.	Results.....	76
5.	Discussion .....	87
6.	Conclusions.....	90
7.	Acknowledgments.....	90
B.	Détermination des effets moyens de l'utilisation de la graine de lin extrudée sur l'incidence et la persistance des mammites subcliniques en conditions commerciales par une étude épidémiologique.....	92
92		
1.	Introduction.....	92
2.	Matériel et méthodes.....	93
3.	Résultats.....	94
4.	Discussion .....	103
Chapitre IV. Evaluation de l'intérêt économique de l'utilisation de la graine de lin extrudée par simulations 106		
106		
A.	Introduction .....	106
B.	Matériel et méthodes .....	107
107		
1.	Schéma d'étude et scénarios de simulations.....	107

2.	Description du modèle de simulation et paramétrages .....	109
3.	Analyse des résultats .....	113
C.	Résultats et discussion .....	115
1.	Effets sur les performances zootechniques du troupeau .....	115
2.	Effets sur les performances économiques de l'atelier.....	118
D.	Conclusion .....	120
Chapitre V.	Discussion générale .....	121
A.	Réponses aux besoins de recherche .....	121
B.	Des résultats de la recherche au terrain : de nouveaux positionnements de l'utilisation de la graine de lin extrudée hors et dans la filière Bleu-Blanc-Cœur.....	126
C.	Des nouvelles voies scientifiques à explorer par l'épidémiologie mais aussi par l'essai expérimental.....	127
Chapitre VI.	Conclusion générale .....	130

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1.1</b> Dispositifs expérimentaux et performances dans les essais étudiant le lien entre graines de lin et reproduction. ....	25
<b>Tableau 1.2</b> Effets d'une supplémentation en graines de lin sur les performances de reproduction observées dans les essais.....	25
En gras, les différences significatives intra-essai.....	25
<b>Tableau 1.3</b> Effets simulés de la supplémentation d'un kilogramme d'un aliment composé de 70% de graines de lin extrudées sur la production laitière et les taux de matières utiles (Béguin et al., 2009).....	28
<b>Tableau 1.4</b> Compensation financière nécessaire sur le prix du lait en €/1000L pour maintenir l'EBE initial suite à l'introduction de GLE dans la ration des vaches laitières soit i) pas de substitution du concentré initial ii) substitution partielle du concentré azoté (Béguin et al., 2009).....	28
<b>Table 2.1</b> References, experimental design and main production variables used to assess the effects on lactational performances of extruded linseed supplementation to dairy cow diet...47	47
<b>Table 2.2</b> Best fit responses of milk fat content (g/kg) and milk fat yield (g/d) and to daily intake of fat from extruded linseed supplementation (100 g/cow/d) and according to the forage nature of the diet using the whole and the restricted datasets.....	50
<b>Table 2.3</b> Descriptive statistics (mean, SD, minimum and maximum) of milk FA composition in the control group and within study responses to extruded linseed supplementation in dairy cows.....	51
<b>Table 2.4</b> Best fit responses of milk FA (g/100 g of total FA) to daily intake of fat from extruded linseed supplementation (100 g/cow/d) and according to the forage nature of the diet using the whole dataset.....	53
<b>Table 2.5</b> Means of milk yield (MY), milk fat content (MFC) and milk protein content (MPC) per test day (TD) according to extruded linseed (EL) exposure status and stratification factors in 1 204 French Holstein dairy herds during the study period 2008-2015 (n = 1 997 763 cow test-day records).....	58
<b>Table 2.6</b> Model results for the association between extruded linseed exposure status and milk yield (kg/d) in 1 204 French Holstein dairy herds during the study period 2008-2015 (n = 1 997 763 cow test-day records).....	59

<b>Table 2.7</b> Model results for the association between extruded linseed exposure status and milk fat content (g/kg) in 1 204 French Holstein dairy herds during the study period 2008-2015 (n = 1 997 763 cow test-day records).....	60
<b>Table 2.8</b> Model results for the association between extruded linseed exposure status and milk protein content (g/kg) in 1 204 French Holstein dairy herds during the study period 2008-2015 (n = 1 997 763 cow test-day records).....	61
<b>Table 2.9</b> Effect of adjustment variables on milk yield ( <b>MY</b> ), milk fat content ( <b>MFC</b> ) and milk protein content ( <b>MPC</b> ) of 548 676 test-day records ( <b>TD</b> ) from 110 040 cows in second parity in 1 203 French Holstein dairy herds during the study period 2008-2015 .....	62
<b>Table 3.1</b> Return-to-service ( <b>RTS</b> ) rates, time from calving to first AI ( <b>DAI1</b> ) and time from calving to conception ( <b>DAIF</b> ) according to extruded linseed ( <b>EL</b> ) exposure status in 1096 French Holstein dairy herds during the study period 2008-2015 (n = 423,605 AI from 158,125 cows). .....	78
<b>Table 3.2</b> Relative risk of return-to-service (RTS) according to the extruded linseed exposure status in 1096 French Holstein dairy herds during the study period January 2008 to December 2015 (n = 423,605 AI from 158,125 cows).....	79
<b>Table 3.3</b> Hazard ratios of the time from calving to first AI ( <b>DAI1</b> ) and the time from calving to conception ( <b>DAIF</b> ) expressed in days according to the extruded linseed exposure status in 1096 French Holstein dairy herds during the study period January 2008 to December 2015 (respectively, n = 277,948 AI1 from 156,203 cows and n = 216,940 AIF from 129,215 cows). .....	80
<b>Table 3.4</b> Effect of adjustment variables on risk of return-to-service (RTS) according to the extruded linseed exposure status in 1096 French Holstein dairy herds during the study period January 2008 to December 2015 (n = 423,605 AI from 158,125 cows).....	81
<b>Table 3.5</b> Effect of adjustment variables on the time from calving to first AI ( <b>DAI1</b> ) and the time from calving to conception ( <b>DAIF</b> ) expressed in days according to the extruded linseed exposure status in 1096 French Holstein dairy herds during the study period January 2008 to December 2015 (respectively, n = 277,948 AI1 from 156,203 cows and n = 216,940 AIF from 129,215 cows). .....	84
<b>Table 3.6</b> Means of subclinical mastitis (SCM) incidence rate per pair of test day records (TD) according to methodology used and extruded linseed (EL) exposure status in 1 204 French Holstein dairy herds during the study period 2008-2015 (n = 1 997 763 cow-TDs including first TDs after calving). .....	97



<b>Table 3.7</b> Means of subclinical mastitis ( <b>SCM</b> ) cure rate per pair of test day records ( <b>TD</b> ) according to methodology used and extruded linseed ( <b>EL</b> ) exposure status in 1 204 French Holstein dairy herds during the study period 2008-2015 (n = 1 997 763 cow-TDs including first TDs after calving). .....	98
<b>Table 3.8</b> Model results for the association between extruded linseed ( <b>EL</b> ) exposure status and risks of new subclinical mastitis between two consecutive test day records ( <b>TD</b> ) in 1 204 French Holstein dairy herds during the study period 2008-2015 (n = 1 997 763 cow test-day records including first test day records after calving). .....	99
<b>Table 3.9</b> Model results for the association between extruded linseed ( <b>EL</b> ) exposure status and risks of subclinical mastitis cure between two consecutive test day records ( <b>TD</b> ) in 1 204 French Holstein dairy herds during the study period 2008-2015 (n = 1 997 763 cow test-day records including first test day records after calving). .....	100
<b>Table 3.10</b> Effect of adjustment variables on risk of new subclinical mastitis ( <b>SCM</b> ) and risk of SCM cure between two consecutive test day records ( <b>TD</b> ) according to the extruded linseed ( <b>EL</b> ) exposure status, with a threshold of 200,000 cells/mL somatic cells count and only one TD below the threshold to consider a cow healthy, in 1 204 French Holstein dairy herds during the study period 2008-2015 (n = 1 281 647 and n = 315 400 pairs of cow-TDs). .....	101
<b>Tableau 4.1</b> Statistiques résumées utilisées pour l'estimation des paramètres d'entrée du modèle (Se et CR <sub>21</sub> ).....	111
<b>Tableau 4.2</b> Rappel des effets de l'utilisation de graines de lin extrudées (GLE) sur les performances de production implémentés dans le simulateur ECOMAST. ....	113

## Liste des figures

<b>Figure 1.1</b> Description du design général de l'étude rétrospective exposé/non-exposé au niveau d'un troupeau bovin laitier pour étudier l'effet d'une supplémentation en graines de lin extrudées sur les performances de production, de reproduction et de santé chez la vache laitière. L'exposition au niveau du troupeau est définie à partir des livraisons d'aliments contenant de la GLE sur l'exploitation agricole.....	30
<b>Figure 1.2</b> Places respectives des processus de modélisation et de simulation scientifique mobilisées (Seegers et al., 1999; Dezetter, 2015). .....	31
<b>Figure 1.3</b> Approches scientifique mobilisées durant le travail de thèse .....	32
<b>Figure 2.1</b> Within study differences ( $\Delta$ ) of average dry matter intake (kg/cow/d), milk yield (kg/cow/d), 4% fat corrected milk (kg/cow/d), 4% fat corrected milk:dry matter intake (kg milk/kg DM/cow/d), milk protein yield (g/cow/d), milk protein content (g/kg), milk fat yield (g/cow/d) and milk fat content (g/kg) plotted with daily intake of fat from extruded linseed supplementation. For all responses, $\Delta = 0$ : dotted line.....	41
<b>Figure 2.2</b> Within study differences ( $\Delta$ ) of average proportions in milk of palmitic acid (16:0), sum of pairs 4:0 to 14:0, $\alpha$ -linolenic acid ( <i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12, <i>cis</i> -15 18:3) and <i>trans</i> -10 18:1 plotted with daily intake of fat from extruded linseed supplementation. For all responses, $\Delta = 0$ : dotted line. For <i>trans</i> -10 18:1 response, LCS: ( $\blacktriangle$ ) solid line, HCS: ( $\bullet$ ) dashed and dotted line. LCS = low corn silage-based diet (0 to 51 % of total forage), HCS = high corn silage-based diet (75 to 100 % of total forage).....	44
<b>Figure 4.1</b> Schéma de l'organisation générale du simulateur ECOMAST (Dezetter, 2015).109	
<b>Figure 4.2</b> Ecarts de production laitière individuelle (kg) entre le scénario de référence et les sept scénarios de supplémentation en GLE (moyenne des moyennes années 6 à 8). Stratégie (1) : toutes les vaches sont supplémentées. Stratégie (2) : seulement les vaches dans les 180 jours après vêlage sont supplémentées.....	115
<b>Figure 4.3</b> Ecarts de TB (g/L) entre le scénario de référence et les sept scénarios de supplémentation en GLE (moyenne des moyennes années 6 à 8). Stratégie (1) : toutes les vaches sont supplémentées. Stratégie (2) : seulement les vaches dans les 180 jours après vêlage sont supplémentées. ....	116

**Figure 4.4** Ecarts de TP (g/L) entre le scénario de référence et les sept scénarios de supplémentation en GLE (moyenne des moyennes années 6 à 8). Stratégie (1) : toutes les vaches sont supplémentées. Stratégie (2) : seulement les vaches dans les 180 jours après vêlage sont supplémentées. .... 116

**Figure 4.5** Ecarts d'intervalle-IA première entre le scénario de référence et les quatre principaux scénarios de supplémentation en GLE (moyenne des moyennes années 6 à 8)... 117

**Figure 4.6** Ecarts d'intervalle-IA fécondante entre le scénario de référence et les quatre principaux scénarios de supplémentation en GLE (moyenne des moyennes années 6 à 8)... 117

**Figure 4.7** Ecarts de la marge brute annuelle (euros) entre le scénario de référence et les sept scénarios de supplémentation en GLE avant l'intégration du surcoût alimentaire lié à l'introduction de la GLE dans la ration (moyenne des moyennes années 6 à 8). Stratégie (1) : toutes les vaches sont supplémentées. Stratégie (2) : seulement les vaches dans les 180 jours après vêlage sont supplémentées. .... 118

**Figure 4.8** Ecarts de la marge brute annuelle (euros) entre le scénario de référence et les sept scénarios de supplémentation en GLE après l'intégration du surcoût alimentaire lié à l'introduction de la GLE dans la ration (moyenne des moyennes années 6 à 8). Stratégie (1) : toutes les vaches sont supplémentées. Stratégie (2) : seulement les vaches dans les 180 jours après vêlage sont supplémentées. .... 119

**Figure 1.1** Places respectives des processus de modélisation et de simulation scientifique mobilisées (Seegers et al., 1999; Dezetter, 2015). .... 31

**Figure 1.2** Approches scientifique mobilisées durant le travail de thèse ..... 32

**Figure 2.1** Within study differences ( $\Delta$ ) of average dry matter intake (kg/cow/d), milk yield (kg/cow/d), 4% fat corrected milk (kg/cow/d), 4% fat corrected milk:dry matter intake (kg milk/kg DM/cow/d), milk protein yield (g/cow/d), milk protein content (g/kg), milk fat yield (g/cow/d) and milk fat content (g/kg) plotted with daily intake of fat from extruded linseed supplementation. For all responses,  $\Delta = 0$ : dotted line. .... 49

**Figure 2.2** Within study differences ( $\Delta$ ) of average proportions in milk of palmitic acid (16:0), sum of pairs 4:0 to 14:0,  $\alpha$ -linolenic acid (*cis*-9,*cis*-12,*cis*-15 18:3) and *trans*-10 18:1 plotted with daily intake of fat from extruded linseed supplementation. For all responses,  $\Delta = 0$ : dotted line. For *trans*-10 18:1 response, LCS: ( $\blacktriangle$ ) solid line, HCS: ( $\bullet$ ) dashed and dotted

line. LCS = low corn silage-based diet (0 to 51 % of total forage), HCS = high corn silage-based diet (75 to 100 % of total forage).....	52
<b>Figure 4.1</b> Schéma de l'organisation générale du simulateur ECOMAST (Dezetter, 2015).	109
<b>Figure 4.2</b> Ecarts de production laitière individuelle (kg) entre le scénario de référence et les sept scénarios de supplémentation en GLE (moyenne des moyennes années 6 à 8). Stratégie (1) : toutes les vaches sont supplémentées. Stratégie (2) : seulement les vaches dans les 180 jours après vêlage sont supplémentées.....	115
<b>Figure 4.3</b> Ecarts de TB (g/L) entre le scénario de référence et les sept scénarios de supplémentation en GLE (moyenne des moyennes années 6 à 8). Stratégie (1) : toutes les vaches sont supplémentées. Stratégie (2) : seulement les vaches dans les 180 jours après vêlage sont supplémentées. ....	116
<b>Figure 4.4</b> Ecarts de TP (g/L) entre le scénario de référence et les sept scénarios de supplémentation en GLE (moyenne des moyennes années 6 à 8). Stratégie (1) : toutes les vaches sont supplémentées. Stratégie (2) : seulement les vaches dans les 180 jours après vêlage sont supplémentées. ....	116
<b>Figure 4.5</b> Ecarts d'intervalle-IA première entre le scénario de référence et les quatre principaux scénarios de supplémentation en GLE (moyenne des moyennes années 6 à 8)...	117
<b>Figure 4.6</b> Ecarts d'intervalle-IA fécondante entre le scénario de référence et les quatre principaux scénarios de supplémentation en GLE (moyenne des moyennes années 6 à 8)...	117
<b>Figure 4.7</b> Ecarts de la marge brute annuelle (euros) entre le scénario de référence et les sept scénarios de supplémentation en GLE avant l'intégration du surcoût alimentaire lié à l'introduction de la GLE dans la ration (moyenne des moyennes années 6 à 8). Stratégie (1) : toutes les vaches sont supplémentées. Stratégie (2) : seulement les vaches dans les 180 jours après vêlage sont supplémentées.....	118
<b>Figure 4.8</b> Ecarts de la marge brute annuelle (euros) entre le scénario de référence et les sept scénarios de supplémentation en GLE après l'intégration du surcoût alimentaire lié à l'introduction de la GLE dans la ration (moyenne des moyennes années 6 à 8). Stratégie (1) : toutes les vaches sont supplémentées. Stratégie (2) : seulement les vaches dans les 180 jours après vêlage sont supplémentées.....	119

## Liste des abréviations

ABC : Approximate Bayesian Computation

AG : Acides gras

AGPI : Acides gras polyinsaturés

AGS : Acides gras saturés

ALA : Acide alpha-linoléique

ARA : Acide arachidonique

BBC : Bleu-Blanc-Cœur

BEN : Bilan énergétique négatif

BHR : Biohydrogénation ruminale

CCS : Concentration en cellules somatiques du lait

DHA Acide docosahéaénoïque

EPA Acide eicosapentaénoïque

GLE : Graine de lin extrudée

IA : Insémination artificielle

IV-IA1: Intervalle vêlage- première insémination

IV-IAF : Intervalle vêlage-insémination fécondante

LA : Acide linoléique

MSC : Mammites subcliniques

MSI : Matière sèche ingérée

PG : Prostaglandine

TB : Taux butyreux

TP : Taux protéique

VL : Vache laitière

## Chapitre I. Introduction générale

### A. Contexte et enjeux

#### 1. Création d'une filière nutrition-santé afin d'améliorer le profil en acides gras du lait via l'alimentation des animaux

##### a) *Intérêt de l'amélioration du profil en acides gras du lait*

Les maladies cardiovasculaires représentent actuellement la première cause de mortalité humaine en Europe comme aux Etats-Unis (Mozaffarian et al., 2016; Townsend et al., 2016). Au cours des dernières décennies, le lien entre nutrition humaine et maladies cardiovasculaires a été démontré. Ainsi, les acides gras polyinsaturés (AGPI) n-3 à longue chaîne, l'acide eicosapentaénoïque (EPA ; cis5,cis8,cis11,cis14,cis17-20:5) et l'acide docosahéxaénoïque (DHA ; cis4,cis7,cis10,cis13,cis16,cis19-22:6), ont été associés avec une réduction du risque d'apparition des maladies cardiovasculaires (Albert, 1998; Albert et al., 2002; Simopoulos, 2002a). Ce sont des constituants essentiels de la rétine et du cerveau impliqués notamment dans les fonctions de vision, de mémorisation, et d'apprentissage (Simopoulos, 1991; Connor, 2000). L'importance du ratio entre les deux familles d'AGPI, les AG n-6 et les AG n-3, a été aussi démontrée dans l'apparition des maladies cardiovasculaires (Wijendran and Hayes, 2004; Simopoulos, 2008). L'EPA et le DHA sont issus d'un précurseur que l'Homme ne peut pas synthétiser, l'acide alpha-linolénique (ALA ; cis9,cis12,cis15-18:3), et qu'il doit donc trouver dans son alimentation. Le taux de conversion de l'ALA vers l'EPA et le DHA fait actuellement débat mais serait inférieur à 1% (Burdge and Calder, 2005; Barceló-Coblijn and Murphy, 2009). Les recommandations faites dans les rapports de l'expertise collective de l'agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES) sur les apports en ALA (1% de l'apport énergétique totale sans alcool), en EPA (250 mg/j) et en DHA (250 mg/j), et le rapport n-6/n-3 (< 5), afin de limiter les risques sur la santé de l'Homme, ne sont pas satisfaites aujourd'hui dans les pays développés chez les enfants comme chez les adultes (ANSES, 2011, 2015). Par exemple, en France moins de 1% des enfants comme des adultes satisfont la recommandation sur l'apport d'ALA (ANSES, 2015). Ces recommandations pourraient encore évoluer étant donné le nombre croissant d'études démontrant un effet propre de l'ALA (i.e., indépendamment de son rôle de précurseur de l'EPA et du DHA) sur la prévention sanitaire (Stark et al., 2008; Barceló-Coblijn and Murphy, 2009; Rajaram, 2014).

Le profil lipidique des produits animaux est important pour la santé humaine. En effet, en France, les produits animaux représentent environ 60% des apports lipidiques totaux (Ailhaud et al., 2006). De plus, les lipides devraient constituer entre 35 et 40% de l'apport énergétique total journalier nécessaire à l'Homme (ANSES, 2011). Les produits carnés sont la première source d'ALA (ANSES, 2015). Les produits laitiers ne représentent pas une source d'ALA majeure, mais contribuent de manière significative à l'apport d'acides gras saturés (AGS) en France ou dans le reste de l'Europe (Eilander et al., 2015; Tressou et al., 2016). Ils représentent également une source d'AG moins médiatisés dont les effets intéressants pour la santé humaine ont été récemment compilés par Ferlay et al. (2017) : les acides gras *trans* (notamment l'acide vaccénique, *trans*11-18:1), les acides linoléiques conjugués (notamment l'acide ruménique spécifique aux ruminants, *cis*9,*trans*11-CLA), et les acides linoléiques conjugués. Ces AG sont formés par la biohydrogénation ruminale (BHR) de l'ALA et de l'acide linoléique (LA ; *cis*9,*cis*12-18:2) après la lipolyse des esters d'AG. Certains AG comme l'acide oléique ou l'acide ruménique ont une double origine et sont aussi désaturés *de novo* par élongation dans la glande mammaire. Modifier la composition en AG du lait vers un profil suivant les recommandations de l'ANSES permettrait d'améliorer la santé de la population sans changer les habitudes des consommateurs (Weill et al., 2002).

***b) Amélioration du profil en acides gras du lait via l'alimentation des vaches laitières***

Le profil en acides gras du lait des vaches laitières est facilement et rapidement modulable par la voie alimentaire (Chilliard et al., 2007; Kliem and Shingfield, 2016) contrairement à la voie génétique qui sur le long terme pourrait être plus intéressante (Lanier and Corl, 2015). L'ensilage de maïs présente un profil en AG déséquilibré au niveau du rapport n-6/n-3 avec en moyenne 5% d'ALA mais 45,8% de LA (% d'AG totaux). L'herbe est le fourrage le plus intéressant par sa richesse en ALA (environ 50% des AG totaux) malgré une teneur en lipides faible (entre 1 et 3%) (Doreau et al., 2012; Glasser et al., 2013). Cependant, la disponibilité de l'herbe est variable dans le temps, et sa teneur en ALA est dépendante du stade végétatif et du mode de récolte (Glasser et al., 2013). Afin de disposer d'une ressource alimentaire riche en ALA toute l'année, l'apport de lipides sous forme de graines oléagineuses, en particulier la graine de lin, est un levier intéressant. Elle est constituée à 40% de lipides et l'ALA représente 54% des AG totaux (Brunschwig et al., 2010).

L'amélioration du profil en AG du lait via l'apport de la graine de lin est complexifiée par i) la présence de composés cyanogènes ii) la protection naturelle des AGPI par la coque de la graine limitant la digestibilité des AG iii) le phénomène de BHR des AGPI si l'apport se fait sous forme d'huile. En effet, Glasser et al. (2008) ont estimé dans leur méta-analyse que 86 ( $\pm$  12) % de l'ALA ingéré issu de suppléments lipidiques étaient biohydrogénés dans le rumen (n = 222). La protection de l'ALA vis-à-vis de la BHR apparaît donc nécessaire afin de maximiser son passage du rumen vers le duodénum, mais cette protection doit rester limitée afin de maintenir une bonne digestibilité (Sterk et al., 2012). Enfin, les AGPI sont toxiques pour certaines bactéries fibrolytiques du rumen (Maia et al., 2010). Ainsi, minimiser le temps de rétention dans le rumen des AGPI apparaît important afin de limiter la BHR mais aussi afin de ne pas perturber l'écosystème microbien du rumen (Sterk et al., 2010).

L'extrusion est un traitement thermique durant lequel la graine est soumise aux effets conjugués de la température et de la pression (Poncet et al., 2003). Ce procédé permet de détruire les composés cyanogènes et rendrait les AGPI plus accessibles par la rupture partielle de la coque (Sterk et al., 2010). Les conditions de réalisation de l'extrusion (prétraitement, modalités de cuisson-extrusion) semblent jouer un rôle important sur le degré de BHR et la digestibilité des AG (Akraim et al., 2006; Doreau et al., 2009; Sterk et al., 2010). Pour résumer, l'effet de protection de l'extrusion se situerait entre l'effet naturel de protection de la coque et l'absence de protection lorsque les AG sont sous forme libres. Ainsi, d'une part, la BHR est limitée entraînant au passage la formation de plus d'intermédiaires de BHR au détriment de l'AG stéarique (Doreau et al., 2009; Sterk et al., 2012), et d'autre part, la quantité d'ALA « bypass » est augmentée.

### *c) Valorisation de l'innovation technologique par une innovation organisationnelle*

L'entreprise Valorex, créée en 1992, valorise le lien nutrition animale-nutrition humaine-santé humaine exposé précédemment. L'entreprise est devenue un acteur majeur du traitement de graines oléagineuses et protéagineuses, notamment de la graine de lin, à travers une innovation technologique, la thermo-extrusion, dont l'intérêt a été décrit précédemment. Le dépôt de plusieurs brevets sur cette technologie a permis de protéger l'émergence de cette niche d'innovation sur le lin oléagineux (Magrini et al., 2014).

Parallèlement à Valorex, l'association Bleu-Blanc-Cœur (**BBC**) a été créée en 2000 et réunit les acteurs de la filière alimentaire (producteur de lin, fabricant d'aliment, éleveur, industriel laitier/industrie agro-alimentaire, consommateur). La filière BBC, dont la trajectoire



a été analysée en détail par Magrini et al. (2014) et Magrini et Duru (2014), vise à répondre aux préoccupations sociétales en termes de nutrition-santé et de changement climatique. En aval, le label privé BBC permet aux consommateurs d'identifier les produits BBC par rapport aux produits standards. En amont, les élevages produisant selon le label BBC sont soumis à une obligation de résultats notamment au niveau du ratio n-6/n-3, en plus d'une obligation de moyens. Les éleveurs engagés dans la filière BBC bénéficient alors d'une rémunération d'au minimum 13 euros/1000L de lait produit. Cette obligation de résultats a des conséquences sur la typologie des exploitations laitières collectées sous label BBC (Magrini and Duru, 2014). En effet, la majorité de la collecte BBC est réalisée dans des systèmes intensifs de plaine supplémentés avec de la graine de lin extrudée (**GLE**) afin de répondre à l'obligation de résultats toute l'année (Magrini et al., 2014). Ainsi, les systèmes herbagers sont minoritaires étant donné un profil en AG du lait répondant au label BBC uniquement au cours du printemps avec une ration 100% pâturage. Ces exploitations sont alors obligées de supplémenter la ration avec de la GLE si elles veulent être collectées sous label BBC toute l'année. Le label BBC a donc permis à Valorex d'imposer sur tout le territoire national, via d'autres fabricants d'aliments, ses aliments extrudés riches en AG n-3 et son savoir-faire dans la formulation et l'utilisation des produits contenant ces aliments extrudés. La collecte de lait BBC représente aujourd'hui environ 171 millions de litres de lait produits soit 0,7% du lait produit en France (+60% de production entre 2016 et 2017). Le prix élevé des aliments extrudés (entre 500 et 600 euros/tonne), et donc le surcoût alimentaire engendré par leur utilisation, pourrait être un frein au développement des produits à base de GLE sans la compensation financière de la filière BBC.

## **2. Création d'une filière nutrition-santé afin d'améliorer la productivité des vaches laitières via l'alimentation animale**

Curieusement, les fabricants d'aliments vendent leurs gammes de produits à base de GLE au-delà de la filière BBC (Magrini and Duru, 2014). Si la laiterie n'est pas engagée dans la démarche BBC, un éleveur peut quand même parfois bénéficier de la prime BBC grâce à un fonds BBC s'il respecte les obligations de résultats. Cependant, d'une part, ce système a été mis en place récemment, et d'autre part, l'obligation de résultats sur les AG n-3 impose une quantité élevée de GLE. La rémunération éventuelle sur la qualité du lait n'apparaît donc pas dans le choix des éleveurs d'acheter des produits commerciaux à base de GLE hors de la filière BBC.

Ainsi, ce développement commercial de la supplémentation en GLE s'est appuyé sur un argumentaire marketing, non plus basé sur l'amélioration de la qualité nutritionnelle du lait, mais basé sur une meilleure performance technico-économique de l'élevage via notamment une amélioration de la reproduction et de la santé des vaches laitières (Magrini and Duru, 2014). Ce développement commercial s'est donc appuyé sur des observations empiriques, issues du terrain, à la différence de la filière BBC, qui s'est appuyée sur la littérature scientifique.

Afin de favoriser ce développement commercial au-delà de la filière BBC, l'objectivation des effets de la GLE sur les performances techniques des animaux en élevage laitier par une approche scientifique semble aujourd'hui indispensable, notamment l'effet dose. De plus, étant donné le contexte d'augmentation des prix des produits à base de GLE et de leur prix par rapport aux autres aliments disponibles sur le marché, une approche coût-bénéfices serait intéressante. L'enjeu du travail de recherche est donc d'apporter des réponses sur la viabilité économique de l'utilisation de la GLE pour un élevage laitier.

## **B. Identification des besoins de recherche**

### **1. Des interactions entre la dose de graines de lin extrudées, les caractéristiques de la ration et la digestion chez la vache laitière**

L'ajout de lipides dans la ration est une stratégie fréquemment utilisée en élevage laitier nord-américain afin d'augmenter la densité énergétique de la ration, sans augmenter la part d'amidon ni réduire la part de fibres dans la ration, ces stratégies étant responsables de perturbations digestives. Cependant, l'ajout de lipides dans la ration des vaches laitières peut aussi entraîner des perturbations dans les processus digestifs (Sauvant et Bas, 2001). Ainsi, il est généralement recommandé de ne pas dépasser 5% de lipides dans la ration des vaches laitières quelle que soit la nature des AG (Palmquist et Jenkins, 1980; Chilliard et al., 1993). Jenkins (1997) titrait ainsi que le succès de la supplémentation en lipides pour augmenter la production laitière dépendait de la quantité utilisée. Une baisse de la quantité de matière sèche ingérée (**MSI**) a été observée avec des rations riches en lipides par une synthèse de la littérature (Block et Evans, 2010), avec des rations supplémentées en graines oléagineuses (-21 kg/j) par une méta-analyse (Rabiee et al., 2012), et aussi avec des rations supplémentées en GLE (-0,66 kg/j, n = 13) par une synthèse de la littérature (Brunschwig et al., 2010). Cependant dans ces trois études, la baisse de MSI présentait une très forte hétérogénéité non explorée. De plus, une supplémentation importante en GLE (15% MSI) a diminué la digestibilité des fibres de la ration (Martin et al., 2008). Cette réduction de la digestibilité des

fibres a été observée dans une relation dose-dépendante lorsque la GLE a été associée (de 5 à 15% MSI) à une ration à base d'ensilage de maïs (Martin et al., 2016), mais pas en étant associée à une ration à base de foin, soulevant ainsi la question des interactions entre la GLE et les autres composants de la ration.

En effet, les perturbations digestives seraient liées à des interactions complexes entre les AG n-3 (et donc leur quantité et leur disponibilité), les caractéristiques physico-chimiques de la ration et l'écosystème microbien ruminal (Doreau et al., 2012). Huws et al. (2015) ont observé une modification dans la composition du microbiote ruminal après introduction d'huile de lin dans la ration. Cependant, Martin et al. (2016) n'ont pas observé d'effets sur la concentration en bactéries fibrolytiques mais font l'hypothèse d'une diminution de leur activité. Modifier l'écosystème microbien ruminal entraîne une modification des voies de BHR des AG (Doreau et al., 2012; Ferlay et al., 2017). Ainsi, l'ajout de GLE dans la ration conduit à la formation d'intermédiaires de BHR issus de l'hydrogénation de LA et de l'ALA (Shingfield et al., 2010; Ferlay et al., 2017), notamment le *trans*10-18:1 et le *trans*11-18:1. Ces deux AG *trans* représentent deux grandes voies de BHR dépendantes de l'écosystème ruminal. On considère que lorsque la voie du *trans*11-18:1 est privilégiée, l'environnement ruminal se porte bien. Cependant, l'ajout de GLE, en interaction avec des caractéristiques physico-chimiques de la ration comme le pourcentage de concentrés ou le pourcentage d'amidon, pourrait favoriser la voie dite du *trans*10 (Bauman et Griinari, 2001, 2003; Doreau et al., 2012; Ferlay et al., 2017). Or, le *trans*10-18:1 et le *trans*10,cis12-CLA sont des inhibiteurs de la synthèse mammaire d'AG (Shingfield et Griinari, 2007; Shingfield et al., 2010), dont l'effet est connu sous le nom de syndrome de dépression de la matière grasse. Curieusement, le *trans*10,cis12-CLA semblerait issu seulement de la BHR de LA (Zened et al., 2011, 2013). Ainsi, cela soulève la question de l'intérêt d'associer la GLE avec une ration riche en ensilage de maïs (i.e., riche en LA) au risque d'observer des effets négatifs sur la synthèse de matières grasses du lait et donc sur le taux butyreux (**TB**). De plus, les interactions de la GLE avec les caractéristiques physico-chimiques de la ration associée sont à élucider.

## **2. Des effets d'une supplémentation en graines de lin extrudées sur les performances de production variables et difficiles à extrapoler sur le terrain**

Rabiee et al. (2012) ont montré une forte hétérogénéité des réponses de production laitière, de TB et de taux protéique (**TP**) suite à une supplémentation en graines oléagineuses

par méta-analyse. Cependant, prendre en compte autant de sources végétales différentes et de formes d'apport ne permet évidemment pas d'étudier finement les facteurs de la variabilité des réponses observées étant donné la complexité des interactions montrée dans la partie I.B.1. Brunshwig et al. (2010) ont réalisé une synthèse bibliographique de 15 essais étudiant la supplémentation en GLE sur les performances de production, l'essai étant défini ici par un couple témoin-traitement. La moyenne de supplémentation était 363 g de lipides issus de la GLE/vache/j, soit environ 908 g de GLE/vache/j. L'ajout de GLE dans la ration n'a pas eu d'effet moyen significatif sur la production laitière et a entraîné une baisse significative du TB et du TP respectivement de 3,2 g/kg et 0,5 g/kg. Comme l'objectif de l'étude était plutôt de comparer les différentes formes d'apport de la graine de lin, la variabilité des réponses spécifiques à la GLE n'a pas été étudiée. En plus d'essais issus de la littérature grise non pris en compte (Egger et al., 2007; Mathieu et al., 2008; Hurtaud et al., 2012), de nombreux essais ont été réalisés depuis cette synthèse (Lerch et al., 2012; Ferlay et al., 2013; Neveu et al., 2013; Oeffner et al., 2013; Neveu et al., 2014; Livingstone et al., 2015). Une forte variabilité des réponses en termes de production est observée lorsqu'on compile tous ces essais expérimentaux (cf. Chapitre 2).

Les effets de la supplémentation en GLE observés en essai expérimental sont difficilement extrapolables à la supplémentation en GLE dans les élevages commerciaux. En effet, premièrement les rations conçues en expérimentation couvrent les besoins des animaux de façon équivalente entre les lots (supplémentés ou pas). Sur le terrain, la valeur énergétique et azotée d'une ration peuvent être accrues suite à supplémentation en GLE. Deuxièmement, la plupart des expérimentations ont testé la supplémentation en GLE dans des quantités largement supérieures aux doses recommandées sur le terrain afin notamment d'exacerber les effets sur la composition en AG du lait. Troisièmement, sur le terrain, la supplémentation GLE est souvent réalisée avec ajout d'urée (azote soluble). Le seul essai ayant étudié l'effet de ce rationnement a eu pour résultat une augmentation de 2,9 kg/j de la production laitière (Mathieu et al., 2008). Quatrièmement, la ration mono-fourrage ensilage de maïs est souvent utilisée dans les expérimentations publiées alors qu'elle est quasiment abandonnée sur le terrain. Or, nous avons vu précédemment que l'effet des fourrages associés à la GLE pouvait modifier la BHR et la formation des intermédiaires de BHR, et ainsi le TB.

Pour résumer, la variabilité des effets sur les performances de production de la supplémentation en GLE n'a pas été étudiée. Pourtant, les caractéristiques physico-chimiques de la ration associée semblent être un élément clé de la réussite de cette supplémentation. De

plus, les effets observés en expérimentation sont difficilement extrapolables au terrain au regard de la quantité de GLE utilisée et des caractéristiques des rations utilisées.

### **3. Des effets d'une supplémentation en graines de lin extrudées ou de ses constituants observés sur la fonction de la reproduction mais rarement sur les performances de reproduction**

Les effets de la supplémentation en AG sur la fonction et les performances de reproduction sont controversés. Plusieurs auteurs ont réalisé des synthèses de la littérature sur les effets de la supplémentation en lipides sur la fonction et les performances de reproduction chez la vache laitière (Leroy et al., 2008b; Friggens et al., 2010; Santos et al., 2010; Thatcher et al., 2011; Leroy et al., 2014). Des synthèses plus spécifiques à certains lipides ont été réalisées : le rôle des AGPI chez les mammifères (Wathes et al., 2007, 2013) et chez la vache laitière (Santos et al., 2008) et le rôle des AGPI n-3 chez les ruminants (Gulliver et al., 2012). La diversité de la nature des suppléments et des AG, la diversité des témoins (nature des suppléments et des AG) et du séquençage et de la durée de supplémentation, rendent difficile la comparaison entre études. Il en est de même pour la complexité des mécanismes biologiques sous-jacents et de la multiplicité des hypothèses concernant le rôle des lipides sur la fonction de reproduction. Nous rappelons ici que la GLE est la source la plus riche en ALA, mais aussi une des sources les plus riches en lignanes qui sont des phytoestrogènes et de puissants anti-oxydants. Cependant les lignanes ne seront pas évoquées ci-après mais dans le chapitre 3.

La supplémentation en GLE pourrait améliorer le retour à la cyclicité chez la vache laitière via l'amélioration du bilan énergétique (**BE**), notamment en augmentant la densité énergétique de la ration. Pour rappel, les vaches laitières présentent un BE négatif (**BEN**) après vêlage qui se traduit par leur amaigrissement et donc une perte d'état corporel. Ce BEN est accentué chez les vaches à haut niveau de production laitière. La fonction de production de lait étant la voie prioritaire pour l'utilisation de l'énergie au détriment de la fonction de reproduction, le BEN est associé négativement à la reprise de la cyclicité ovarienne après vêlage (Butler, 2003; Leroy et al., 2008a). Toutefois, l'effet de la supplémentation en lipides dans la ration des vaches laitières sur le BE était controversé il y a 20 ans (Staples et al., 1998) et l'est encore aujourd'hui (Leroy et al., 2014). L'ingestion après l'ajout de lipides dans la ration peut être réduite (Allen, 2000; Rabiee et al., 2012), l'énergie ingérée est alors équivalente à celle issue d'une ration non supplémentée. La baisse du TB observée avec la supplémentation en GLE par l'économie de précurseurs de synthèse de matières grasses

pourrait épargner de l'énergie (Leroy et al., 2014). La diminution de l'émission de méthane entérique pourrait aussi contribuer à l'économie d'énergie (Martin et al., 2008, 2016). Ces deux sources d'économie d'énergie, si elles ne se traduisent pas par une augmentation de la production laitière, pourraient donc permettre d'améliorer le BE chez la vache laitière notamment en début de lactation. Jahani-Moghadam et al. (2015) ont réalisé un essai avec 400 vaches laitières recevant deux rations isoazotées et isoénergétiques supplémentées soit en huile de palme, soit en GLE (826 g/vache/j), du vêlage à 40 jours post-partum (Tableau 1.1). Les concentrations plasmatiques en acides gras non estérifiés et  $\beta$ -hydroxybutyrate, molécules marqueurs du BEN, n'ont pas différencié entre traitements. Pourtant, ils ont observé un retour à la cyclicité plus rapide en faveur du traitement GLE : 60,3 vs. 66,8 jours d'intervalle vêlage-1<sup>ère</sup> insémination (IV-IA1) (Tableau 1.2). La concentration en glucose dans le sérum a été plus élevée dans le groupe GLE qui a eu aussi un TB plus faible (35,5 vs. 41,7 g/kg). On peut supposer qu'il y a eu une économie d'énergie. De plus, de Veth et al. (2009) ont estimé un raccourcissement du délai de reprise de cyclicité après ingestion de *trans*10,*cis*12-CLA par des méthodes d'analyse de survie à partir de plusieurs études. Or, nous avons vu précédemment que cet AG est un inhibiteur de synthèse de matières grasses (Shingfield et al., 2010), formé lors de la BHR de LA. On peut ainsi supposer que la baisse de TB a été provoquée par cet AG et qu'il a pu contribuer à l'amélioration de la reprise de cyclicité (de Veth et al., 2009). Enfin, une progestéronémie plus élevée a été observée dans les premiers jours après vêlage dans le groupe GLE ainsi qu'une moindre incidence de kystes ovariens (4,4 vs 5,6%). Une incidence réduite de kystes ovariens a aussi été retrouvée dans une ampleur plus importante par Dirandeh et al. (2013b) (5,2% vs. 25,6%). Fourichon et al., (2000) ont estimé par méta-analyse un allongement de l'intervalle vêlage-1<sup>ère</sup> chaleur de 5,6 jours (3,8 ; 7,3) et un allongement de l'IV-IA1 de 11,3 jours (10 ; 12,6) chez les vaches laitières atteintes de kystes ovariens. Ainsi, l'ingestion de GLE post-partum pourrait permettre un retour plus rapide de la cyclicité ovarienne après vêlage.

La supplémentation en GLE pourrait améliorer le retour à la cyclicité chez la vache laitière via l'implication de l'ALA et de ses dérivés EPA et DHA dans la synthèse endogène des stéroïdes et des prostaglandines (PG). Brièvement, les AGPI n-3 pourraient inhiber la production de PG de la série 2, d'une part par compétition avec les AG n-6 (notamment l'acide arachidonique (ARA ; *cis*5,*cis*8,*cis*11,*cis*14-20:4)) pour la formation des PG de la série 3, et d'autre part par inhibition des gènes impliqués dans leur synthèse (Wathes et al., 2007; Friggens et al., 2010; Wathes et al., 2013), notamment la PGE<sub>2</sub> et la PGF<sub>2 $\alpha$</sub> . La

diminution de PGE<sub>2</sub> dans les follicules dominants, observée par (Zachut et al., 2011) avec une supplémentation en huile de lin encapsulée par rapport à une supplémentation en savons de calcium d'huile de palme distillée dans les follicules dominants, est associée à un retard d'ovulation mais permet au follicule d'être de taille plus importante et de produire plus d'estradiol (Wathes et al., 2013). Ainsi, la supplémentation en GLE pourrait améliorer le retour à la cyclicité chez la vache laitière via une stimulation de la croissance folliculaire (Santos et al., 2008; Leroy et al., 2014). En effet, Ambrose et al. (2006) ont observé une augmentation de la taille du follicule ovulatoire avec une supplémentation en graines de lin aplaties en comparaison d'une supplémentation en graines de tournesol aplaties, ainsi que Dirandeh et al. (2013a) et Jahani-Moghadam et al. (2015) avec une supplémentation en GLE en comparaison d'une supplémentation en huile de palme ou en graines de soja entières. Aussi, Zachut et al. (2010b) ont observé un nombre plus élevé de follicules chez les vaches laitières recevant des rations supplémentées en huile de lin encapsulée par comparaison aux graines de tournesol. L'augmentation de la taille du follicule dominant peut être reliée à une reprise de cyclicité plus rapide après vêlage mais aussi à un corps jaune et un oocyte de meilleure qualité (Leroy et al., 2008b).

La supplémentation en GLE pourrait améliorer la fertilité chez la vache laitière via l'amélioration de l'environnement folliculaire et utérin, la qualité de l'oocyte et de l'embryon. Le profil en AG du plasma sanguin et le profil en AG de l'environnement folliculaire évoluent parallèlement à celui du régime alimentaire (Leroy et al., 2014). Ainsi, la supplémentation en GLE ou en huile de lin encapsulée a notamment augmenté la concentration en ALA et le ratio n-3/n-6, et diminué la concentration en ARA dans le plasma sanguin, dans le fluide folliculaire et les cellules de la granulosa des follicules, ainsi que dans le cumulus oophorus (Zachut et al., 2010, 2011; Moallem et al., 2013). Cet environnement serait plus favorable à l'oocyte (Leroy et al., 2014) et pourrait être un facteur influant sur la fertilité (Zeron, 2001; Bender et al., 2010). La supplémentation en GLE pourrait inhiber la synthèse de PGF<sub>2α</sub> au niveau de l'endomètre via l'apport d'ALA et l'amélioration du ratio n-3/n-6. Cela pourrait favoriser la persistance du corps jaune en inhibant l'activité lutéolytique de l'endomètre (la libération de PGF<sub>2α</sub>), et donc favoriser la quantité de progestérone favorable au maintien de l'embryon (Leroy et al., 2014), même si cela a été montré avec les AG n-3 à longue chaîne. De plus, la production de PG de série 3 (anti-inflammatoires) au détriment de série 2 (pro-inflammatoires) permettrait de réduire la réaction inflammatoire contre l'embryon par l'organisme, et ainsi améliorer sa survie. Une mortalité embryonnaire réduite a été observée

avec une supplémentation en graines de lin entières par rapport à une supplémentation en AGS ou graines de soja micronisées (0% vs. 15,4% et 8,0 %) (Petit et Twagiramungu, 2006) ou avec une supplémentation en graines de lin aplaties par rapport à une supplémentation en graines de tournesol aplaties (9,8% vs. 27,3%) (Ambrose et al., 2006) (Tableau 1.1, Tableau 1.2). Cependant, des performances de reproduction liées à la fertilité améliorées n'ont presque jamais été observées (Ambrose et al., 2006; Petit et Twagiramungu, 2006; Fuentes et al., 2008; Bork et al., 2010; Dirandeh et al., 2013b; Jahani-Moghadam et al., 2015) (Tableau 1.2).



**Tableau 1.1** Dispositifs expérimentaux et performances dans les essais étudiant le lien entre graines de lin et reproduction.

Publication	Nb de vaches et facteurs d'appariement	Stade de lactation au début de l'essai	Fin de la supplémentation en lipides	Programme de synchronisation	Source des lipides	% lipides ration	Nature des acides gras supplémentés
Ambrose et al. (2006)	121 -	55±22	32 jours de gestation si gestante 32 jours après la 2 <sup>nd</sup> e IA programmée si non gestante	oui	Graines de tournesol aplaties (8.7% MS)	7,2	AG n-6
					Graines de lin aplaties (9.0 % MS)	7,2	Graine de lin
Petit and Twagiramungu (2006)	138 Date de vêlage Parité	0	50 jours de gestation 120 jours postpartum si non gestante	non	Megalac : savons de calciums d'huile de palme (3.8 % MS) <sup>1</sup>	6,6	AGS
					Graines de soja micronisées (17.7 % MS)	7,0	AG n-6
					Graines de lin entières (10.4 % MS)	8,1	Graine de lin
Fuentes et al. (2008)	356 Date de vêlage Production laitière Parité	25±3	semaine 20 postpartum	non	Graines de soja extrudées (4.9 % MS), savons de calciums d'huile de palme (1% MS)	5,8	AG n-6
					Graines de lin extrudées (5.5 % MS)	6,3	Graine de lin
Jahani-Moghadam et al. (2015)	399 Date de vêlage Parité NEC	0	semaine 6 postpartum	oui	Savons de calciums d'huile de palme distillée (1.6 % MS)	5,0	AGS
					Graines de lin extrudées (4.5 % MS)	5,1	Graine de lin

**Tableau 1.2** Effets d'une supplémentation en graines de lin sur les performances de reproduction observées dans les essais.

Publication	Intervalle vêlage-IA1	Intervalle vêlage-IA fécondante	Taux de conception IA1	Taux de conception IA2	Taux de gestation toutes IA	Mortalité 1ère IA	Mortalité 2ème IA	Mortalité embryonnaire	Mortalité embryonnaire précoce	Mortalité embryonnaire tardive	Taux de vêlage
Ambrose et al. (2006)	-	-	32.2 (19/59)	41.0 (16/40)	59.3 (35/59)	-	-	<b>27.3 (9/33)</b>	11.4 (4/35)	17.2 (5/29)	-
	-	-	48.4 (30/62)	37.5 (12/32)	67.7 (42/62)	-	-	<b>9.8 (4/41)</b>	4.8 (2/42)	5.1 (2/39)	-
Petit and Twagiramungu (2006)	-	-	55.9 (19/34)	46.7 (7/15)	64.7 (22/34)	<b>21.1 (4/19)</b>	0 (0/07)	<b>15.4 (4/26)</b>	-	-	61.8 (21/34)
	-	-	40.0 (16/40)	45.0 (9/20)	57.5 (23/40)	<b>12.5 (2/16)</b>	0 (0/9)	<b>8.0 (2/25)</b>	-	-	52.5 (21/40)
	-	-	44.4 (16/36)	43.8 (7/16)	63.9 (23/36)	<b>0 (0/16)</b>	0 (0/07)	<b>0 (0/23)</b>	-	-	58.3 (21/36)
Fuentes et al. (2008)	-	88	39.2	-	73.3 (121/165)	-	-	-	-	-	-
	-	92	38.8	-	65.8 (123/187)	-	-	-	-	-	-
Jahani-Moghadam et al. (2015)	<b>66,8</b>	87	48.2	-	92.6	-	-	-	-	-	-
	<b>60,3</b>	87	47.3	-	89.0	-	-	-	-	-	-

En gras, les différences significatives intra-essai. PP

Nous avons vu que la supplémentation en GLE ou en graines de lin sous d'autres formes a eu des effets positifs sur la fonction de reproduction (reprise cyclicité, dynamique folliculaire, environnement folliculaire et utérin, qualité de l'oocyte, qualité de l'embryon, survie embryonnaire) mais jamais sur les performances de reproduction. Les essais expérimentaux ont trop de facteurs limitants pour dégager des effets clairs sur les performances de reproduction (Tableau 1.1) : la diversité des témoins utilisés et des séquences de supplémentation, le nombre réduit de vaches associé à une puissance statistique faible (Wathes et al., 2013), la présence de protocoles de synchronisation, le difficile équilibre des groupes expérimentaux et le manque de contrôle des facteurs de confusion et d'ajustement. De plus, les quantités de lipides utilisées apparaissent très élevées au regard de l'utilisation de la GLE sur le terrain. Ainsi, une étude épidémiologique permettrait de s'affranchir de ces difficultés propres aux essais expérimentaux et d'évaluer les effets d'une supplémentation en GLE dans les conditions de son utilisation sur le terrain.

#### **4. Des effets de la GLE sur la santé de la vache laitière très peu étudiés**

Comme spécifié dans le titre nous nous concentrerons dans ce paragraphe essentiellement sur l'effet de la GLE sur la santé des vaches laitières, auxquelles sont distribués les GLE. Très brièvement, la santé des veaux pourrait être améliorée par la supplémentation en GLE de leur mère pendant la gestation favorable à l'absorption d'acides gras n-3 par transfert placentaire et un colostrum enrichi (Santschi et al., 2009; Or-Rashid et al., 2010; Moallem and Zachut, 2012; Lerch et al., 2015) et, in fine, par une amélioration du transfert d'immunité passive (Garcia et al., 2014a).

Chez la vache laitière, la période péripartum représente une phase de risque élevé de troubles de santé notamment des maladies infectieuses telles que les rétentions placentaires les métrites, ou les mammites (LeBlanc, 2010). L'apparition de ces troubles de santé peut entrainer durant la suite de la lactation des pertes de production ou influencer négativement sur leur reproduction. Le point commun à ces troubles de santé est qu'ils sont caractérisés par une réponse inflammatoire non maîtrisée de l'hôte. Les oxylipides sont des médiateurs de l'inflammation (Tam, 2013) synthétisés à partir des AGPI n-6 (AA) et n-3 (ALA, EPA, DHA) par oxydation via des voies enzymatiques ou non-enzymatiques. Les oxylipides synthétisés à partir des AG n-3 auraient des propriétés anti-inflammatoires tandis que ceux synthétisés à partir des AG n-6 auraient des propriétés pro-inflammatoires (Calder, 2013). La formation de ces oxylipides et donc la réponse inflammatoire sont aussi modulées par le stress oxydatif

(Mavangira and Sordillo, 2017). Il serait donc un des facteurs explicatifs de l'incidence des maladies du peripartum (Mavangira and Sordillo, 2017).

La réduction du stress oxydatif et le contrôle de la réponse inflammatoire via l'apport d'AGPI sont donc une piste thérapeutique pour limiter les risques des mammites (Raphael and Sordillo, 2013; Raphael et al., 2014; Mavangira et al., 2015; Ryman et al., 2017). En effet, la supplémentation en AGPI n-3 pourrait en agissant sur la synthèse des oxylipides, via la disponibilité des substrats, la modification des voies d'oxydation (enzymatique ou non) et le degré d'oxydation, modifier la réponse inflammatoire lors d'infections intra-mammaires (Ryman et al., 2017). La littérature scientifique reste très récente et commence seulement à s'intéresser à ces voies thérapeutiques. La complexité des mécanismes biologiques sous-jacents, ainsi que les interactions avec la nature de l'agent pathogène, la dose, la durée, et le timing de la supplémentation en AGPI exigent une grande prudence dans les hypothèses scientifiques à émettre sur l'effet d'une supplémentation en GLE sur les mammites. Cependant, on peut supposer que la GLE par son contenu en lignanes (puissants anti-oxydants) et en ALA doit interférer dans les processus d'oxydation et d'inflammation.

Le matériel scientifique à notre disposition au cours cette thèse nous a permis de mener une étude exploratoire sur le lien entre supplémentation en GLE et incidence des mammites subcliniques (i.e., étude d'un effet préventif) et persistance des mammites subcliniques (i.e., étude d'un effet curatif) à travers la concentration en cellules somatiques du lait (CCS) (Dohoo and Leslie, 1991).

## **5. Une seule étude des effets de la GLE sur le bilan économique d'une exploitation agricole réalisée à partir d'hypothèses peu documentées**

Une analyse coûts-bénéfices est nécessaire afin d'évaluer l'effet économique des effets zootechniques induits par l'utilisation de la GLE mais aussi afin de prendre en compte le coût alimentaire engendré par son utilisation.

Une seule étude (Béguin et al., 2009), réalisée par les réseaux d'élevage bovin lait de Nord-Picardie et de Haute-Normandie (Chambres d'Agriculture et Institut de l'Élevage), a été produite sur le sujet à notre connaissance. Son objectif était d'étudier l'impact technico-économique de l'utilisation d'un concentré à base de GLE sur un atelier bovin laitier par des simulations à partir de deux systèmes fourragers caractéristiques des deux régions : i) un système basé sur l'ensilage de maïs toute l'année avec 20 ares de pâturage par vache laitière, et un système plus pâturant (silo d'ensilage de maïs fermé pendant 4 mois) avec 40 ares de pâturage par vache laitière. Les hypothèses des effets de l'utilisation de la GLE ont été

limitées aux effets sur les performances de production : production laitière par vache et les taux de matières utiles (Tableau 1.3). Ces hypothèses sont issues d'un travail similaire réalisé par l'Institut de l'Élevage en 2006 à partir d'un cas-type d'élevage breton, ce dernier s'étant vraisemblablement appuyé sur des essais réalisés en station expérimentale dans les années 1990 (Brunschwig et al., 1995, 1997, 1998). Les simulations intègrent les modifications induites dans le système fourrager et le troupeau nécessaires à la réalisation du volume de lait à livrer (quota basé sur le quota matière grasse).

**Tableau 1.3** Effets simulés de la supplémentation d'un kilogramme d'un aliment composé de 70% de graines de lin extrudées sur la production laitière et les taux de matières utiles (Béguin et al., 2009).

Effet lait (kg/VL/jour)		Effet TB (g/kg)		Effet TP (g/kg)	
0-90 jours	Reste de la lactation	0-90 jours	Reste de la lactation	0-90 jours	Reste de la lactation
- 0,4	+ 1	- 3,5	- 3,5	- 0,3	- 1

Quel que soit le système fourrager, l'utilisation de la GLE entraîne une baisse de l'Excédent Brut d'Exploitation (EBE) (Tableau 1.4). Ce résultat apparaît logique étant donné les hypothèses retenues pour la réalisation des simulations.

**Tableau 1.4** Compensation financière nécessaire sur le prix du lait en €/1000L pour maintenir l'EBE initial suite à l'introduction de GLE dans la ration des vaches laitières soit i) pas de substitution du concentré initial ii) substitution partielle du concentré azoté (Béguin et al., 2009).

	Compensation financière (€/1000L)	
	Pas de substitution	Substitution partielle
Maïs toute l'année	10,9	4,7
Silo de maïs fermé 4 mois	9,2	5,8

Ces simulations sont intéressantes car elles répercutent le changement de stratégie d'apports d'aliments concentrés sur le système fourrager et le nombre de vaches laitières en gardant comme objectif la production du volume de lait prévu. De plus, les simulations intègrent aussi le pâturage permettant d'atteindre l'objectif de teneur en AGPI dans le lait en substitution/complément de la GLE selon les saisons. Cependant, la portée de leurs résultats est limitée par la prise en compte uniquement des effets induits par l'ingestion de GLE sur les performances de production. De plus, le choix des hypothèses sur les effets de la GLE semblent assez sévères même si elles sont en accord avec la synthèse réalisée par Brunschwig

et al. (2010). Enfin, la variabilité des réponses a été prise en compte seulement selon le stade de lactation, dont l'effet reste à caractériser.

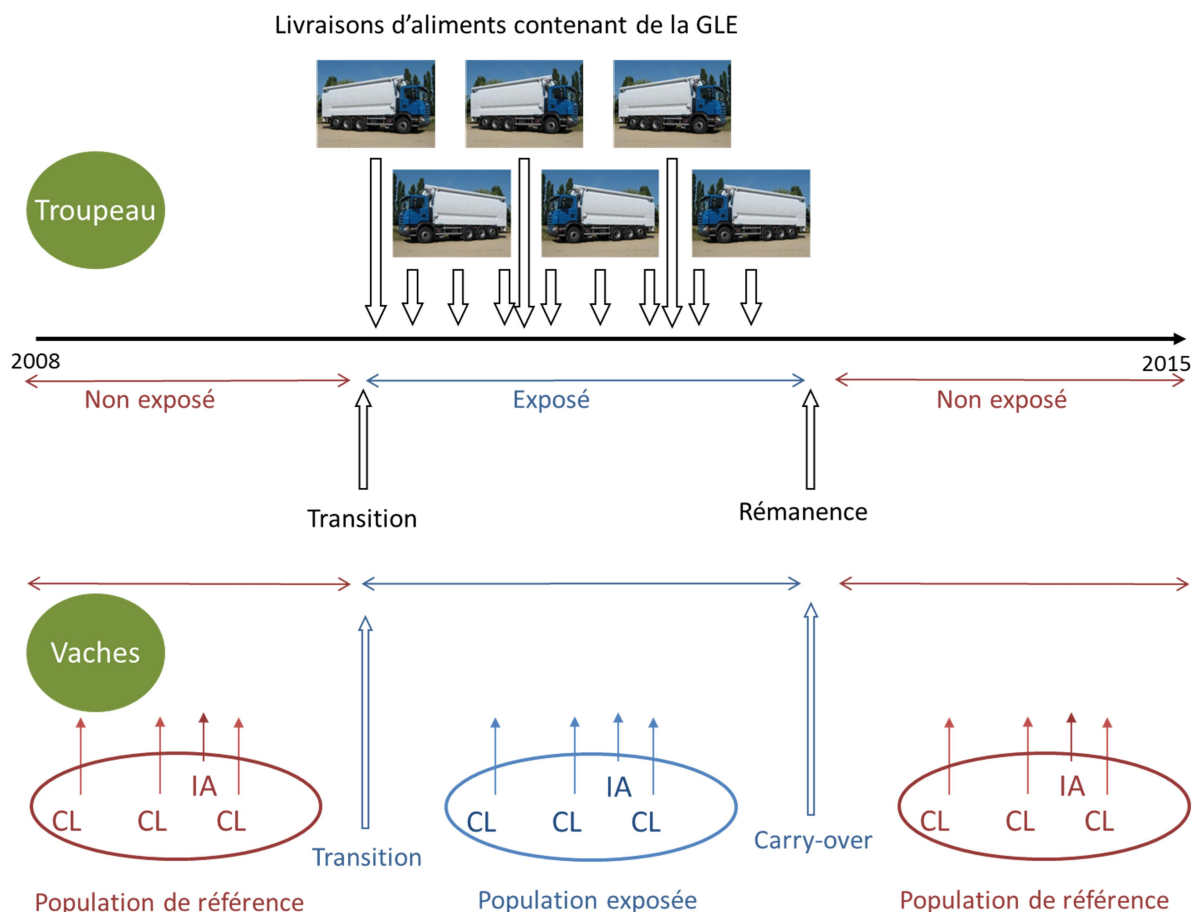
Une approche par simulations intégrant des effets sur les performances de production plus robustes et les effets sur la reproduction permettrait de caractériser plus finement les conséquences économiques de l'utilisation de la GLE en élevage bovin laitier.

### **C. Objectifs scientifiques et démarche de recherche**

L'objectif principal de la thèse est de produire des connaissances sur les effets de l'utilisation de la graine de lin extrudée sur les performances animales en élevage bovin laitier, puis d'en estimer les conséquences économiques au niveau de l'exploitation bovine laitière.

La méta-analyse est une démarche scientifique de revue critique et d'étude statistique de résultats de recherche antérieurs sur une problématique scientifique donnée. La méta-analyse permet en combinant les résultats de séries d'études indépendantes de dégager des lois de réponse et d'explorer leur variabilité sur la base du matériel scientifique à disposition. Ainsi, une méta-analyse des essais expérimentaux déjà nombreux permettrait d'explorer la variabilité des réponses animales en termes de production laitière en fonction de la dose et de la ration associée dans des conditions d'utilisation de la GLE en expérimentation.

L'épidémiologie est l'étude des phénomènes de santé et de leurs déterminants. Lors d'une étude observationnelle rétrospective, les conditions d'exposition des individus au facteur de risque considéré (i.e., la supplémentation de GLE) sont indépendantes du chercheur et l'exposition a eu lieu avant le début de l'étude. L'étude exposé/non exposé, sous-entendu la comparaison d'une population exposée au facteur de risque à une population non exposée au facteur de risque, permettra d'étudier les réponses animales en termes de santé dans des conditions d'utilisation de la GLE de terrain (Figure 1.1). Par extension, les méthodes d'épidémiologie peuvent être mobilisées pour étudier d'autres effets sur les animaux, en l'occurrence, la survenue d'évènements de reproduction et la production laitière. Ainsi, cette étude épidémiologique exposé/non exposé rétrospective complétera la méta-analyse afin d'étudier les réponses animales de production dans des conditions d'utilisation de la GLE de terrain. Elle permettra aussi de combler les lacunes de la littérature expérimentale pour étudier le lien entre apport de GLE et performances de reproduction : puissance statistique élevée, contrôle des facteurs d'ajustements des performances de la reproduction, affranchissement du choix de la ration témoin.

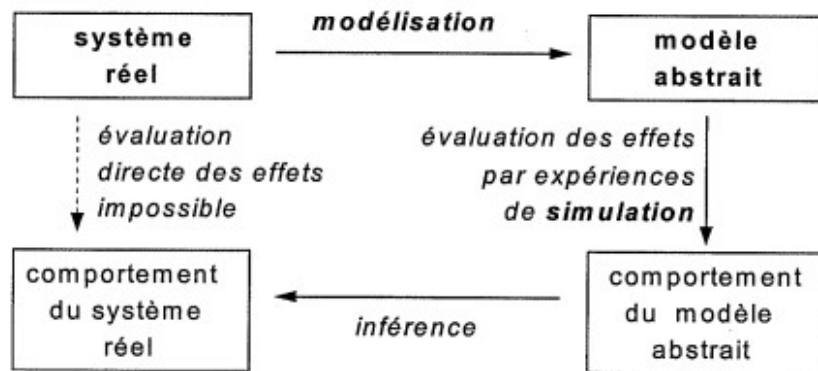


**Figure 1.1** Description du design général de l'étude rétrospective exposé/non-exposé au niveau d'un troupeau bovin laitier pour étudier l'effet d'une supplémentation en graines de lin extrudées sur les performances de production, de reproduction et de santé chez la vache laitière. L'exposition au niveau du troupeau est définie à partir des livraisons d'aliments contenant de la GLE sur l'exploitation agricole

(CL : performance laitière individuelle obtenue via le contrôle laitier ; IA : survenue d'une insémination artificielle connue via les données du centre d'insémination artificielle)

Enfin, une approche par modélisation-simulation, bien que reposant sur une représentation partielle de la réalité, permettrait de comparer plus facilement et rapidement les performances technico-économiques sur le moyen terme d'un même atelier laitier introduisant ou non la GLE dans la ration des vaches laitières. En effet, compte tenu des adaptations constantes des exploitations agricoles au cours du temps, il est impossible de quantifier spécifiquement les coûts-bénéfices par étude observationnelle. Ainsi, le recours à la modélisation du système réel puis l'évaluation des effets techniques et économiques d'une stratégie par simulation sont classiquement retenus (Figure 1.2) (Seegers et al., 1999), les

autres paramètres décrivant le système modélisé demeurant inchangés entre scénarios et dans le temps. Le modèle de fonctionnement d'atelier bovin laitier disponible au sein de l'UMR BIOEPAR (simulateur ECOMAST), modèle individu centré, dynamique et mécaniste (Dezetter et al., 2017), se révèle pertinent pour tester différentes stratégies d'apport de la GLE par un rapport à un scénario de référence (i.e., sans utilisation de la GLE). Ainsi, les réponses animales et leur variabilité observées dans les études précédentes seront utilisées comme paramètres différenciant les scénarios d'apport de GLE.



**Figure 1.2** Places respectives des processus de modélisation et de simulation scientifique mobilisées (Seegers et al., 1999; Dezetter, 2015).

Au final, cette thèse se compose de 3 chapitres (hors introduction générale et discussion générale) qui mobilisent ces trois approches scientifiques (Figure 1.3).

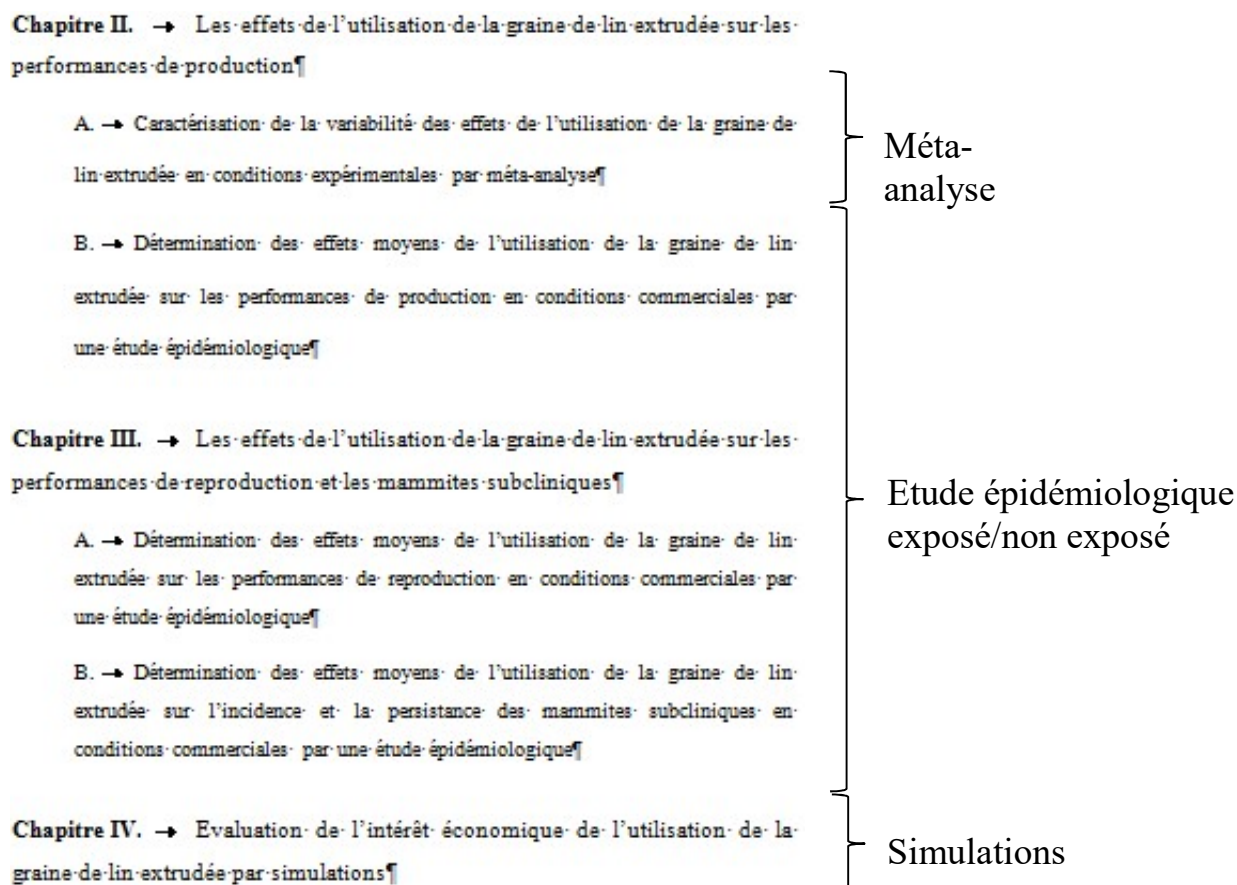


Figure 1.3 Approches scientifique mobilisées durant le travail de thèse



## **Chapitre II. Les effets de l'utilisation de la graine de lin extrudée sur les performances de production**

### **A. Caractérisation de la variabilité des effets de l'utilisation de la graine de lin extrudée en conditions expérimentales par méta-analyse**



## Effects of feeding extruded linseed on production performance and milk fatty acid profile in dairy cows: A meta-analysis

T. Meignan,\*<sup>†1</sup> C. Lechartier,‡ G. Chesneau,† and N. Bareille\*

\*BIOEPAR, INRA, Oniris, La Chantrerie, F-44307 Nantes, France

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

‡Unité de Recherche sur les Systèmes d'Élevage, Univ Bretagne Loire, Ecole Supérieure d'Agricultures, 55 rue Rabelais, F-49007 Angers, France

### ABSTRACT

The objectives of this study were to quantify the effects on production performance and milk fatty acid (FA) profile of feeding dairy cows extruded linseed (EL), a feed rich in  $\alpha$ -linolenic acid, and to assess the variability of the responses related to the dose of EL and the basal diet composition. This meta-analysis was carried out using only data from trials including a control diet without fat supplementation. The dependent variables were defined by the mean differences between values from EL-supplemented groups and values from control groups. The data were processed by regression testing the dose effect, multivariable regression testing the effect of each potential interfering factor associated with the dose effect, and then stepwise regression with backward elimination procedure with all potential interfering factors retained in previous steps. This entire strategy was also applied to a restricted data set, including only trials conducted inside a practical range of fat feeding (only supplemented diets with <60 g of fat/kg of dry matter and supplemented with <600 g of fat from EL). The whole data set consisted of 17 publications, representing 21 control diets and 29 EL-supplemented diets. The daily intake of fat from EL supplementation ranged from 87 to 1,194 g/cow per day. The dry matter intake was numerically reduced in high-fat diets. Extruded linseed supplementation increased milk yield (0.72 kg/d in the restricted data set) and decreased milk protein content by a dilutive effect (−0.58 g/kg in the restricted data set). No effect of dose or diet was identified on dry matter intake, milk yield, or milk protein content. Milk fat content decreased when EL was supplemented to diets with high proportion of corn silage in the forage (−2.8 g/kg between low and high corn silage-based diets in the restricted data set) but did not decrease when the diet

contained alfalfa hay. Milk *trans*-10 18:1 proportion increased when EL was supplemented to high corn silage-based diets. A shift in ruminal biohydrogenation pathways, from *trans*-11 18:1 to *trans*-10 18:1, probably occurred when supplementing EL with high corn silage-based diets related to a change in the activity or composition of the microbial equilibrium in the rumen. The sum of pairs 4:0 to 14:0 (FA synthesized de novo by the udder), palmitic acid, and the sum of saturated FA decreased linearly, whereas oleic acid, vaccenic acid, rumenic acid,  $\alpha$ -linolenic acid, and the sums of mono- and polyunsaturated FA increased linearly when the daily intake of fat from EL was increased. In experimental conditions, EL supplementation increased linearly proportions of potentially human health-beneficial FA in milk (i.e., oleic acid, vaccenic acid, rumenic acid,  $\alpha$ -linolenic acid, total polyunsaturated FA), but should be used cautiously in corn silage-based diets.

**Key words:** dairy cow, extruded linseed, milk yield, milk fatty acid, meta-analysis

### INTRODUCTION

The onset of lactation leads to profound physiological changes marked by a negative energy balance. Increasing the energy content of the diet should help limit the length and severity of the negative energy balance status while maintaining milk yield in high-producing dairy cows. Indeed, feeding fat to dairy cows could increase energy density of diets without increasing high-starch concentrate intake and reducing fiber intake, which are both negatively related to rumen function (Palmquist and Jenkins, 1980). However, the effects of fat addition to the diet on milk yield (MY; Rabiee et al., 2012), DMI (Allen, 2000), and milk fat content (MFC; Palmquist et al., 1993) are heterogeneous. These effects seem dependent on the nature of the fat supplement and its processing, the amount of fat supplemented (Jenkins, 1997), and the nature of the forage in the diet (Onetti and Grummer, 2004). Palmquist and Jenkins (1980) stated that the total fat in the diet should not exceed

Received August 9, 2016.

Accepted February 11, 2017.

<sup>1</sup>Corresponding author: [thomas.meignan@oniris-nantes.fr](mailto:thomas.meignan@oniris-nantes.fr)

6 to 8% of DM to avoid the negative effects of lipids on rumen function associated with a high-fat diet.

Increasing knowledge about the potential benefits of  $\alpha$ -linolenic acid (ALA; *cis*-9,*cis*-12,*cis*-15 18:3), long chain n-3 fatty acids (FA), and low n-6-to-n-3 ratio on human health (Simopoulos, 2008; Barceló-Coblijn and Murphy, 2009; Rajaram, 2014) has raised consumer demand for better nutritional quality of fat in dairy products. Considerable evidence exists that milk FA composition can be rapidly and widely modulated by adding oilseeds to the diets of dairy cows (Chilliard et al., 2007).

Linseed oil contains about 55% of ALA (Petit, 2010), the n-3 FA precursor of long chain n-3 FA. However, in ruminants, PUFA are largely biohydrogenated in the rumen before their absorption in the small intestine. Glasser et al. (2008c) estimated by meta-analysis that 87% of the ALA ingested was biohydrogenated in the rumen. Indeed, adding PUFA to the diet leads to the formation of many intermediates of biohydrogenation in the rumen, in interaction with the ruminal microorganisms ecosystem (Jenkins et al., 2008), including *trans* FA and precursors of CLA that may induce milk fat depression (Shingfield et al., 2010). The efficacy of ALA transfer into the duodenum thus depends on the degree to which ALA is protected against ruminal biohydrogenation.

The extrusion of oilseeds is a heat treatment that may protect UFA against ruminal biohydrogenation and the rumen environment against the adverse effects of UFA (Sterk et al., 2012). Indeed, Kennelly (1996) stated that heat treatment denatures the protein matrix surrounding the fat droplets, thus reducing the UFA availability for rumen microorganisms. However, the effects of extrusion on ruminal degradability of oilseeds are inconsistent in the literature (Dang Van et al., 2011; Troegeler-Meynadier et al., 2014). The analysis of the protective effect of extrusion on UFA obviously depends on the oilseed form taken for comparison (i.e., free oil, raw, technologically or chemically treated), and on the method of evaluation of UFA biohydrogenation (i.e., duodenal flows or milk FA profiles; Doreau et al., 2009). Another hypothesis on the mechanism of the potential protective effect of extrusion on UFA is that extrusion increases the rate of oil release in the rumen fluid, resulting in a higher bypass of PUFA from the rumen to the duodenum compared with whole and rolled seeds (Chilliard et al., 2009; Doreau et al., 2009). Indeed, Reddy et al. (1994) stated that extrusion ruptures fat micelles, thus increasing fat release and post-ruminal absorption compared with whole seeds (Sterk et al., 2010).

The use of extruded linseed (EL) in diet of dairy cows could both increase the energy density of the diet

and improve the milk FA profile while limiting the putative negative effects of PUFA on the rumen function. Glasser et al. (2008a) summarized the effects of various oilseed supplements (i.e., various sources and forms), including linseed supplements on MFC and milk FA using a meta-analysis approach. However, they pooled several linseed forms to obtain a sufficient amount of data. Extruded linseed was associated with micronized, ground, and whole linseeds in the analysis (Glasser et al., 2008a). The evaluation of the specific effects of EL supplementation was therefore limited. The study of factors describing basal diet composition as potential modulating factors to responses was also limited due to the scant available data in their subdata sets (Glasser et al., 2008a). Since the publication of the meta-analysis by Glasser et al. (2008a), the effects of EL supplementation in lactating dairy cow diets have been tested under multiple experimental conditions (Chilliard et al., 2009; Ferlay et al., 2010, 2013; Hurtaud et al., 2010; Lerch et al., 2012; Neveu et al., 2013, 2014; Oeffner et al., 2013); however, MY and milk composition responses to EL seem inconsistent (Petit, 2010). We hypothesized that the dose of EL and the composition of the basal diet could explain this variability. The objectives of our study were to quantify, using a meta-analysis approach, the effects of feeding dairy cows with EL on milk yield and milk components, including FA profile, and to assess whether the size of the dose supplemented and the composition of the basal diet could influence responses.

## MATERIALS AND METHODS

### Literature Search and Selection of Publications

Our literature search was conducted in the Web Of Science, Google Scholar, and CABI databases using the key words “extruded linseed,” “linseed,” “dairy,” “cow,” and “cattle,” as well as French terms in the database of peer-reviewed *Rencontres Autour des Recherches sur les Ruminants* conference proceedings. References cited in papers of interest were also included.

Inclusion criteria of studies defined a priori by authors were (1) study with lactating dairy cows, (2) control diet without fat supplementation, (3) treatment diet supplemented with EL only (i.e., no other form of linseed and no other lipid supplement), (4) absence of alfalfa protein concentrate in control and EL-supplemented diets because it is an alternative ALA source (Hurtaud et al., 2013); and (5) DMI measured. Furthermore, exclusion criteria were applied to obtain an adequate number of similar and sufficiently detailed milk FA profiles: (1) unknown measure methodology, and (2) inadequate quality of measure and inadequate FA profile (insufficient length of the capillary column

to separate methyl esters, insufficient percent of FA detected, insufficient FA detected).

### Data Collection and Processing

Production variables of interest extracted from published data were average DMI (kg/cow/d), MY (kg/cow/d), milk fat content (g/kg) and milk fat yield (MFY; g/cow per day), milk protein content (MPC; g/kg), and milk protein yield (MPY; g/cow per day). Afterward, 4% FCM (INRA, 2010) and 4% FCM:DMI ratios were calculated. The FA variables of interest were chosen to focus on reflecting the nutritional quality of milk for human health and both the rumen and cow metabolism according to the literature (Chilliard et al., 2007; Glasser et al., 2008a; Srednicka-Tober et al., 2016) and available data in our data set. Sum of pairs 4:0 to 14:0, palmitic acid (PA; 16:0), oleic acid (OA; *cis*-9 18:1), *trans*-10 18:1, vaccenic acid (VA; *trans*-11 18:1), rumenic acid (RA; *cis*-9,*trans*-11 CLA), linoleic acid (LA; *cis*-9,*cis*-12 18:2), ALA (*cis*-9,*cis*-12,*cis*-15 18:3), sum of SFA, MUFA, and PUFA were therefore considered as FA variables of interest to be extracted. Fatty acids were reported as grams per 100 g of total FA measured. Furthermore, PA:ALA and LA:ALA ratios were calculated.

Dependent variables then were calculated from these raw data. A dependent variable was defined as a response to EL supplementation. For instance, MFC response was calculated as

$$\Delta\text{MFC} = \text{MFC}_{\text{EL}} - \text{MFC}_{\text{control}}$$

where  $\Delta\text{MFC}$  = MFC response to EL supplementation,  $\text{MFC}_{\text{EL}}$  = average MFC from the EL-supplemented group, and  $\text{MFC}_{\text{control}}$  = average MFC from the control group.

The within-study differences approach enabled us to take into account a large part of the variability existing between experiments (Glasser et al., 2008a). A publication could contain more than 1 feeding trial (i.e., more than 1 control group) and each feeding trial could contain more than 1 EL-supplemented group (i.e., 1 control group related to several supplemented groups). Only 4 trials studied a dose-effect of EL supplementation. For example, Hurtaud et al. (2010) used 2 amounts of EL compared with 1 control; thus, 2 responses consequently were considered in the data set (i.e., 2 pairs of control and supplemented groups, 2 rows in the data set).

The explanatory variable used to study responses to the dose of EL (i.e., our first objective) was the daily intake of fat from EL supplementation per cow (FEL) to homogenize EL dose data. Various commercial prod-

ucts containing different doses of EL with different fat content were used in trials found in the database. For the calculation of FEL, the EL content and EL fat content (%) of each product were needed. The EL content and overall fat content of each commercial product (%) were extracted from papers, or authors were contacted if data were not presented (Pezzi et al., 2007; Oeffner et al., 2013; Livingstone et al., 2015). The EL fat content of each product then was calculated by using the overall fat content and the fat content of the other components of the commercial product with data from the INRA (2010) database. The EL fat content value from INRA (2010) was used only for one paper (Egger et al., 2007). Finally, daily intake of EL (grams per cow) was assessed through diet composition and total DMI. As the control group was not supplemented, the FEL within study variation was equal to the intake of fat from EL in the supplemented group.

Explanatory variables extracted to study the modulation of responses to EL supplementation by diet composition (i.e., our second objective) were proportion of concentrates (%), diet chemical composition (CP, NDF, ADF, starch, fat), energy level ( $\text{NE}_L$  expressed per kilogram of DM and also per cow per day), and forage nature. The forage nature of the diet was encoded into several qualitative variables according to the data distribution in our data set. It was characterized by the nature of the main forage (i.e., forage with the highest proportion in total forage), the proportion of corn silage (CS) in forage, and the inclusion of alfalfa hay. The main forage was categorized as corn silage, grass silage, hay, or alfalfa hay; the proportion of CS in forage as low CS-based diet (0 to 51% of total forage) or high CS-based diet (75 to 100% of total forage); and alfalfa hay as absent or present. These variables were considered as potential dietary interfering factors. In nutritional trials, within-study differences of nutritive components between experimental groups were ineluctable despite efforts made by experimenters to conduct trials with isoenergetic or isonitrogenous diets. Indeed, fat supplementation, and particularly large amounts of fat, replacing some of concentrates (carbohydrates and protein source as the control diet was not supplemented with a lipid source) modified the chemical composition of the diet other than just the fat content. Differences in nutritive components ( $\Delta\text{CP}$ ,  $\Delta\text{NDF}$ ,  $\Delta\text{ADF}$ ,  $\Delta\text{starch}$ ), energy level ( $\Delta\text{NE}_L$ ), and concentrates between control and supplemented diets could be possible confounding effects on the relationship between EL supplementation and dependent variables (Rabiee et al., 2012). Differences in nutritive components were therefore also studied as potential dietary interfering factors.

Additional experimental conditions were considered as potential interfering factors. Study design (Latin

square or randomized block), duration of the experimental feeding period, total number of animals in the trial and within each experimental group, animal factors (such as breed, DIM at the beginning of the experiment and parity), and value of the variable of interest of the control group were extracted.

In summary, the variables retained to explain responses to EL supplementation were the dose of EL assimilated to FEL as the main explanatory variable, some interfering factors related to the diet (including within-study differences of nutritive components), and additional interfering factors related to experimental conditions. The statistical unit was a pair of 1 control and 1 EL-supplemented group.

### Strategy and Statistical Analysis

In a first step, descriptive statistics including univariate analysis (mean, SD, ranges of values), correlations matrices, and graphical analyses were performed. These analyses enabled us to detect extreme data and to make assumptions about potential confounding factors. They also provided an illustration of the shape of possible relationships between responses to EL supplementation and explanatory variables.

In a second step, 1-sample *t*-test was performed to compare responses (i.e., dependent variables defined as the difference between mean values of a variable from the supplemented and control groups) with the value of zero to identify the main effects of EL supplementation without considering any potential interfering factors (i.e., explanatory variables).

In a third step, relationships between responses and FEL were evaluated using linear models. Nonlinear responses were tested by including FEL as both a linear and a quadratic term using the following model:

$$\Delta Y_i = \beta_0 + \beta_1 FEL_i + \beta_2 FEL_i^2 + \varepsilon_i,$$

where  $\Delta Y_i = Y$  response to extruded linseed supplementation in the *i*th pair of control and supplemented group,  $FEL_i$  = daily intake of fat from extruded linseed supplementation per cow in the *i*th supplemented group,  $\beta_0$  = intercept,  $\beta_1$  and  $\beta_2$  = regression coefficients, and  $\varepsilon_i$  = residual error  $\sim N(0, \sigma^2)$ .

In a fourth step, multivariable regressions, including FEL and a potential interfering factor among dietary factors and experimental factors, were conducted. The FEL was included as both a linear and a quadratic term. The potential interfering factors were included one by one in distinct models as a linear term and, depending on the type of the variable (quantitative or

categorical), as a quadratic term. At the end of this step, all variables with *P*-value < 0.10 were retained.

When the potential interfering factor was quantitative

$$\Delta Y_i = \beta_0 + \beta_1 FEL_i + \beta_2 FEL_i^2 + \beta_3 INTRF_i + \beta_4 INTRF_i^2 + \beta_5 FEL_i \times INTRF_i + \varepsilon_i,$$

and when the potential interfering factor was categorical

$$\Delta Y_i = \beta_0 + \beta_1 FEL_i + \beta_2 FEL_i^2 + \beta_3 INTRF_i + \beta_5 FEL_i \times INTRF_i + \varepsilon_i,$$

where  $\Delta Y_i = Y$  response to extruded linseed supplementation in the *i*th pair of control and supplemented group,  $FEL_i$  = daily intake of fat from extruded linseed supplementation per cow in the *i*th supplemented group,  $INTRF_i$  = potential interfering factor in the *i*th pair of control and supplemented group,  $\beta_0$  = intercept,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$ ,  $\beta_4$ , and  $\beta_5$  = regression coefficients, and  $\varepsilon_i$  = residual error  $\sim N(0, \sigma^2)$ .

In a fifth and final step, a stepwise regression with backward elimination procedure was carried out with only these variables using the same statistical model scheme as in step 4, but with several potential interfering factors.

In all of the models, collinearity of significant variables was measured by the variance inflation factor to control the overparameterization of models. The linear term was forced to remain in the model if it was contained in any quadratic term or 2-way interaction. At each step of these analyses, any observation associated with a studentized residual >3 or <-3 was defined as an outlier and the model was rerun without this observation (Sauvant et al., 2008). This process continued until no outliers remained. Models were evaluated using adjusted coefficient of determination and root mean square error. Models were validated with both graphical and statistical analysis of residuals distribution. All analyses were performed with software R (R Core Team, 2016).

This entire strategy (i.e., the 5 steps) was also applied on a data set including only trials conducted inside a practical range of fat feeding. To assess production responses to EL supplementation without lowering animal production due to large amounts of fat (Palmquist and Jenkins, 1980), only diets with a fat content of less than 60 g of fat/kg of DM were selected. This selection excluded 9 response data from which the rumen may have undergone adverse effects from feeding greater amounts of UFA (Jenkins, 1997). Furthermore, only

Table 1. References, experimental design, and main production variables used to assess the effects on lactational performances of extruded linseed supplementation to dairy cow diet

Publication	Study design <sup>2</sup>	Main forage <sup>3</sup>	Corn silage <sup>4</sup>	%C <sub>control</sub> <sup>5</sup>	%fat <sub>EL</sub> <sup>6</sup>	FEL <sup>7</sup> (g/cow per day)	Performance for control; $\Delta(Y_{EL} - Y_{control})^8$			
							DMI (kg/d)	MY (kg/d)	MFC (g/kg)	MPC (g/kg)
Brunschwig et al., 1995	CB19	CS	HCS	29	4.1	161	19.6; -0.6	34.9; -0.2	<b>39.6</b> ; -4.2	30.2; -0.1
Brunschwig et al., 1997	CB17	CS	HCS	28	3.4	87	19.6; -0.2	38.1; -1.4	39.9; -1.0	31.2; -0.1
					3.9	161	19.6; 0.0	38.1; -0.6	39.9; -2.1	31.2; -0.5
Brunschwig et al., 1998	CB19	CS	HCS	23	3.9	161	18.6; -0.3	<b>24.8</b> ; 1.4	40.4; -3.9	<b>33.5</b> ; -2.0
Chilliard et al., 2009 <sup>1</sup>	LS8	CS	HCS	34	7.0	980	<b>19.8</b> ; -3.1	23.0; -2.2	41.1; -5.8	34.0; -0.7
Egger et al., 2007	LS12	H <sup>3</sup>	LCS	34	5.7	403	17.7; 0.5	23.3; 0.2	40.9; 0.6	36.1; 0.0
Ferlay et al., 2010 <sup>1</sup>	CB24	CS	HCS	28	8.4	944	21.4; -2.1	27.3; 1.9	<b>42.2</b> ; -4.9	<b>33.8</b> ; -1.9
Ferlay et al., 2013 (1) <sup>1</sup>	LS4	H	LCS	50	3.6	366	20.9; -2.1	26.1; -0.3	<b>35.9</b> ; -0.9	30.5; -1.4
					5.2	784	20.9; -1.1	26.1; 2.2	<b>35.9</b> ; -0.9	30.5; -1.7
					6.4	1,194	20.9; -0.7	26.1; 1.9	<b>35.9</b> ; -6.8	30.5; -0.5
Ferlay et al., 2013 (2) <sup>1</sup>	LS4	CS	HCS	40	4.5	363	18.7; -0.5	25.3; -0.1	<b>33.8</b> ; -3.1	30.4; -1.5
					6.2	698	18.7; -1.0	25.3; -1.7	<b>33.8</b> ; -6.7	30.4; -0.5
					7.8	981	18.7; -2.0	25.3; -0.2	<b>33.8</b> ; -2.6	30.4; 0.2
Gonthier et al., 2005	LS4	GS	LCS	36	7.5	726	15.9; -0.4	21.1; -3.1	38.2; -2.6	34.1; -0.8
Hurtaud et al., 2010 <sup>1</sup>	CB12	CS	HCS	32	4.2	185	22.6; -0.5	<b>30.8</b> ; 1.7	<b>43.3</b> ; -5.1	<b>34.0</b> ; -1.4
					5.0	383	22.6; -0.4	<b>30.8</b> ; <b>2.8</b>	<b>43.3</b> ; -11.7	<b>34.0</b> ; -2.1
Hurtaud et al., 2012	CB8	CS	HCS	30	4.4	338	19.3; 0.0	29.5; 0.8	36.6; -5.8	29.6; -0.3
Lerch et al., 2012 (1) <sup>1</sup>	CB12	GS	LCS	29	6.6	548	20.2; -1.5	27.8; -0.5	35.8; 1.0	<b>29.9</b> ; -1.3
Lerch et al., 2012 (2) <sup>1</sup>	CB7	GS	LCS	39	6.5	626	20.8; -1.6	30.3; 0.7	33.3; -0.4	29.3; -2.3
Livingstone et al., 2015 (1) <sup>1</sup>	LS4	CS	HCS	50	4.0	275	20.3; 0.9	36.1; 1.3	33.0; 0.6	31.6; 0.5
Livingstone et al., 2015 (2) <sup>1</sup>	LS4	GS	LCS	50	3.7	255	19.2; 0.5	35.7; -0.3	38.9; -4.8	32.3; -0.5
Mathieu et al., 2008	CB17	CS	HCS	18	4.1	245	22.5; 0.8	<b>30.9</b> ; <b>2.9</b>	<b>42.7</b> ; -4.2	<b>33.5</b> ; -1.0
Neveu et al., 2013 <sup>1</sup>	LS20	A	LCS	60	3.0	344	26.2; 0.5	40.0; 1.4	30.4; -1.5	33.4; -0.2
Neveu et al., 2014 (1) <sup>1</sup>	LS16	A	LCS	41	2.7	343	<b>22.3</b> ; 0.9	30.9; 0.7	36.9; 0.5	31.5; -0.4
Neveu et al., 2014 (2) <sup>1</sup>	LS16	A	LCS	37	2.3	343	<b>22.1</b> ; 1.1	31.6; 0.8	36.5; 0.8	31.2; 0.1
Oeffner et al., 2013 <sup>1</sup>	LS10	A	LCS	41	4.6	260	<b>20.5</b> ; <b>0.9</b>	30.0; 0.4	42.0; 1.1	31.1; -0.4
					5.6	523	<b>20.5</b> ; <b>1.3</b>	30.0; 0.3	42.0; 0.8	31.1; -0.1
					6.5	783	<b>20.5</b> ; <b>2.5</b>	30.0; 0.2	42.0; 0.7	31.1; -0.2
Pezzi et al., 2007	CB10	CS	LCS	43	4.4	239	22.6; 0.3	30.7; 2.0	38.5; -0.6	32.0; 0.4

<sup>1</sup>Publications retained for fatty acids analysis. The number in parentheses indicates a different trial within a same publication (i.e., a different control group).

<sup>2</sup>CB = continuous block, LS = Latin square. The number associated with the letters indicates the number of animals by block experimental group.

<sup>3</sup>Main forage of control diet: CS = corn silage, H = hay, GS = grass silage, A = alfalfa hay.

<sup>4</sup>LCS = low corn silage-based diet (0 to 51% of total forage), HCS = high corn silage-based diet (75 to 100% of total forage).

<sup>5</sup>C<sub>control</sub> = proportion of concentrate in control diet (%).

<sup>6</sup>fat<sub>EL</sub> = fat content of extruded linseed supplemented diet. The fat content of extruded linseed supplemented diets in Brunschwig et al. (1998), Hurtaud et al. (2012), and Mathieu et al. (2008) were calculated according to INRA (2010).

<sup>7</sup>FEL = daily intake of fat from extruded linseed supplementation per cow (g/cow per day).

<sup>8</sup>MY = milk yield, MFC = milk fat content, MPC = milk protein content. In bold, significant within study differences ( $P < 0.05$ ; when considered individually).

supplemented diets with less than 600 g of fat from EL were included. This excluded one additional response data; this data set is referred to as the restricted dataset and was used to study all dependent variables except milk FA responses.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Meta-Design, Internal Consistency, and Reliability of Results

The data set used to study lactational responses to EL supplementation consisted of 17 publications, 21

trials (i.e., 21 control groups), and 29 EL-supplemented groups (Table 1), most published since 2009. It contained 29 statistical units (i.e., pairs of control and EL-supplemented groups). The FEL was, on average, 472 ( $\pm 297$ ;  $\pm$ SD) g/cow per day and varied from 87 to 1,194 g (Table 1). The fat content of EL-supplemented diets was, on average, 5.0% ( $\pm 1.59$ ) of DM and varied from 2.3 to 8.4% of DM. The main forage in the diet was CS for 15, alfalfa hay for 6, and both grass hay and grass silage for 8 out of 29 pairs of groups. Alfalfa hay was included in the diet for 7 pairs. In about half of the pairs of groups (15 out of 29), cows received a low CS-based diet (i.e., 0 to 51% of total forage) opposed to high CS-based diet (i.e., 75 to 100% of total forage).

Additional exclusion criteria were applied on the studies to examine milk FA responses. Data from Brunschwig et al. (1995, 1997, 1998), Egger et al. (2007), Pezzi et al. (2007), Mathieu et al. (2008), and Hurtaud et al. (2012) were excluded due to unknown measure methodologies and insufficiently precise milk FA profiles. Fatty acids data from Gonthier et al. (2005) were also excluded because of low precision that could be explained by the 60-m length of the capillary column used to separate methyl esters compared with the 100-m length used in the studies retained. The data set used to study milk FA responses to EL supplementation consisted of 9 publications, 13 trials (i.e., 13 control groups), and 20 EL-supplemented diets, all published since 2009. Data represented 20 statistical units (i.e., pairs of control and EL-supplemented groups).

The restricted data set, used to study lactational responses to EL supplementation inside a practical range of feeding fat, contained 19 statistical units (i.e., pairs of control and EL-supplemented groups). The FEL was, on average, 286 ( $\pm 107$ ) g/cow per day and varied from 87 to 523 g (Table 1). The fat content of EL supplemented diets was, on average, 4.1% ( $\pm 0.87$ ) of DM and varied from 2.3 to 5.7% of DM.

The study design was a Latin square for 17 out of the 29 pairs studied (Table 1). Lean et al. (2009) advised avoiding inclusion of Latin square experiments because of possible carryover effects from one period to another and difficulties studying stage of lactation. Duration of fat supplementation (i.e., short-term Latin square trials vs. long-term blocked feeding trials) may furthermore influence lactational (Block and Evans, 2010a) and milk FA responses (Roy et al., 2006). In our study, study design effect (Latin square vs. randomized block), number of animals (total number of animals in the trial and within each experimental group), and duration of feeding fat were tested in each model and found not to be significant for both lactational and milk FA responses. Potential effect of study design on responses to EL supplementation thus was rejected.

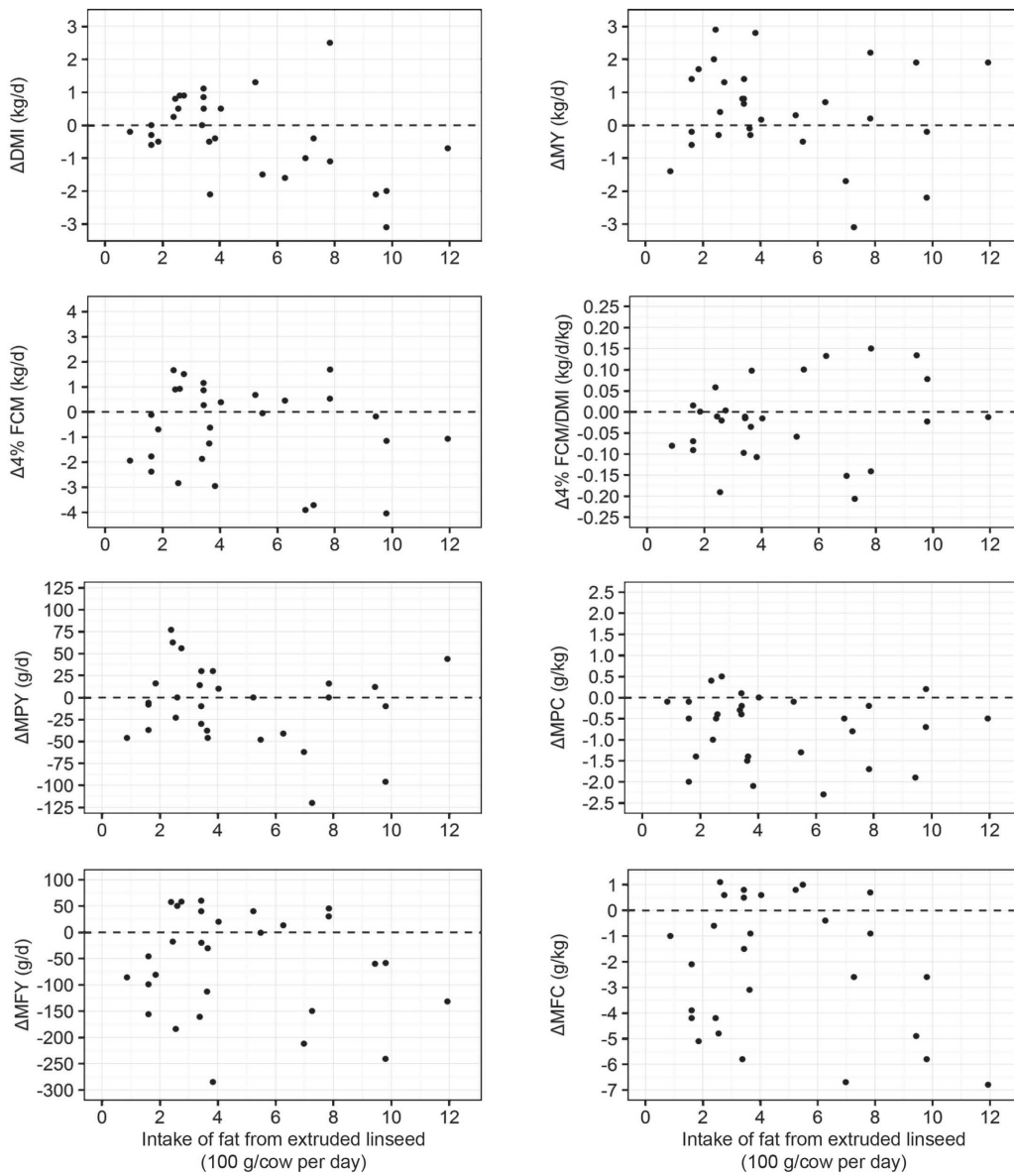
To study responses to EL supplementation, the dependent variables were within-experiment differences between supplemented and control groups. As the statistical unit was a pair of 1 control and 1 EL-supplemented group, multiple doses of EL related to the same control could be considered within a dose-effect trial. This induced a clustering effect resulting from multiple comparisons to a single control group within a trial (Rodney et al., 2015). Mixed models including a random study effect were therefore run for comparison purposes, but no differences in estimates were observed (data not shown). Rodney et al. (2015), moreover, indicated that the effect is minor unless very large numbers of repeated comparisons are present in

a data set, which was not the case in our study (only 5 trials out of 21).

#### **Intake, Milk Production, and Milk Protein Content Responses to EL Supplementation**

On average, DMI and MY were, respectively, 20.5 ( $\pm 2.16$ ) and 20.2 ( $\pm 2.47$ ) kg/d and 29.9 ( $\pm 5.07$ ) and 30.1 ( $\pm 5.32$ ) kg/d in control ( $n = 21$ ) and EL-supplemented groups ( $n = 29$ ). Within-study responses (when considered individually) were inconsistent and seldom significant ( $P < 0.05$ ; Table 1). The mean of within-study DMI responses was not significantly different from zero. However, all DMI within-study responses to supplemented diets with a fat content exceeding 60 g of fat/kg of DM and with a FEL higher than 600 g of fat/kg of DM were negative (with a mean decrease of 1.5 kg/d,  $n = 9$ ), except one with late-lactation cows in Oeffner et al. (2013; Table 1). The mean of within-study MY responses was not different from zero in the whole data set ( $\Delta MY = 0.45 \pm 0.546$ ,  $n = 29$ ;  $P = 0.108$ ), but was in the restricted data set ( $\Delta MY = 0.72 \pm 0.549$ ,  $n = 19$ ;  $P = 0.013$ ). On the contrary, the mean of within-study 4% FCM responses was different from zero in the whole data set ( $\Delta 4\% FCM = -0.68 \pm 0.654$ ,  $n = 29$ ;  $P = 0.042$ ), but was not in the restricted data set, probably due to the large decrease of MFC with high-fat diets (see further). The mean of within-study 4% FCM:DMI responses was not different from zero in the whole data set, but was different from zero in the restricted data set ( $\Delta 4\% FCM:DMI = -0.034 \pm 0.0309$ ,  $n = 19$ ;  $P = 0.033$ ). No effect of FEL, diet composition, or other interfering factors was observed on DMI, MY, 4% FCM, or 4% FCM:DMI responses (Figure 1).

Block and Evans (2010b), in a literature analysis, reported a mean decrease in DMI in high-fat diet. Rabiee et al. (2012), in a meta-analysis, indicated a significant negative DMI response ( $-0.21$  kg/d) and a null MY response to oilseeds supplementation; however, both responses presented a significant high heterogeneity. The heterogeneity could be explained with the differences in FA type within oilseeds and the diversity of control diets in Rabiee et al. (2012). A high proportion of unsaturated lipids could decrease diet digestibility by reducing fiber digestibility and so increase rumen fill (Allen, 2000; Doreau and Ferlay, 2015). Furthermore, they did not exclude control diets with fat supplementation. In our study, the energy level (per kg of DM) of supplemented diets was higher at high levels of fat inclusion. For the same amount of energy, cows thus needed a lower intake to meet requirements. Finally, DMI was positively correlated with MY response to fats overall (Rabiee et al., 2012). In our study, the en-



**Figure 1.** Within-study differences ( $\Delta$ ) of average DMI (kg/cow per day), milk yield (MY; kg/cow per day), 4% FCM:DMI (kg of milk/kg of DM per cow per day), milk protein yield (MPY; g/cow per day), milk protein content (MPC; g/kg), milk fat yield (MFY; g/cow per day), and milk fat content (MFC; g/kg) plotted with daily intake of fat from extruded linseed supplementation. For all responses,  $\Delta = 0$ : dotted line.



Table 2. Descriptive statistics (mean, SD, minimum, and maximum) of milk fatty acid (FA) composition in the control group and within study responses to extruded linseed (EL) supplementation in dairy cows

Item	n <sub>p</sub> <sup>1</sup>	n <sub>c</sub> <sup>2</sup>	Control				n <sub>EL</sub> <sup>3</sup>	Δ (= FA <sub>EL</sub> - FA <sub>control</sub> )			
			Mean	SD	Minimum	Maximum		Mean	SD	Minimum	Maximum
FA <sup>4</sup> (g/100 g of total FA)											
SFA	9	13	69.0	3.06	63.4	74.9	20	-10.6	6.84	-24.1	-0.9
Σ4:0 to 14:0	9	13	25.8	3.45	20.1	30.4	20	-5.67	4.347	-14.43	-0.03
PA (16:0)	9	13	31.9	3.07	26.0	38.1	20	-7.76	4.871	-18.18	-2.48
MUFA	9	13	25.1	3.00	19.8	28.7	20	8.16	5.755	-0.01	19.00
OA ( <i>cis</i> -9 18:1)	8	12	16.9	2.33	13.3	20.9	17	3.95	2.388	0.11	7.77
<i>trans</i> -10 18:1	6	9	0.48	0.216	0.27	0.92	14	1.40	1.449	-0.04	4.49
VA ( <i>trans</i> -11 18:1)	6	9	1.26	0.277	0.86	1.65	14	1.21	1.208	0.09	3.96
RA ( <i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11 CLA)	8	11	0.56	0.143	0.30	0.77	18	0.34	0.322	0.00	1.13
PUFA	9	13	3.68	0.589	2.47	4.70	20	2.04	1.311	0.27	4.85
LA ( <i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12 18:2)	8	12	1.75	0.306	1.35	2.30	17	0.00	0.128	-0.22	0.20
ALA ( <i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12, <i>cis</i> -15 18:3)	9	13	0.54	0.209	0.22	1.00	20	0.59	0.321	0.21	1.23
Ratio											
PA:ALA	9	13	71.5	41.38	26.0	173.3	20	-42.5	34.50	-154.3	-7.5
LA:ALA	8	12	3.97	1.765	2.06	7.52	17	-2.13	1.316	-4.97	-0.72

<sup>1</sup>n<sub>p</sub> = number of publications.<sup>2</sup>n<sub>c</sub> = number of control groups (i.e., number of trials).<sup>3</sup>n<sub>EL</sub> = number of extruded linseed supplemented groups.<sup>4</sup>4:0 to 14:0 = 4:0 + 6:0 + 8:0 + 10:0 + 12:0 + 14:0, PA = palmitic acid, OA = oleic acid, VA = vaccenic acid, RA = rumenic acid, LA = linoleic acid, ALA = α-linolenic acid.

ergy spared with the reduction in milk fat synthesis may have contributed to increase MY (Leroy et al., 2014) in the restricted data set, whereas the numerical decrease in DMI with high-fat diets may contribute to the null effect on MY in the whole data set.

On average, MPC was 32.1 (±1.83) and 31.1 (±1.82) g/kg and MPY was 954 (±159.7) and 930 (±178.8) g/d, respectively, in control (n = 21) and EL-supplemented groups (n = 29). The mean of within-study MPY responses was not different from zero, as observed in Rabiee et al. (2012) for all fat supplementations, but mean of within-study MPC responses was different from zero in both data sets (whole data set: ΔMPC = -0.71 ± 0.300, n = 29; P < 0.001; restricted data set: ΔMPC = -0.58 ± 0.371, n = 19; P = 0.004). No effect of FEL, diet composition, or other interfering factors was observed on MPY and MPC responses (Figure 1). When studies were considered individually, MPC responses were significantly negative only when corresponding MY responses were significantly positive (Table 1). We can therefore hypothesize that the MPC overall decrease was due to a dilutive effect.

#### Milk Fat Content and FA Profile Responses to EL Supplementation

Descriptive statistics of milk FA are presented in Table 2 and milk FA responses to EL supplementation are presented in Table 3 and Figure 2. When considered individually, FA responses were consistent in direction but wide in range (Table 2). The average within-study

responses of milk *trans*-10 18:1 and ALA proportions (i.e., mean of Δ*trans*-10 18:1 and ΔALA) to EL supplementation were higher than the mean of these milk FA contents in the control group (Table 2). All milk FA responses to FEL were significant (P < 0.001, Table 3), well estimated, and linearly dose-dependent, except the LA response. Intake of fat from extruded linseed explained a large part of the variability of responses (from 54% for OA response to 91% for VA response).

Our meta-analysis confirmed that EL supplementation improved the milk FA profile with potentially human health-beneficial FA (Table 3 Figure 2), even with inclusion of modest amount of EL. To illustrate our results, we chose to present the effects for a given amount of EL, namely 400 g of fat from EL (i.e., 1 kg of EL), because it is a level of supplementation that is practical to feed in commercial herds and is more sustainable than high-fat diets (Kliem et al., 2016). Indeed, for an intake of 1 kg of EL (i.e., 400 g of FEL with an EL fat content equal to 40% of DM), proportions of SFA, sum of pairs 4:0 to 14:0, and PA decreased by 7.27, 3.66, and 5.57 g/100 g of total FA, respectively, whereas proportions of MUFA, OA, VA, RA, PUFA, and ALA increased by 5.42, 2.99, 0.44, 0.17, 1.41, and 0.46 g/100 g of total FA, respectively. The magnitude of this improvement obviously depends on the milk FA profile before EL supplementation. To qualify the magnitude of these effects, references of milk ALA proportion obtained in 2 systems in western France based on data from commercial farms could be considered. Hurtaud et al. (2014) investigated 10 farms in each system, and

Table 3. Best fit responses of milk fatty acids (FA; g/100 g of total FA) to daily intake of fat from extruded linseed supplementation (100 g/cow per day) and according to the forage nature of the diet using the whole data set

Response variables ( $\Delta Y$ ) <sup>1</sup>	$n_{EL}$ <sup>2</sup>	Parameter <sup>3</sup>	Estimate	SE	<i>P</i> -value	Model statistics <sup>4</sup>		
						RMSE	$R^2_{adj}$	<i>P</i> -value
$\Delta SFA$	20	Intercept	1.116	1.4071	NS	2.8976	0.82	<0.001
		FEL	-2.096	0.2235	<0.001			
$\Delta \Sigma 4:0$ to 14:0	20	Intercept	1.401	1.0877	NS	2.2398	0.73	<0.001
		FEL	-1.265	0.1728	<0.001			
$\Delta PA$ (16:0)	20	Intercept	-0.068	1.3179	NS	2.7137	0.69	<0.001
		FEL	-1.376	0.2093	<0.001			
$\Delta MUFA$	20	Intercept	-1.505	1.2859	NS	2.6479	0.79	<0.001
		FEL	1.730	0.2042	<0.001			
$\Delta OA$ ( <i>cis</i> -9 18:1)	17	Intercept	0.671	0.8375	NS	1.6224	0.54	<0.001
		FEL	0.580	0.1308	<0.001			
$\Delta trans$ -10 18:1 <sup>5</sup>	12	Intercept	-0.908	0.4554	0.081	0.4870	0.90	<0.001
		FEL	0.277	0.0652	<0.001			
		HCS	-0.024	0.6073	NS			
		FEL:HCS	0.318	0.0975	0.012			
$\Delta VA$ ( <i>trans</i> -11 18:1)	11	Intercept	-0.168	0.1040	NS	0.1653	0.91	<0.001
		FEL	0.152	0.0154	<0.001			
$\Delta RA$ ( <i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11 CLA)	16	Intercept	-0.021	0.0603	NS	0.1100	0.61	<0.001
		FEL	0.048	0.0096	<0.001			
$\Delta PUFA$	20	Intercept	-0.173	0.2870	NS	0.5910	0.80	<0.001
		FEL	0.396	0.0456	<0.001			
$\Delta ALA$ ( <i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12, <i>cis</i> -15 18:3)	20	Intercept	0.107	0.0948	NS	0.1952	0.63	<0.001
		FEL	0.087	0.0151	<0.001			
$\Delta PA:ALA$ ratio	16	Intercept	8.114	6.9266	NS	6.0408	0.93	<0.001
		FEL	1.183	1.4110	NS			
		PA:ALA <sub>control</sub>	-0.476	0.1014	<0.001			
		FEL $\times$ PA:ALA <sub>control</sub>	-0.075	0.0266	0.013			
$\Delta LA:ALA$ ratio	17	Intercept	0.583	0.3488	NS	0.2716	0.96	<0.001
		FEL	0.055	0.0540	NS			
		LA:ALA <sub>control</sub>	-0.459	0.0736	<0.001			
		FEL $\times$ LA:ALA <sub>control</sub>	-0.059	0.0134	<0.001			

<sup>1</sup>A response was defined as the difference between the value from the extruded linseed-supplemented group and the control group ( $\Delta Y = Y_{EL} - Y_{control}$ ). 4:0 to 14:0 = 4:0 + 6:0 + 8:0 + 10:0 + 12:0 + 14:0, PA = palmitic acid, OA = oleic acid, VA = vaccenic acid, RA = rumenic acid, LA = linoleic acid, ALA =  $\alpha$ -linolenic acid.

<sup>2</sup> $n_{EL}$  = number of extruded linseed-supplemented groups.

<sup>3</sup>FEL = daily intake of fat from extruded linseed supplementation per cow (100 g/cow per day), LCS = low corn silage-based diet (0 to 51% of total forage), HCS = high corn silage-based diet (75 to 100% of total forage).

<sup>4</sup>RMSE = root mean squared error,  $R^2_{adj}$  = adjusted R-squared.

<sup>5</sup>Subgroups analyses: LCS  $\Delta trans$ -10 18:1 =  $-0.908 + 0.277 \times FEL$ ; HCS  $\Delta trans$ -10 18:1 =  $-0.932 + 0.595 \times FEL$ .

reported an average milk ALA proportion in feeding systems based on CS and herbage of, respectively, 0.44 and 0.78 g/100 g of total FA. With our models (Table 3), we can thus hypothesize that the ALA proportion will be increased by 100 and 50%, respectively, in CS and herbage feeding systems with 1 kg of EL supplementation. Under this hypothesis, EL supplementation can then be a major way to change the milk FA profile.

Decreases in PA and increase in ALA proportions did not seem to reach a plateau with EL supplementation. No models with a quadratic term in PA and ALA responses were retained, in contrast with findings from a previous meta-analysis on responses to linseeds (Glasser et al., 2008a), although the range of variation in the dose supplemented was similar. The authors hypothesized that ALA response to FEL was curvilinear because of the possible inhibitory effect of a strong

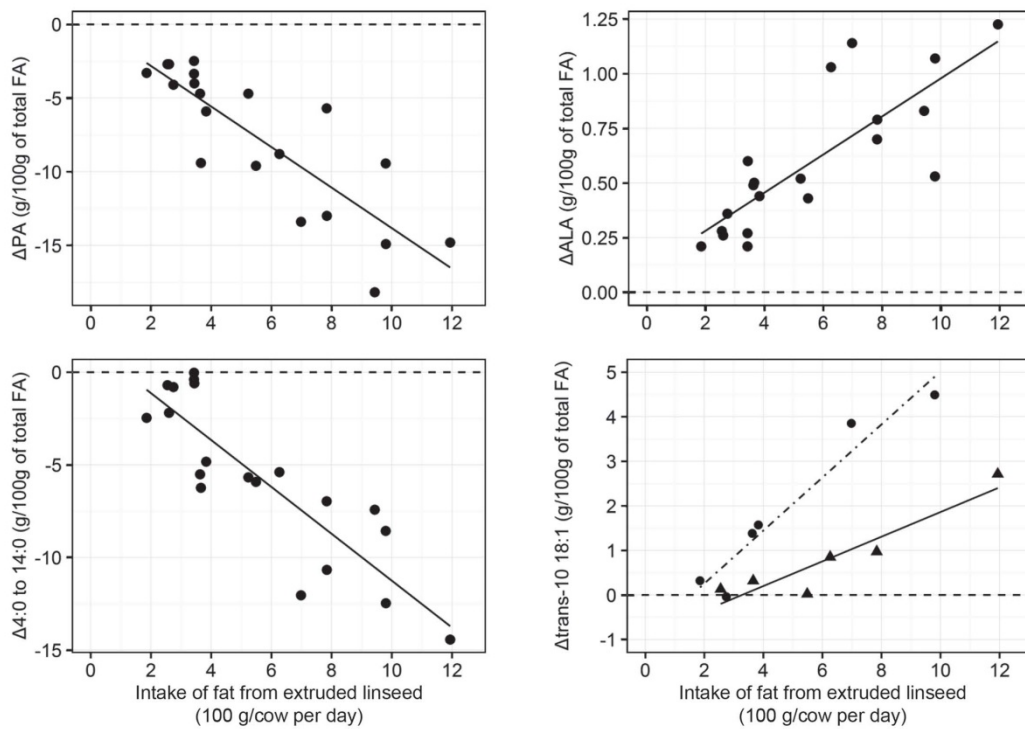
decrease in FA de novo synthesis on the incorporation of long-chain FA in milk fat (Glasser et al., 2008a,b). However, milk proportion of FA synthesized de novo also decreased linearly with the dose of EL in our meta-analysis. An increase in the number of data available on EL supplementation since Glasser et al. (2008a) may explain model differences. Moreover, contrary to Glasser et al. (2008a), we focused on responses to EL and not on responses to a pool of different forms of linseed.

Milk *trans*-10 18:1 proportion was increased by 0.20 to 1.45 g/100 g of total FA for an intake of 1 kg of EL (Table 3), depending on the forage composition in the diet. Caution should be taken with *trans*-10 18:1 proportion in milk regarding questions about its possible negative role in human health (Roy et al., 2007) and, more generally, possible negative effects of total

*trans* FA (not studied here; Mozaffarian et al., 2006). However, unlike *trans* FA from industrial sources, *trans* FA from ruminant sources were not associated with these negative effects in 2 recent systematic reviews and meta-analysis (Bendsen et al., 2011; de Souza et al., 2015). The value of 0.20 g of *trans*-10 18:1 on 100 g of total FA represents, respectively, 2 and 3 times the average values found in feeding systems based on CS and herbage in the study of Hurtaud et al. (2014).

On average, MFC and MFY were, respectively, 38.1 ( $\pm 3.55$ ) and 35.6 ( $\pm 4.21$ ) g/kg and 1,129 ( $\pm 190.5$ ) and 1,066 ( $\pm 227.8$ ) g/d in control (n = 21) and EL-supplemented groups (n = 29; Table 1, Figure 1). Milk fat content and MFY responses were estimated with moderate precision (Table 4). In the whole data set, MFC decreased linearly by 0.30 g/kg when FEL increased by 100 g/cow per day (n = 28;  $P = 0.031$ ; Table 4), whereas in the restricted data set no effect

of FEL on MFC was observed. When considering diets supplemented with EL in a practical range of feeding fat to dairy cows (i.e., the restricted data set), MFC did not decrease when FEL increased. No effect of FEL on MFY response was observed in both data sets. Still, our meta-analysis confirmed milk fat depression related to the ruminal biohydrogenation theory with the addition of PUFA to the diet (Shingfield et al., 2010). Both an increase of biohydrogenation intermediates and a decrease in precursors of fat synthesis could be related to the MFC decrease (Bauman and Griinari, 2001, 2003). Indeed, an increase of *trans*-10 18:1 was associated with low-fat milk syndrome (Bauman and Griinari, 2001, 2003), as it could exert an antilipogenic effect (Shingfield et al., 2010). An increase of *trans*-10 18:1 was highly correlated with decreases in MFC and MFY in our study (data not shown). Other intermediates of biohydrogenation associated with much evidence to the



**Figure 2.** Within-study differences ( $\Delta$ ) of average proportions in milk of palmitic acid (PA; 16:0), sum of pairs 4:0 to 14:0,  $\alpha$ -linolenic acid (ALA; *cis*-9,*cis*-12,*cis*-15 18:3), and *trans*-10 18:1 plotted with daily intake of fat from extruded linseed supplementation. For all responses,  $\Delta = 0$ : dotted line. For *trans*-10 18:1 response, LCS ( $\blacktriangle$ ) = solid line, HCS ( $\bullet$ ) = dashed and dotted line. LCS = low corn silage-based diet (0 to 51% of total forage), HCS = high corn silage-based diet (75 to 100% of total forage). FA = fatty acids.

Table 4. Best fit responses of milk fat content (g/kg) and milk fat yield (g/d) and to daily intake of fat from extruded linseed (EL) supplementation (100 g/cow per day) and according to the forage nature of the diet using the whole and the restricted data sets

Response variables ( $\Delta Y$ ) <sup>1</sup>	$n_{EL}$ <sup>2</sup>	Parameter <sup>3</sup>	Estimate	SE	<i>P</i> -value	Model statistics <sup>4</sup>		
						RMSE	$R^2_{adj}$	<i>P</i> -value
$\Delta MFC$	28	Intercept	0.68	0.858	NS	2.038	0.39	<0.001
		FEL	-0.30	0.131	0.031			
		HCS	-3.15	0.781	<0.001			
	<i>18</i>	Intercept	-3.03	0.482	<0.001	2.208	0.28	0.002
		Alfalfa (presence)	3.29	0.964	0.002			
		HCS	-2.76	0.922	0.009			
	<i>18</i>	Intercept	-0.44	0.652	NS	1.955	0.32	0.009
		HCS	-2.76	0.922	0.009			
		Alfalfa (presence)	-2.83	0.555	<0.001			
$\Delta MFY$	29	Intercept	3.01	0.961	0.006	1.922	0.34	0.006
		Alfalfa (presence)	-90	17.8	<0.001			
		HCS	127	36.2	0.002			
	<i>19</i>	Intercept	4	28.5	NS	83.4	0.29	0.002
		HCS	-102	39.3	0.019			
		Alfalfa (presence)	-75	18.4	0.001			
	<i>18</i>	Intercept	113	31.9	0.003	63.8	0.40	0.003
		HCS	-102	39.3	0.019			
		Alfalfa (presence)	-75	18.4	0.001			

<sup>1</sup>A response was defined as the difference between the value from the extruded linseed-supplemented group and the control group ( $\Delta Y = Y_{EL} - Y_{control}$ ). MFC = milk fat content; MFY = milk fat yield.

<sup>2</sup> $n_{EL}$  = number of supplemented diets with extruded linseed. In italics, data issued from the restricted data set including only diets with <60 g of fat/kg of DM and supplemented with <600 g of fat from extruded linseed.

<sup>3</sup>FEL = daily intake of fat from extruded linseed supplementation per cow (100 g/cow per day), LCS = low corn silage-based diet (0 to 51% of total forage), HCS = high corn silage-based diet (75 to 100% of total forage).

<sup>4</sup>RMSE = root mean squared error,  $R^2_{adj}$  = adjusted R-squared.

decrease of MFC, such as *trans*-10,*cis*-12 CLA (Baumgard et al., 2000), were not studied in our meta-analysis due to the limited available data in our data set. The contribution of a decrease of the substrates, acetate, and butyrate used to synthesize fat in the udder (especially sum of pairs 4:0 to 14:0) in the MFC drop cannot be excluded. Indeed, EL decreased linearly butyrate in hay-based diets and acetate and butyrate in CS-based diets, whereas propionate was increased, resulting in a shift of rumen fermentation patterns (Martin et al., 2016).

Extrusion may have played a role in the formation of biohydrogenation intermediates responsible for the decrease in MFC. We hypothesized, in the introduction, that extrusion may protect UFA from ruminal biohydrogenation (Kennelly, 1996; Doreau et al., 2009); the linear increase of milk in ALA content confirmed that hypothesis, even if the efficiency of extrusion to protect fat in comparison with other processes is inconsistent in the literature (Dang Van et al., 2011; Troegeler-Meynadier et al., 2014). A decrease in ALA biohydrogenation was generally observed, as well as an increase in biohydrogenation intermediates (Dang Van et al., 2011; Troegeler-Meynadier et al., 2014). Indeed, in a study comparing efficiency of the soybean heating process including extrusion on ruminal biohydrogenation, Troegeler-Meynadier et al. (2014) concluded that extrusion is the most efficient thermal treatment to op-

imize CLA content. However, 2 biohydrogenation pathways coexist in the rumen, *trans*-10 and *trans*-11, leading to 2 distinct CLA, respectively, the *trans*-10,*cis*-12 CLA, implied in MFC decrease, and RA, which has no effect on MFC (Baumgard et al., 2000; Shingfield et al., 2010). The importance of each biohydrogenation pathway depends on the microbial population of the rumen influenced by the composition of the diet (Pottier et al., 2006; Jenkins et al., 2008; Zened et al., 2013). We can conclude that extrusion protected PUFA of linseed from ruminal biohydrogenation favored biohydrogenation intermediates, but that the type of biohydrogenation intermediates was influenced by the composition of the diet. Finally, the efficacy of protection of linseed fat against ruminal biohydrogenation by extrusion seems dependent on the preconditioning of seeds before extrusion and on the conditions of the extrusion process (Doreau et al., 2009; Sterk et al., 2010, 2012). However, we were not able to test the conditions of the extrusion process as a potential interfering factor.

#### **Influence of Diet Composition on Responses to EL Supplementation**

Surprisingly, no effect of diet composition was observed on milk FA responses to EL supplementation, except an effect of the proportion of corn silage in total forage on *trans*-10 18:1 response (Table 3, Figure 2). As

a consequence, in commercial farms, the evolution of the milk FA profile after EL supplementation would be predictable with only the amounts of EL added to the diet no matter the nature of the diet. This result could have direct implications for advice given to farmers to reach target values of some milk FA proportions if any price compensation or a premium price was implemented to reward farmers for producing milk with a better nutritional quality based on the milk FA profile. However, this result should be used cautiously, as interactions between forage source, forage-to-concentrate ratio, chemical composition of the diet, and oilseed supplementation with milk FA evolution (other than *trans*-10 18:1) were demonstrated in many studies (DeWhurst et al., 2006; Chilliard et al., 2007; Kliem and Shingfield, 2016).

The variability of MFC and MFY responses was explained by the forage nature in the diet in almost all models (Table 4). Extruded linseed supplementation associated with high CS-based diet decreased MFC by 3.2 g/kg ( $n = 28$ ;  $P < 0.001$ ). When the diet contained alfalfa hay, EL supplementation did not decrease MFC, whereas when the diet did not contain alfalfa hay, EL supplementation decreased MFC by 3.0 g/kg ( $n = 28$ ;  $P = 0.002$ ). In the restricted data set, the effects of CS and alfalfa hay on MFC were similar to those observed in the whole data set ( $n = 18$ ;  $P = 0.009$  and  $0.006$ , respectively). In the whole data set, when the diet contained alfalfa hay, EL supplementation had no effect on MFY, whereas when the diet did not contain alfalfa hay, EL supplementation decreased MFY by 90 g/d ( $n = 29$ ;  $P = 0.002$ ). No effect of proportion of CS was observed in the whole data set. In the restricted data set, effect of alfalfa hay on MFY response was similar but EL supplementation associated with high CS-based diet decreased MFY by 102 g/d ( $n = 19$ ;  $P = 0.019$ ). Finally, the response of the milk *trans*-10 18:1 proportion to the increase of FEL was higher with high CS-based diet than with low CS-based diet ( $n = 12$ ;  $P < 0.001$ ; adjusted  $R^2 = 0.90$ ).

We hypothesized that the effect of CS proportion in forage on MFC response was related to the differential *trans*-10 18:1 response according to CS proportion, along with a putative decrease of acetate and butyrate substrates (Martin et al., 2016). Influence of corn silage proportion on *trans*-10 18:1 has 2 implications. First, EL supplementation associated with a high CS-based diet should be made with caution to avoid increasing this potentially human health-deleterious FA in milk. Second, the increase of *trans*-10 18:1 proportion in milk may reflect a more important disturbance on rumen fermentation patterns and a lower rumen pH with a high CS-based diet rather than a low CS-based diet (Weimer et al., 2010; Kliem and Shingfield, 2016). In-

deed, this may denote a modification of the composition or activity of rumen flora (Weimer et al., 2010; Zened et al., 2013) with EL supplementation in interaction with CS proportion in forage. As suggested by Zened et al. (2013), it can be hypothesized that the activity of cellulolytic bacteria, responsible for producing *trans*-11 18:1, was inhibited or the population decreased, or bacteria responsible for producing *trans*-10 18:1 were stimulated, leading to a novel microbial equilibrium in the rumen when feeding EL with high CS-based diet.

The *trans*-10 18:1 biohydrogenation pathway can occur only if there is a LA source in the diet and ALA being hydrogenated in VA (Zened et al., 2011). Extruded linseed contains small amounts of LA, whereas LA is the major FA (i.e., 45.8 g/100 g of total FA) in corn silage (Glasser et al., 2013). Inclusion of CS in the diet thus supplied LA for shift in *trans*-10 biohydrogenation pathway. Finally, an interaction between the proportion of CS in total forage and FEL was observed for the *trans*-10 18:1 response (Table 3, Figure 2). We can hypothesize that FEL increased *trans*-10 18:1 production because of toxic effect of PUFA, in particular ALA, on rumen bacteria implied in the *trans*-11 18:1 biohydrogenation pathway (Maia et al., 2010), even if Martin et al. (2016) did not notice modifications in concentrations of several cellulolytic bacteria with increasing supply of EL.

In our study, we were not able to display any effect of the forage-to-concentrate ratio or the NDF and starch contents of the diets. Looor et al. (2004) suggested that high-concentrate diets enhanced *trans*-10 18:1 production in the rumen, and Sterk et al. (2011), when feeding crushed linseed, observed that milk FA profile was influenced by the proportion of the concentrates. This may be due to the limited available data on *trans*-10 18:1 proportion ( $n = 12$ ) and not enough variation in forage levels and chemical characteristics of the diet between studies. Furthermore, NDF and starch digestibility were not studied.

Interestingly, the presence of alfalfa hay prevented a decrease in MFC after EL supplementation. This result is in accordance with the finding of Onetti and Grummer (2004), who studied lactational responses of dairy cows to 3 fat supplements as affected by the ratio of alfalfa to CS in the diet through a meta-analysis of the literature. Tallow decreased MFC and MFY when associated with a CS-based diet (60% or more of forage), but not with an alfalfa (60% or more of forage was alfalfa hay or alfalfa silage) or a mixed (ratio of alfalfa and CS from 41:59 to 59:41) diet (Onetti and Grummer, 2004). These effects were not observed for rumen-inert fat sources, as expected by those authors. Moreover, replacing CS by alfalfa hay overcame MFC depression after cottonseed or tallow supplementation in another

study (Smith et al., 1993). Presence of alfalfa hay could not be studied in *trans*-10 18:1 response due to lack of data. However, we can hypothesize that supply of LA and starch was decreased with the presence of alfalfa hay in the forage. Then, alfalfa hay could have acted as a buffer in the rumen with specific agents, increasing fiber content and average particle size of the diet, thus preventing from a decrease in rumen pH. In conclusion, addition of alfalfa hay to the diet may have led to favorable rumen conditions for the growth and activity of cellulolytic bacteria in the rumen at the expense of other bacteria implicated in MFC decrease.

### CONCLUSIONS

Despite the limited available published data, a rigorous review of papers on EL supplementation to dairy cows to select homogeneous data enabled us to obtain reliable results. Our meta-analysis highlighted that the responses of milk FA profile to EL supplementation were linearly dose-dependent. On the contrary, no effect of the dose of EL on DMI, MY, and milk components was observed with an EL supplementation inside a practical range of feeding fat to dairy cows. The study of milk FA suggested that ruminal fermentation patterns and biohydrogenation pathways seem to be disturbed when EL was associated with high corn silage-based diets, leading to a significant drop in MFC. However, inclusion of alfalfa hay in the diet may have avoided these perturbations. When supplementing EL inside a practical range of feeding fat to dairy cows, the milk FA profile was improved with increased potentially human health-beneficial FA (OA, VA, RA, ALA, and PUFA) and decreased PA and SFA, along with minor changes in animal performance.

### ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge S. Couvreur (Ecole Supérieure d'Agricultures, Angers, France) and A. Madouasse (BIOEPAR, INRA, Oniris, Nantes, France) for helpful discussions respectively on milk fatty acid data and R programming. We also acknowledge L. Delaby and C. Hurtaud (PEGASE, INRA, Agrocampus-Ouest, Saint-Gilles, France) for helpful discussions on the writing of this paper. We also acknowledge Valorex (Combournillé, France), Terrena (Ancenis, France) and Association Nationale de la Recherche et de la Technologie (ANRT, Paris, France) for financial support of a PhD student-ship.

### REFERENCES

- Allen, M. S. 2000. Effects of diet on short-term regulation of feed intake by lactating dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 83:1598–1624. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(00\)75030-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(00)75030-2).
- Barceló-Coblijn, G., and E. J. Murphy. 2009. Alpha-linolenic acid and its conversion to longer chain n-3 fatty acids: Benefits for human health and a role in maintaining tissue n-3 fatty acid levels. *Prog. Lipid Res.* 48:355–374. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2009.07.002>.
- Bauman, D., and J. Grinari. 2001. Regulation and nutritional manipulation of milk fat: low-fat milk syndrome. *Livest. Prod. Sci.* 70:15–29. [https://doi.org/10.1016/S0301-6226\(01\)00195-6](https://doi.org/10.1016/S0301-6226(01)00195-6).
- Bauman, D. E., and J. M. Grinari. 2003. Nutritional regulation of milk fat synthesis. *Annu. Rev. Nutr.* 23:203–227. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.23.011702.073408>.
- Baumgard, L. H., B. A. Corl, D. A. Dwyer, A. Sæbø, and D. E. Bauman. 2000. Identification of the conjugated linoleic acid isomer that inhibits milk fat synthesis. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 278:R179–R184.
- Bendsen, N. T., R. Christensen, E. M. Bartels, and A. Astrup. 2011. Consumption of industrial and ruminant trans fatty acids and risk of coronary heart disease: A systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Eur. J. Clin. Nutr.* 65:773–783. <https://doi.org/10.1038/ejcn.2011.34>.
- Block, E., and E. Evans. 2010a. A model to compare the effects of fat sources upon performance and dry matter intake: Effects of trial duration. *J. Dairy Sci.* 93(E-Suppl. 1):440. (Abstr.)
- Block, E., and E. Evans. 2010b. A model to compare effects of supplemental fat sources on performance and dry matter intake in dairy cows: Effects of fat inclusion level. *J. Dairy Sci.* 93(E-Suppl. 1):440. (Abstr.)
- Brunschwig, P., P. Augéard, P. Weill, and Y. Chilliard. 1995. Effects of feeding concentrate including fat to dairy cows fed maize silage. Pages 215–218 in *Proc. 2nd Rencontres Autour des Recherches sur les Ruminants*, Paris, France. Institut de l'Élevage, INRA, Paris, France.
- Brunschwig, P., P. Kernen, and P. Weill. 1997. Effects of feeding concentrate including polyunsaturated fat acids to dairy cows fed maize silage. Page 361 in *Proc. 4th Rencontres Autour des Recherches sur les Ruminants*, Paris, France. Institut de l'Élevage, INRA, Paris, France.
- Brunschwig, P., P. Kernen, and P. Weill. 1998. Effects of supplementation including polyunsaturated fat acids on dairy performances of cows in middle lactation. Page 262 in *Proc. 5th Rencontres Autour des Recherches sur les Ruminants*, Paris, France. Institut de l'Élevage, INRA, Paris, France.
- Chilliard, Y., F. Glasser, A. Ferlay, L. Bernard, J. Rouel, and M. Doreau. 2007. Diet, rumen biohydrogenation and nutritional quality of cow and goat milk fat. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 109:828–855. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200700080>.
- Chilliard, Y., C. Martin, J. Rouel, and M. Doreau. 2009. Milk fatty acids in dairy cows fed whole crude linseed, extruded linseed, or linseed oil, and their relationship with methane output. *J. Dairy Sci.* 92:5199–5211. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2375>.
- Dang Van, Q. C., L. Bejarano, E. Mignolet, D. Coulmier, E. Froidmont, Y. Larondelle, and M. Focant. 2011. Effectiveness of extruded rapeseed associated with an alfalfa protein concentrate in enhancing the bovine milk fatty acid composition. *J. Dairy Sci.* 94:4005–4015. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4204>.
- de Souza, R. J., A. Mente, A. Maroleanu, A. I. Cozma, V. Ha, T. Kishibe, E. Ulelyk, P. Budyłowski, H. Schiöenmann, J. Beyene, and S. S. Anand. 2015. Intake of saturated and trans unsaturated fatty acids and risk of all cause mortality, cardiovascular disease, and type 2 diabetes: Systematic review and meta-analysis of observational studies. *BMJ* 351:h3978 <https://doi.org/10.1136/bmj.h3978>.
- Dewhurst, R. J., K. J. Shingfield, M. R. F. Lee, and N. D. Scollan. 2006. Increasing the concentrations of beneficial polyunsaturated fatty acids in milk produced by dairy cows in high-forage systems. *Anim. Feed Sci. Technol.* 131:168–206. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2006.04.016>.
- Doreau, M., and A. Ferlay. 2015. Linseed: A valuable feedstuff for ruminants. *OCL* 22:D611. <https://doi.org/10.1051/ocl/2015042>.
- Doreau, M., S. Laverroux, J. Normand, G. Chesneau, and F. Glasser. 2009. Effect of linseed fed as rolled seeds, extruded seeds or oil on

- fatty acid rumen metabolism and intestinal digestibility in cows. *Lipids* 44:53–62. <https://doi.org/10.1007/s11745-008-3250-x>.
- Egger, P., G. Holzer, S. Segato, E. Werth, F. Schwienbacher, G. Peratoner, I. Andrighetto, and A. Kasal. 2007. Effects of oilseed supplements on milk production and quality in dairy cows fed a hay-based diet. *Ital. J. Anim. Sci.* 6:395. <https://doi.org/10.4081/ijas.2007.395>.
- Ferlay, A., M. Doreau, C. Martin, and Y. Chilliard. 2013. Effects of incremental amounts of extruded linseed on the milk fatty acid composition of dairy cows receiving hay or corn silage. *J. Dairy Sci.* 96:6577–6595. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-6562>.
- Ferlay, A., B. Martin, S. Lerch, M. Gobert, P. Pradel, and Y. Chilliard. 2010. Effects of supplementation of maize silage diets with extruded linseed, vitamin E and plant extracts rich in polyphenols, and morning v. evening milking on milk fatty acid profiles in Holstein and Montbéliarde cows. *Animal* 4:627. <https://doi.org/10.1017/S1751731109991224>.
- Glasser, F., M. Doreau, G. Maxin, and R. Baumont. 2013. Fat and fatty acid content and composition of forages: A meta-analysis. *Anim. Feed Sci. Technol.* 185:19–34. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2013.06.010>.
- Glasser, F., A. Ferlay, and Y. Chilliard. 2008a. Oilseed lipid supplements and fatty acid composition of cow milk: A meta-analysis. *J. Dairy Sci.* 91:4687–4703. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-0987>.
- Glasser, F., A. Ferlay, M. Doreau, P. Schmidely, D. Sauvant, and Y. Chilliard. 2008b. Long-chain fatty acid metabolism in dairy cows: A meta-analysis of milk fatty acid yield in relation to duodenal flows and de novo synthesis. *J. Dairy Sci.* 91:2771–2785. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0383>.
- Glasser, F., P. Schmidely, D. Sauvant, and M. Doreau. 2008c. Digestion of fatty acids in ruminants: A meta-analysis of flows and variation factors: 2. C18 fatty acids. *Animal* 2:691–704. <https://doi.org/10.1017/S1751731108002036>.
- Gonthier, C., A. F. Mustafa, D. R. Ouellet, P. Y. Chouinard, R. Berthiaume, and H. V. Petit. 2005. Feeding micronized and extruded flaxseed to dairy cows: Effects on blood parameters and milk fatty acid composition. *J. Dairy Sci.* 88:748–756. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)72738-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72738-7).
- Hurtaud, C., S. Buchin, F. Berodier, G. Duboz, and E. Beuvier. 2012. Effect of mixtures of food rich in omega 3 fatty acids on milk fatty acid composition and on physicochemical and sensory characteristics of hard cooked cheeses. Page 418 in *Proc. 19th Rencontres Autour des Recherches sur les Ruminants*, Paris, France. Institut de l'Élevage, INRA, Paris, France.
- Hurtaud, C., G. Chesneau, D. Coulmier, and J. L. Peyraud. 2013. Effects of extruded linseed or alfalfa protein concentrate in interaction with two levels of concentrates on milk production and composition in dairy cows. *Livest. Sci.* 158:64–73. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2013.10.002>.
- Hurtaud, C., M. Dutreuil, M. Coppa, C. Agabriel, and B. Martin. 2014. Characterization of milk from feeding systems based on herbage or corn silage with or without flaxseed and authentication through fatty acid profile. *Dairy Sci. Technol.* 94:103–123. <https://doi.org/10.1007/s13594-013-0147-0>.
- Hurtaud, C., F. Faucon, S. Couvreur, and J.-L. Peyraud. 2010. Linear relationship between increasing amounts of extruded linseed in dairy cow diet and milk fatty acid composition and butter properties. *J. Dairy Sci.* 93:1429–1443. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2839>.
- INRA. 2010. Alimentation des bovins, ovins et caprins—Besoins des animaux—Valeurs des aliments. Tables INRA 2007. Mise à jour 2010. Editions Quae, Versailles, France.
- Jenkins, T. C. 1997. Success of fat in dairy rations depends on the amount. *Feedstuffs* 69:11–12.
- Jenkins, T. C., R. J. Wallace, P. J. Moate, and E. E. Mosley. 2008. Board-invited review: Recent advances in biohydrogenation of unsaturated fatty acids within the rumen microbial ecosystem. *J. Anim. Sci.* 86:397–412. <https://doi.org/10.2527/jas.2007-0588>.
- Kennelly, J. J. 1996. The fatty acid composition of milk fat as influenced by feeding oilseeds. *Anim. Feed Sci. Technol.* 60:137–152.
- Kliem, K.E., D.J. Humphries, C.K. Reynolds, R. Morgan, and D.I. Givens. 2016. Effect of oilseed type on milk fatty acid composition of individual cows, and also bulk tank milk fatty acid composition from commercial farms. *Animal* 11:354–364. <https://doi.org/10.1017/S1751731116001403>.
- Kliem, K. E., and K. J. Shingfield. 2016. Manipulation of milk fatty acid composition in lactating cows: Opportunities and challenges. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 118:1661–1683. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201400543>.
- Lean, I. J., A. R. Rabiee, T. F. Duffield, and I. R. Dohoo. 2009. Invited review: Use of meta-analysis in animal health and reproduction: Methods and applications. *J. Dairy Sci.* 92:3545–3565. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2140>.
- Lerch, S., A. Ferlay, D. Pomiès, B. Martin, J. A. A. Pires, and Y. Chilliard. 2012. Rapeseed or linseed supplements in grass-based diets: Effects on dairy performance of Holstein cows over 2 consecutive lactations. *J. Dairy Sci.* 95:1956–1970. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4575>.
- Leroy, J. L., R. Sturmey, V. Van Hoeck, J. De Bie, P. McKeegan, and P. Bols. 2014. Dietary fat supplementation and the consequences for oocyte and embryo quality: Hype or significant benefit for dairy cow reproduction? *Reprod. Domest. Anim.* 49:353–361. <https://doi.org/10.1111/rda.12308>.
- Livingstone, K. M., D. J. Humphries, P. Kirton, K. E. Kliem, D. I. Givens, and C. K. Reynolds. 2015. Effects of forage type and extruded linseed supplementation on methane production and milk fatty acid composition of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 98:4000–4011. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8987>.
- Loor, J. J., K. Ueda, A. Ferlay, Y. Chilliard, and M. Doreau. 2004. Biohydrogenation, duodenal flow, and intestinal digestibility of trans fatty acids and conjugated linoleic acids in response to dietary forage:concentrate ratio and linseed oil in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 87:2472–2485. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)7372-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)7372-X).
- Maia, M. R., L. C. Chaudhary, C. S. Bestwick, A. J. Richardson, N. McKain, T. R. Larson, I. A. Graham, and R. J. Wallace. 2010. Toxicity of unsaturated fatty acids to the biohydrogenating ruminal bacterium, *Butyrivibrio fibrisolvens*. *BMC Microbiol.* 10:52. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-52>.
- Martin, C., A. Ferlay, P. Mosoni, Y. Rochette, Y. Chilliard, and M. Doreau. 2016. Increasing linseed supply in dairy cow diets based on hay or corn silage: Effect on enteric methane emission, rumen microbial fermentation, and digestion. *J. Dairy Sci.* 99:3445–3456. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10110>.
- Mathieu, Y., M. Fougere, Y. Bergot, P. Dermerle, P. Brunschwig, and V. Chatellier. 2008. Effect of extruded linseed concentrate on the milk content and production of dairy cows. Page 117 in *Proc. 15th Rencontres Autour des Recherches sur les Ruminants*, Paris, France. Institut de l'Élevage, INRA, Paris, France.
- Mozaffarian, D., M. B. Katan, A. Ascherio, M. J. Stampfer, and W. C. Willett. 2006. Trans fatty acids and cardiovascular disease. *N. Engl. J. Med.* 354:1601–1613. <https://doi.org/10.1056/NEJMr054035>.
- Neveu, C., B. Baurhoo, and A. Mustafa. 2013. Effect of feeding extruded flaxseed with different forage:concentrate ratios on the performance of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 96:3886–3894. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-6189>.
- Neveu, C., B. Baurhoo, and A. Mustafa. 2014. Effect of feeding extruded flaxseed with different grains on the performance of dairy cows and milk fatty acid profile. *J. Dairy Sci.* 97:1543–1551. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-6728>.
- Oeffner, S. P., Y. Qu, J. Just, N. Quezada, E. Ramsing, M. Keller, G. Cherian, L. Goddick, and G. Bobe. 2013. Effect of flaxseed supplementation rate and processing on the production, fatty acid profile, and texture of milk, butter, and cheese. *J. Dairy Sci.* 96:1177–1188. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5941>.
- Onetti, S. G., and R. R. Grummer. 2004. Response of lactating cows to three supplemental fat sources as affected by forage in the diet and stage of lactation: A meta-analysis of literature. *Anim. Feed Sci. Technol.* 115:65–82. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2004.02.009>.

- Palmquist, D. L., A. Denise Beaulieu, and D. M. Barbano. 1993. Feed and animal factors influencing milk fat composition. *J. Dairy Sci.* 76:1753–1771. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(93\)77508-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(93)77508-6).
- Palmquist, D. L., and T. C. Jenkins. 1980. Fat in lactation rations. *J. Dairy Sci.* 63:1–14. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(80\)82881-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(80)82881-5) (Review).
- Petit, H. V. 2010. Review: Feed intake, milk production and milk composition of dairy cows fed flaxseed. *Can. J. Anim. Sci.* 90:115–127. <https://doi.org/10.4141/CJAS09040>.
- Pezzi, P., M. Giammarco, G. Vignola, and N. Brogna. 2007. Effects of extruded linseed dietary supplementation on milk yield, milk quality and lipid metabolism of dairy cows. *Ital. J. Anim. Sci.* 6:333–335. <https://doi.org/10.4081/ijas.2007.1s.333>.
- Pottier, J., M. Focant, C. Debier, G. De Buysser, C. Goffe, E. Mignolet, E. Froidmont, and Y. Larondelle. 2006. Effect of dietary vitamin E on rumen biohydrogenation pathways and milk fat depression in dairy cows fed high-fat diets. *J. Dairy Sci.* 89:685–692. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72131-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72131-2).
- R Core Team. 2016. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Rabiee, A. R., K. Breinhild, W. Scott, H. M. Golder, E. Block, and I. J. Lean. 2012. Effect of fat additions to diets of dairy cattle on milk production and components: A meta-analysis and meta-regression. *J. Dairy Sci.* 95:3225–3247. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4895>.
- Rajaram, S. 2014. Health benefits of plant-derived linolenic acid. *Am. J. Clin. Nutr.* 100:443S–448S. <https://doi.org/10.3945/ajcn.113.071514>.
- Reddy, P. V., J. L. Morrill, and T. G. Nagaraja. 1994. Release of free fatty acids from raw of processed soybeans and subsequent effects on fiber digestibilities. *J. Dairy Sci.* 77:3410–3416. [http://dx.doi.org/https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(94\)77283-0](http://dx.doi.org/https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(94)77283-0).
- Rodney, R. M., P. Celi, W. Scott, K. Breinhild, and I. J. Lean. 2015. Effects of dietary fat on fertility of dairy cattle: A meta-analysis and meta-regression. *J. Dairy Sci.* 98:5601–5620. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9528>.
- Roy, A., J.-M. Chardigny, D. Bauchart, A. Ferlay, S. Lorenz, D. Durand, D. Gruffat, Y. Faulconnier, J.-L. Sébédio, and Y. Chilliard. 2007. Butters rich either in trans-10–C18:1 or in trans-11–C18:1 plus cis-9, trans-11 CLA differentially affect plasma lipids and aortic fatty streak in experimental atherosclerosis in rabbits. *Animal* 1:467. <https://doi.org/10.1017/S175173110770530X>.
- Roy, A., A. Ferlay, K. J. Shingfield, and Y. Chilliard. 2006. Examination of the persistency of milk fatty acid composition responses to plant oils in cows given different basal diets, with particular emphasis on trans-C18:1 fatty acids and isomers of conjugated linoleic acid. *Anim. Sci.* 82:479–492. <https://doi.org/10.1079/ASC200658>.
- Sauvant, D., P. Schmidely, J. J. Daudin, and N. R. St-Pierre. 2008. Meta-analyses of experimental data in animal nutrition. *Animal* 2:1203–1214. <https://doi.org/10.1017/S1751731108002280>.
- Shingfield, K. J., L. Bernard, C. Leroux, and Y. Chilliard. 2010. Role of trans fatty acids in the nutritional regulation of mammary lipogenesis in ruminants. *Animal* 4:1140–1166. <https://doi.org/10.1017/S175173110000510>.
- Simopoulos, A. P. 2008. The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. *Exp. Biol. Med.* (Maywood) 233:674–688. <https://doi.org/10.3181/0711-MR-311>.
- Smith, W. a., B. Harris, H. H. Van Horn, and C. J. Wilcox. 1993. Effects of forage type on production of dairy cows supplemented with whole cottonseed, tallow, and yeast. *J. Dairy Sci.* 76:205–215. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(93\)77339-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(93)77339-7).
- Šrednicka-Tober, D., M. Barański, C. J. Seal, R. Sanderson, C. Benbrook, H. Steinshamm, J. Gromadzka-Ostrowska, E. Rembialkowska, K. Skwarlo-Sojta, M. Eyre, G. Cozzi, M. K. Larsen, T. Jordon, U. Niggli, T. Sakowski, P. C. Calder, G. C. Burdge, S. Sotiraki, A. Stefanakis, S. Stergiadis, H. Yolcu, E. Chatzidimitriou, G. Butler, G. Stewart, and C. Leifert. 2016. Higher PUFA and n-3 PUFA, conjugated linoleic acid,  $\alpha$ -tocopherol and iron, but lower iodine and selenium concentrations in organic milk: A systematic literature review and meta- and redundancy analyses. *Br. J. Nutr.* 115:1043–1060. <https://doi.org/10.1017/S0007114516000349>.
- Sterk, A., R. Hovenier, B. Vlaeminck, A. M. van Vuuren, W. H. Hendriks, and J. Dijkstra. 2010. Effects of chemically or technologically treated linseed products and docosahexaenoic acid addition to linseed oil on biohydrogenation of C18:3n-3 in vitro. *J. Dairy Sci.* 93:5286–5299. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3144>.
- Sterk, A., B. E. O. Johansson, H. Z. H. Taweel, M. Murphy, A. M. van Vuuren, W. H. Hendriks, and J. Dijkstra. 2011. Effects of forage type, forage to concentrate ratio, and crushed linseed supplementation on milk fatty acid profile in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 94:6078–6091. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4617>.
- Sterk, A., B. Vlaeminck, A. M. van Vuuren, W. H. Hendriks, and J. Dijkstra. 2012. Effects of feeding different linseed sources on omasal fatty acid flows and fatty acid profiles of plasma and milk fat in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 95:3149–3165. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4474>.
- Troegeler-Meynadier, A., S. Puaut, Y. Farizon, and F. Enjalbert. 2014. Effects of the heating process of soybean oil and seeds on fatty acid biohydrogenation in vitro. *J. Dairy Sci.* 97:5657–5667. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7783>.
- Weimer, P. J., D. M. Stevenson, and D. R. Mertens. 2010. Shifts in bacterial community composition in the rumen of lactating dairy cows under milk fat-depressing conditions. *J. Dairy Sci.* 93:265–278. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2206>.
- Zened, A., F. Enjalbert, M. C. Nicot, and A. Troegeler-Meynadier. 2013. Starch plus sunflower oil addition to the diet of dry dairy cows results in a trans-11 to trans-10 shift of biohydrogenation. *J. Dairy Sci.* 96:451–459. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5690>.
- Zened, A., A. Troegeler-Meynadier, M. C. Nicot, S. Combes, L. Cauquil, Y. Farizon, and F. Enjalbert. 2011. Starch and oil in the donor cow diet and starch in substrate differently affect the in vitro ruminal biohydrogenation of linoleic and linolenic acids. *J. Dairy Sci.* 94:5634–5645. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4491>.



**B. Détermination des effets moyens de l'utilisation de la graine de lin extrudée sur les performances de production en conditions commerciales par une étude épidémiologique**

**Supplementing dairy cow diet with extruded linseed is associated with increased milk yield: an observational study** (soumis à Animal)

T. Meignan<sup>1,2</sup>, A. Madouasse<sup>1</sup>, F. Beaudou<sup>1</sup>, C. Lechartier<sup>3</sup> and N. Bareille<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *BIOEPAR, INRA, Oniris, La Chantrerie, F-44307 Nantes, France*

<sup>2</sup> *Valorex, La Messayais, F-35210 Combourtille, France*

<sup>3</sup> *Unité de Recherche sur les Systèmes d'Élevage (URSE), Ecole Supérieure d'Agricultures (ESA), Université Bretagne Loire, 55 rue Rabelais, F-49007 Angers, France*

Corresponding author: Nathalie Bareille. Email: [Nathalie.bareille@oniris-nantes.fr](mailto:Nathalie.bareille@oniris-nantes.fr)

Short title: Feeding extruded linseed to dairy cows

**1. Abstract**

The objective of this retrospective study was to quantify the average effects of supplementing extruded linseed (EL), a feed rich in  $\alpha$ -linolenic acid, to dairy cows on milk yield, milk fat content and milk protein content under field conditions. Exposure statuses were defined according to the time sequence and the amount of EL distributed in the herd. Data were obtained from companies delivering commercial products containing EL. The reference population was composed of cows that did not receive EL within herds that were supplied at least 4 times with EL deliveries during the study period from 2008 to 2015. Mean daily EL intake in exposed population was 297 ( $\pm$  236.5) g/cow/d. This study was performed on 1 204 herds, 194 056 Holstein cows, 400 522 lactations, and 1 997 763 test day records by using linear mixed models adjusted for factors likely to influence milk performance and with a first order autoregressive covariance structure within lactations. The following dose-dependent associations were observed with increasing daily EL intake: an increase in milk yield (+1.4 to +3.4%), a moderate decrease in milk fat content (-0.3 to -2.4%), and a slight decrease in milk protein content (-0.1 to -0.4%). This study provides unique information about the consequences of supplementing omega-3 fatty acids on cow performance at a commercially sustainable level under field conditions.

Keywords: dairy cow, extruded linseed, milk yield, observational study

## 2. Implications

This observational study based on a large dataset from French commercial farms highlighted that extruded linseed supplementation to dairy cows had beneficial effects on milk yield and reduced moderately milk fat content under field conditions. Farmers willing to modify the fatty acid composition of the milk to improve human health face higher feed costs but could be rewarded by better animal performance.

## 3. Introduction

For human health, there is a need to improve milk fatty acid (FA) profile by increasing polyunsaturated fatty acids (PUFA) at the expense of saturated fatty acids (SFA) or by rebalancing the ratio n-6/n-3 (Simopoulos, 2002b, 2008; Rajaram, 2014) as milk and milk-derived products represent a major part of FA supply and especially SFA (Kliem *et al.*, 2017). Extruded linseed (EL) is a source of fat of which 54% of total FA is  $\alpha$ -linolenic acid (ALA, 18:3 n-3) (Petit, 2010). Its incorporation into dairy cow diets can modify the milk FA profile in a way that could improve human health (Meignan *et al.*, 2017). There has been a growing use of EL in French farms in the last decade, primarily to modify the milk FA profile (Doreau and Ferlay, 2015), but also now to improve cow performance.

Feeding dairy cows with high-fat feeds could enhance their energy balance status by increasing the dietary energy density without increasing the dietary starch content. Consequently, supplemental fat in the diet could improve milk yield (MY) in particular in early lactation when energy supply does not meet the requirements for maintenance and production (Onetti and Grummer, 2004). However, selecting the proper dietary fat content is an important management decision that may affect the success of this supplementation (Jenkins, 1997). Considering amounts of fat may be even more relevant when supplementing PUFA because of the formation of ruminal biohydrogenation intermediates that exert anti-lipogenic effects leading to a decrease in milk fat content (MFC) (Shingfield and Grinari, 2007; Shingfield *et al.*, 2010). Meignan *et al.* (2017), in a meta-analysis of experimental trials, observed a mean increase in MY of +0.72 kg/d solely when supplementing EL inside a practical range (i.e., < 60 g of fat per kg of DM and < 600 g of fat from EL in the diet) whereas no effect was observed when considering high-fat diets. Besides, supplementing EL to dairy cows decreased MFC at high inclusion level or when associated with high corn silage-based diets (Meignan *et al.*, 2017).

Because of its high cost, EL supplementation is restricted under field conditions (Kliem *et al.*, 2017). Very few experiments have evaluated the effects associated with supplementing EL at low levels such as those used in commercial farms and explored variation inside this practical range. Consequently, there is a considerable need to elucidate animal production responses to EL under field conditions to evaluate the profitability for a farmer of including EL in the dairy cow diets.

The objective of this observational study was to quantify the average effects of supplementing EL to dairy cows on MY and milk composition under field conditions.

#### **4. Material and methods**

##### ***a) General study design and available data***

A retrospective observational study was carried out based on data from French dairy herds enrolled in the official Milk Recording Scheme and wherein EL was supplemented to dairy cows between January 2008 and December 2015. Milk performance of cows at each test day (TD, over 24h) during periods of EL supplementation were compared to the one of cows at each TD during periods of EL non-supplementation within the same herd. The deliveries of commercial feeds containing EL were obtained from companies in France selling products TRADILIN® (Tradi-Lin® Technology, Patent No. EP 1021 960 B1). TRADILIN® products are almost the only feeds with EL sold in France. The extrusion process of linseeds incorporated into these products is protected by a European patent. Thus, the study population consisted of 4 979 French dairy herds having used feeds with EL during the study period. However, the herd identification number was needed in order to link data from deliveries to data from the official Milk Recording Scheme. The sample size was reduced to 2 599 herds due to a lack of herd identification number, and then to 2 250 herds due to a lack of enrollment in the official Milk Recording Scheme. Additionally, in order to obtain a sufficient number of test days exposed to EL within a herd, only 1 836 herds with a minimum of four deliveries of feeds with EL during the study period were retained. Finally, the absence of fit between the periods of EL delivery and milk data, as well as missing data in deliveries reduced sample size to 1 415 herds.

Lactation data obtained were calving date, parity, date of TD, MY, MFC and milk protein content (MPC) at each TD. Animal data obtained were breed and movements (i.e., date of arrival and date of departure within herd).

***b) Estimation of exposure to extruded linseed and determination of exposure status***

A cow daily exposure to EL for each delivery in each herd was calculated from the duration of TRADILIN® products delivery distribution, the quantity delivered, the products' EL content, and the average number of lactating cows in the herd during the delivery distribution. We considered that the beginning of EL supplementation to dairy cows in each herd occurred immediately the day after the date of feed arrival on the farm. The daily number of cows in each herd was calculated based on movements data and test-day records. We considered that all cows (i.e., whatever their lactation stage and MY) were supplemented with the same EL quantity within a herd. When a farm distributed several feeds containing EL at the same time (i.e., on the same day), herd daily exposures from each delivery were added. To sum up, at this step, a mean EL intake by cow by herd for each day of the study period was calculated.

Exposure status was determined within a herd at the cow-TD level. In order to limit classification bias as a cow in late lactation had a smaller probability to be supplemented with EL, all TDs occurring after 180 days in milk were excluded from the study. A cow-TD was considered exposed only if the cow was supplemented with EL continuously since the previous TD (or since its calving in the case of the first TD within a lactation). For each cow-TD, an average daily EL exposure during the interval between TD and previous TD (or TD and calving) was calculated by adding each daily exposure (from each day of this interval), estimated as described above, divided by the number of days of this interval. The exposure variable was categorized into several levels of EL daily intake: 0 (i.e., unexposed), ]0, 50], ]50, 300], ]300, 600] and ]600, 1 500] g/cow/d based on EL use on the field. We considered that estimated EL daily intakes higher than 1 500 g/cow/d (0.13 % of cow-TD) were inaccurate and related lactations were removed. This upper limit was chosen based on our previous work (Meignan et al., 2017) defined as the upper limit of the practical range of EL supplementation to dairy cows (i.e., 600 g of fat from EL considering 40% of fat in EL). In order to increase the reliability of the results by increasing precision of exposure temporal sequence and to limit classification bias, two additional modalities of the exposure variable were considered : (i) transition (TR) for the first TD after beginning EL supplementation (ii) carry-over (CO) for the first TD after stopping EL supplementation. The quantity of EL intake was not defined for these modalities because the exposure duration was too variable between cow-TDs. Our hypothesis was that effects associated with TR and CO modalities were low

compared to full-time exposure. In summary, the exposure variable accounted for both the dose and minimal time of exposure.

For each herd, all cow-TDs recorded in the Milk Recording Scheme during the study period were considered for the study. All the cow-TDs that were defined as not exposed constituted the unexposed reference population. This enabled the comparison of lactational performance within the same herd, thereby controlling for farming and climatic conditions (Nusinovici et al., 2013)

### *c) Data selection*

Herds with unusual management (i.e., < 10 calvings per year and with < 15 or > 65 percent of primiparous cows) were excluded. Only data from Holstein cows were included because of the strong effect of breed on MY and milk contents. Only lactations that lasted at least 180 days were included. Only lactations beginning after 1 January 2008 and before 6 July 2015 were selected, respectively to limit classification bias by knowing the exposure status since calving and to allow studying lactation during 180 days. In addition, cows and/or lactations with missing, implausible or unusual data were excluded: age at first calving < 22 months or > 40 months, calving to first TD < 7 days, interval between TD < 22 days or > 73 days, milk contents equal to zero at TD. This data selection reduced sample size to 1,204 herds.

### *d) Statistical models*

The statistical unit was the cow-TD. Previous studies have found that studying association between MY and disease exposure by a repeated measure approach (i.e., TD records) was more relevant than by a single measure (i.e., cumulated MY over a lactation) (Gröhn et al., 1999; Nusinovici et al., 2013). Besides, considering the EL daily exposure estimation and the hypothesis of EL short term effect, studying the association between EL exposure and milk performance with repeated measures seemed more informative and more accurate. The effect of EL exposure on MY, MFC and MPC was assessed using linear mixed models. The analysis was stratified by parity (1, 2, 3, 4 and 5+) to avoid potential confounding because the shape of the lactation curve and MY vary according to parity (Nusinovici et al., 2013). To account for factors likely to influence milk performance, the model was adjusted for several independent variables (Gröhn et al., 1999; Nusinovici et al., 2013): age at first calving (for primiparous only), days in milk, month of TD, year of TD, geographic area. In addition, an autoregressive covariance structure of order 1 was

implemented to model the association among repeated TDs within lactation (Madouasse et al., 2016):

$$\begin{aligned}\varepsilon_t &= \Phi \times \varepsilon_{t-1} + \eta_t \\ \eta_t & \text{ Normal}(0, \sigma^2)\end{aligned}$$

where  $\varepsilon_t$  = residual from TD<sub>t</sub>,  $\Phi$  = correlation parameter between error terms on consecutive measurements from a cow during a lactation,  $\varepsilon_{t-1}$  = residual from TD<sub>t-1</sub>,  $\eta_t$  = residual error from TD<sub>t</sub>.

Finally, a herd random effect was added to the models to adjust for the nonindependence of cows within herds and to take into account notably diseases and nutrition management differences between herds:

$$\begin{aligned}Y_{ijt} &= \alpha + \text{EXP}_{ijt} + \text{DIM}_{ijt} + \text{MO}_{ijt} + \text{YR}_{ijt} + \text{PA}_{ijt} + \nu_j + \varepsilon_t \\ \nu_j & \text{ Normal}(0, \sigma^2)\end{aligned}$$

where  $Y_{ijt}$  = daily milk performance (MY, MFC or MPC) record of a cow i in herd j at time t,  $\alpha$  = overall mean,  $\text{EXP}_{ijt}$  = exposure (7 levels),  $\text{DIM}_{ijt}$  = days in milk (26 levels, corresponding to 5 days-periods in early lactation and 10 days-periods in mid lactation),  $\text{MO}_{ijt}$  = month of TD (12 levels),  $\text{YR}_{ijt}$  = year of TD (8 levels),  $\text{PA}_{ijt}$  = geographic area (7 levels),  $\nu_j$  = herd j random effect,  $\varepsilon_t$  = residual from TD at time t described above.

All statistical analyses were performed in R (version 3.3.2) (R Core Team, 2016) using the function lme from the package nlme (version 3.1-128).

## 5. Results

### a) *Distribution of data and unadjusted milk performance*

The final sample was composed of 1 204 herds, 194 056 cows, 400 522 lactations, and 1 997 763 TDs or statistical units (Table 2.5). Almost half of the TDs selected were unexposed. Nearly 78% of the exposed TDs were at levels ]50, 300] or ]300, 600] g/cow/d. Mean daily EL intake in exposed population was 297 ( $\pm$  236.5) g/cow/d. Means of MY, MFC and MPC were respectively 32.0 ( $\pm$  7.59) kg/d, 38.6 ( $\pm$  6.49) g/kg and 30.7 ( $\pm$  2.87) g/kg in the reference population, and respectively 33.1 ( $\pm$  7.76) kg/d, 37.9 ( $\pm$  6.35) g/kg and 30.5 ( $\pm$  2.76) g/kg in the whole exposed population (cow-TDs at TR and CO excluded). The number of TDs decreased with increasing parity with more than 35% of TDs related to primiparous cows (Table 2.6). Within all levels of exposure, MY increased by parity until

parity 4, as MFC from parity 1 to parity 5+ (Table 2.5), whereas MPC reached a maximum at parity 2 and then decreased.

***b) Dose-dependent increase of milk yield associated with exposure to extruded linseed***

Exposure to EL was associated with an increase in MY in a dose-response manner, except for the low exposure level ]0, 50] g/cow/d (Table 2.6). Based on means of MY within parity within EL exposure level presented in Table 2.5, MY increased from 1.4% for the low-moderate exposure level ]50, 300] g/cow/d to 2.6% for the high exposure level ]600, 1 500] g/cow/d within parity 1, while within parity 4 MY increased from 2.1% to 3.4%. Milk yield associated with TR and CO modalities was intermediate compared to other significant exposure levels ( $P < 0.001$ ; Table 2.6).

***c) Dose-dependent decrease of milk fat content associated with exposure to extruded linseed***

Exposure to EL was associated with a decrease in MFC in a dose-response manner, except for the low exposure level ]0, 50] g/cow/d (Table 2.7). Within parity 1, MFC decreased from 0.3% for the low-moderate exposure level ]50, 300] g/cow/d to 0.9% for the high exposure level ]600,1 500] g/cow/d, while within parity 4, MFC decreased from 1.1% to 2.4%. Milk fat content associated with TR and CO modalities was slightly decreased ( $P < 0.001$ ; Table 2.7), and mostly lower than other significant exposure levels.

***d) Dose-dependent decrease of milk protein content associated with exposure to extruded linseed***

Exposure to EL was associated with a slight decrease in MPC in a dose-response relationship (Table 2.8), except within parity 1. Within parity 2, MPC decreased from 0.1% for the low-moderate exposure level ]50, 300] g/cow/d to 0.3% for the high exposure level ]600,1 500] g/cow/d while within parity 4 MPC decreased from 0.3% to 0.4%. Exposure modalities TR and CO were seldom significant (Table 2.8).

***e) Adjustment variables associated with milk performance***

All adjustment variables were significantly associated with MY, MFC and MPC (Table 2.9). Days in milk and month of TD were closely related to MY, MFC and MPC. Effect of days in milk on MY, MFC, MPC respectively had a range of variation of 7.5 kg/d with a minimum and a maximum respectively reached at ]35,40] and ]170,180] days, 8.3 g/kg with a minimum and a maximum respectively reached at ]90,100] and [7,10] days, 5.5 g/kg



with a minimum and a maximum respectively reached at ]35,40] and [7,10] days. Milk yield was increased during months of spring compared to months of autumn and winter while MFC and MPC were decreased during months of spring and summer compared to months of winter.

**Table 2.5** Means of milk yield (MY), milk fat content (MFC) and milk protein content (MPC) per test day (TD) according to extruded linseed (EL) exposure status and stratification factors in 1 204 French Holstein dairy herds during the study period 2008-2015 (n = 1 997 763 cow test-day records)

		EL Exposure status <sup>1</sup>					TR	CO
		Unexposed	]0,50]	]50,300]	]300,600]	]600,1500]		
Herds		1 204	383	1 070	832	434	1 190	1 002
Cows		142 647	19 719	80 864	61 452	26 967	42 355	25 447
Lactations		251 579	26 908	121 125	94 520	40 351	47 408	27 780
Test day records		1 106 774	76 682	385 495	251 979	98 227	50 731	27 875
EL <sup>2</sup> (g/cow/d)	Mean	0	27	173	427	789	-	-
	SD	0.0	13.0	69.8	84.3	172.0	-	-
MY (kg/d)	Parity 1	27.6	26.3	28.2	28.9	29.5	27.9	27.4
	Parity 2	33.5	31.9	34.6	35.6	36.1	34.0	33.0
	Parity 3	35.2	33.8	36.6	37.5	38.3	35.8	34.9
	Parity 4	35.3	33.9	36.7	37.8	38.4	36.1	35.3
	Parity 5+	34.4	32.6	35.7	36.6	37.2	34.9	34.3
MFC (g/kg)	Parity 1	37.8	38.1	37.6	37.2	37.3	37.4	36.9
	Parity 2	38.5	38.9	37.9	37.5	37.4	38.0	37.3
	Parity 3	39.1	39.4	38.4	37.9	37.9	38.4	37.5
	Parity 4	39.5	39.7	38.9	38.2	38.1	38.8	37.7
	Parity 5+	39.7	40.1	39.2	38.8	38.5	39.2	38.4
MPC (g/kg)	Parity 1	30.6	30.5	30.6	30.5	30.5	30.4	30.7
	Parity 2	30.9	31.0	30.8	30.6	30.7	30.7	30.8
	Parity 3	30.6	30.7	30.5	30.3	30.3	30.4	30.4
	Parity 4	30.5	30.6	30.4	30.2	30.3	30.3	30.3
	Parity 5+	30.4	30.4	30.2	30.1	30.1	30.2	30.2

<sup>1</sup> Exposure status was defined by average daily intake of EL per cow per day during the interval between two TD or between calving and first TD. Two other levels were considered : (i) transition (TR) corresponding to the first TD after beginning EL supplementation (ii) carry-over (CO) corresponding to the first TD after stopping EL supplementation.

<sup>2</sup> Average EL intake for TR and CO levels was not shown because of too many differences in time exposure within these levels.

**Table 2.6** Model results for the association between extruded linseed exposure status and milk yield (kg/d) in 1 204 French Holstein dairy herds during the study period 2008-2015 (n = 1 997 763 cow test-day records)

EL exposure status <sup>1</sup>	Parity														
	1 (n = 719 098)			2 (n = 548 676)			3 (n = 359 330)			4 (n = 205 559)			5+ (n = 165 100)		
	Estimate	SE	<i>P</i> <sup>2</sup>	Estimate	SE	<i>P</i>	Estimate	SE	<i>P</i>	Estimate	SE	<i>P</i>	Estimate	SE	<i>P</i>
]0,50]	0.04	0.040	NS	0.03	0.055	NS	0.08	0.072	NS	0.10	0.096	NS	0.00	0.106	NS
]50,300]	0.39	0.023	<0.001	0.59	0.033	<0.001	0.70	0.043	<0.001	0.76	0.058	<0.001	0.66	0.066	<0.001
]300,600]	0.59	0.026	<0.001	0.90	0.036	<0.001	1.01	0.048	<0.001	1.15	0.064	<0.001	1.03	0.073	<0.001
]600,1500]	0.78	0.034	<0.001	1.13	0.048	<0.001	1.24	0.064	<0.001	1.30	0.087	<0.001	1.21	0.096	<0.001
TR	0.29	0.026	<0.001	0.40	0.037	<0.001	0.51	0.051	<0.001	0.47	0.067	<0.001	0.55	0.076	<0.001
CO	0.29	0.034	<0.001	0.39	0.047	<0.001	0.49	0.064	<0.001	0.53	0.086	<0.001	0.39	0.097	<0.001

Estimation of the parameter  $\Phi$  of the first-order autoregressive correlation structure was respectively 0.66, 0.66, 0.63, 0.63, 0.63 for parity 1, 2, 3, 4 and 5+.

<sup>1</sup> Exposure status was defined by average daily intake of EL per cow per day during the interval between two TD or between calving and first TD. Two other levels were considered : (i) transition (TR) corresponding to the first TD after beginning EL supplementation (ii) carry-over (CO) corresponding to the first TD after stopping EL supplementation.

<sup>2</sup> P-value.

**Table 2.7** Model results for the association between extruded linseed exposure status and milk fat content (g/kg) in 1 204 French Holstein dairy herds during the study period 2008-2015 (n = 1 997 763 cow test-day records)

EL exposure status <sup>1</sup>	Parity														
	1 (n = 719 098)			2 (n = 548 676)			3 (n = 359 330)			4 (n = 205 559)			5+ (n = 165 100)		
	Estimate	SE	P <sup>2</sup>	Estimate	SE	P	Estimate	SE	P	Estimate	SE	P	Estimate	SE	P
]0,50]	-0.04	0.048	NS	-0.04	0.058	NS	0.00	0.073	NS	-0.06	0.097	NS	-0,05	0,107	NS
]50,300]	-0.13	0.026	<0.001	-0.41	0.032	<0.001	-0.43	0.041	<0.001	-0.42	0.054	<0.001	-0,35	0,061	<0.001
]300,600]	-0.26	0.030	<0.001	-0.56	0.036	<0.001	-0.72	0.047	<0.001	-0.81	0.062	<0.001	-0,56	0,070	<0.001
]600,1500]	-0.35	0.042	<0.001	-0.75	0.051	<0.001	-0.74	0.066	<0.001	-0.90	0.089	<0.001	-0,89	0,098	<0.001
TR	-0.14	0.036	<0.001	-0.29	0.044	<0.001	-0.31	0.059	<0.001	-0.33	0.079	<0.001	-0,25	0,090	0.005
CO	-0.14	0.047	0.004	-0.30	0.057	<0.001	-0.36	0.076	<0.001	-0.66	0.102	<0.001	-0,25	0,117	0.030

Estimation of the parameter  $\Phi$  of the first-order autoregressive correlation structure was respectively 0.50, 0.49, 0.45, 0.44, 0.42 for parity 1, 2, 3, 4 and 5+.

<sup>1</sup> Exposure status was defined by average daily intake of EL per cow per day during the interval between two TD or between calving and first TD. Two other levels were considered : (i) transition (TR) corresponding to the first TD after beginning EL supplementation (ii) carry-over (CO) corresponding to the first TD after stopping EL supplementation.

<sup>2</sup> P-value.

**Table 2.8** Model results for the association between extruded linseed exposure status and milk protein content (g/kg) in 1 204 French Holstein dairy herds during the study period 2008-2015 (n = 1 997 763 cow test-day records)

EL exposure status <sup>1</sup>	Parity														
	1 (n = 719 098)			2 (n = 548 676)			3 (n = 359 330)			4 (n = 205 559)			5+ (n = 165 100)		
	Estimate	SE	<i>P</i> <sup>2</sup>	Estimate	SE	<i>P</i>	Estimate	SE	<i>P</i>	Estimate	SE	<i>P</i>	Estimate	SE	<i>P</i>
]0,50]	-0,01	0,019	NS	0,05	0,022	0,045	0,00	0,028	NS	-0,08	0,036	0,027	-0,04	0,040	NS
]50,300]	0,04	0,011	<0.001	-0,03	0,014	0,044	-0,05	0,017	0,002	-0,08	0,022	<0.001	-0,07	0,025	0,003
]300,600]	0,01	0,012	NS	-0,07	0,015	<0.001	-0,10	0,018	<0.001	-0,11	0,024	<0.001	-0,14	0,027	<0.001
]600,1500]	-0,03	0,016	NS	-0,10	0,020	<0.001	-0,16	0,025	<0.001	-0,12	0,032	<0.001	-0,20	0,036	<0.001
TR	0,03	0,013	0,007	0,00	0,015	NS	-0,06	0,019	0,003	-0,03	0,025	NS	-0,05	0,029	0,089
CO	-0,04	0,016	0,027	-0,03	0,019	NS	-0,07	0,024	0,007	-0,09	0,032	0,005	-0,04	0,037	NS

Estimation of the parameter  $\Phi$  of the first-order autoregressive correlation structure was respectively 0.65, 0.70, 0.67, 0.66, 0.64 for parity 1, 2, 3, 4 and 5+.

<sup>1</sup> Exposure status was defined by average daily intake of EL per cow per day during the interval between two TD or between calving and first TD. Two other levels were considered : (i) transition (TR) corresponding to the first TD after beginning EL supplementation (ii) carry-over (CO) corresponding to the first TD after stopping EL supplementation.

<sup>2</sup> P-value

**Table 2.9** Effect of adjustment variables on milk yield (MY), milk fat content (MFC) and milk protein content (MPC) of 548 676 test-day records (TD) from 110 040 cows in second parity in 1 203 French Holstein dairy herds during the study period 2008-2015

Variable	Parity 2									Number of TD
	MY (kg/d)			MFC (g/kg)			MPC (g/kg)			
	Estimate	SE	<i>P</i> <sup>1</sup>	Estimate	SE	<i>P</i>	Estimate	SE	<i>P</i>	
Days in milk										
[7,10]	-1.46	0.047	<0.001	8.26	0.055	<0.001	3.96	0.019	<0.001	12 352
]10,15]	0.23	0.044	<0.001	5.78	0.051	<0.001	1.70	0.018	<0.001	15 316
]15,20]	1.28	0.043	<0.001	3.96	0.051	<0.001	0.28	0.018	<0.001	15 326
]20,25]	2.20	0.043	<0.001	2.79	0.050	<0.001	-0.62	0.017	<0.001	15 341
]25,30]	2.77	0.042	<0.001	1.67	0.050	<0.001	-1.13	0.017	<0.001	15 244
]30,35]	3.14	0.041	<0.001	0.90	0.049	<0.001	-1.43	0.016	<0.001	15 545
]35,40]	3.29	0.040	<0.001	0.23	0.048	<0.001	-1.56	0.016	<0.001	15 799
]40,45]	3.18	0.039	<0.001	-0.16	0.048	<0.001	-1.51	0.016	<0.001	15 653
]45,50]	2.98	0.039	<0.001	-0.40	0.048	<0.001	-1.40	0.016	<0.001	15 608
]50,55]	2.79	0.038	<0.001	-0.47	0.047	<0.001	-1.28	0.015	<0.001	15 555
]55,60]	2.47	0.036	<0.001	-0.43	0.045	<0.001	-1.11	0.014	<0.001	15 710
]60,65]	2.15	0.034	<0.001	-0.52	0.043	<0.001	-1.02	0.014	<0.001	15 635
]65,70]	1.79	0.035	<0.001	-0.40	0.043	<0.001	-0.89	0.014	<0.001	16 025
]70,75]	1.48	0.037	<0.001	-0.43	0.046	<0.001	-0.74	0.015	<0.001	15 887
]75,80]	1.14	0.038	<0.001	-0.31	0.047	<0.001	-0.55	0.015	<0.001	15 980
]80,85]	0.92	0.038	<0.001	-0.30	0.047	<0.001	-0.40	0.015	<0.001	15 725
]85,90]	0.48	0.037	<0.001	-0.19	0.046	<0.001	-0.20	0.015	<0.001	15 788
]90,100]	Ref			Ref			Ref			32 033
]100,110]	-0.53	0.031	<0.001	0.21	0.038	<0.001	0.30	0.012	<0.001	31 915
]110,120]	-1.14	0.031	<0.001	0.44	0.038	<0.001	0.57	0.012	<0.001	31 904
]120,130]	-1.71	0.027	<0.001	0.77	0.034	<0.001	0.83	0.011	<0.001	31 801
]130,140]	-2.21	0.030	<0.001	0.99	0.037	<0.001	1.03	0.012	<0.001	32 039
]140,150]	-2.65	0.033	<0.001	1.19	0.039	<0.001	1.22	0.013	<0.001	31 539
]150,160]	-3.23	0.033	<0.001	1.52	0.039	<0.001	1.44	0.013	<0.001	31 865
]160,170]	-3.73	0.034	<0.001	1.78	0.040	<0.001	1.62	0.014	<0.001	31 811
]170,180]	-4.24	0.035	<0.001	2.09	0.041	<0.001	1.82	0.014	<0.001	31 280

Month of TD										
January	0.64	0.022	<0.001	-0.35	0.027	<0.001	-0.48	0.009	<0.001	60 667
February	1.05	0.027	<0.001	-0.57	0.032	<0.001	-0.68	0.011	<0.001	53 962
March	1.69	0.029	<0.001	-1.28	0.033	<0.001	-0.96	0.012	<0.001	53 183
April	2.07	0.032	<0.001	-2.45	0.035	<0.001	-1.12	0.013	<0.001	46 005
May	1.50	0.033	<0.001	-3.22	0.037	<0.001	-1.57	0.013	<0.001	41 649
June	0.90	0.033	<0.001	-3.57	0.037	<0.001	-2.01	0.014	<0.001	39 512
July	0.25	0.035	<0.001	-3.78	0.040	<0.001	-2.31	0.014	<0.001	28 022
August	-0.26	0.036	<0.001	-3.27	0.042	<0.001	-1.77	0.015	<0.001	22 799
September	-0.54	0.030	<0.001	-2.48	0.034	<0.001	-1.10	0.012	<0.001	44 542
October	-0.69	0.027	<0.001	-1.45	0.031	<0.001	-0.54	0.011	<0.001	50 596
November	-0.63	0.021	<0.001	-0.40	0.027	<0.001	-0.11	0.009	<0.001	54 238
December	Ref			Ref			Ref			53 501
Year of TD										
2008	-1.24	0.051	<0.001	0.71	0.049	<0.001	-0.09	0.022	<0.001	45 133
2009	-1.14	0.042	<0.001	0.52	0.041	<0.001	-0.08	0.018	<0.001	72 743
2010	-0.81	0.041	<0.001	0.74	0.041	<0.001	0.36	0.017	<0.001	67 697
2011	0.09	0.037	0.021	0.12	0.038	0.001	-0.05	0.015	0.001	71 538
2012	Ref			Ref			Ref			75 289
2013	-0.51	0.036	<0.001	0.19	0.038	<0.001	-0.05	0.015	<0.001	76 636
2014	-0.18	0.040	<0.001	-0.15	0.039	<0.001	-0.13	0.017	<0.001	80 745
2015	0.12	0.046	0.007	0.23	0.044	<0.001	-0.07	0.020	<0.001	58 895
Geographic area										
Intensive areas in western France	Ref			Ref			Ref			271 869
Field crops areas	0.51	0.439	NS	-0.88	0.184	<0.001	-0.28	0.081	<0.001	33 189
Grassland areas in northern Massif Central	-0.36	0.500	NS	-0.44	0.211	0.037	-0.28	0.093	0.002	21 298
Grassland areas in northwestern France	-1.08	0.300	<0.001	-0.53	0.127	<0.001	-0.15	0.056	0.008	76 111
Intensive piedmont areas	-0.92	0.500	0.070	-0.22	0.213	NS	-0.23	0.094	0.015	20 555
Mountains wetlands in Massif Central	-1.50	0.653	0.022	-0.54	0.274	0.050	-0.18	0.120	NS	12 000
Mixed crop-livestock systems in Parisian Basin	0.15	0.265	NS	-0.59	0.111	<0.001	-0.20	0.049	<0.001	113 654

<sup>1</sup>P-value.

## 6. Discussion

This study based on a large dataset composed of 1 204 herds, 194 056 cows, and 400 522 lactations was to our knowledge the first large field-based epidemiological study exploring the association between nutrition (i.e., exposure to a feed) and dairy cow milk performance. The high statistical power resulting from our large sample size allowed us to demonstrate that sustainable strategy of supplementing EL in commercial farms (i.e., at potentially economical viable levels) could be beneficial to dairy cow performance. Indeed, exposure to EL was associated with an increase in MY, a moderate decrease in MFC and a slight decrease in MPC in a dose-dependent manner in French commercial dairy farms.

### *a) Direction and magnitude of the association between extruded linseed exposure and milk performance*

Supplementing EL to dairy cows at very low level (on average 27 g of EL/cow/d) was not associated with a modification in any dairy cow performance, as expected. However, EL supplementation to dairy cows at average levels ranging from 173 to 789 g/cow/d was associated with an increase in MY from 0.39 to 1.30 kg/d/cow. Supplementing EL at these moderate levels may have increased energy density in the diet without negative effects such as lowering dry matter intake or reducing fiber digestibility in comparison with feeding high-unsaturated fat diets (Jenkins, 1997; Chilliard *et al.*, 2009). However, the magnitude of MY increase inside this range of EL levels was higher than previously reported. Indeed, in a recent meta-analysis of experimental trials (Meignan *et al.*, 2017) an average increase of MY of 0.70 kg/d was estimated by compiling 19 responses to EL intake with a mean intake of 715 g/cow/d. A possible explanation for our finding is that EL supplementation of cows in the first months of lactation was underestimated (as cows were here assumed to be supplemented with the same EL quantity within a herd whatever their lactation stage and MY). Consequently, at a given quantity of EL supplementation, associated increased MY estimated in our study could be overestimated. Another explanation is that diets in the field are less properly balanced compared to control diets used in experimental trials. Consequently, supplementing EL under field conditions may improve the beneficial effect on MY observed under experimental conditions. The decrease in MFC from 0.41 to 0.90 g/kg associated with EL supplementation was expected as EL contains PUFA. Indeed, adding PUFA to the dairy cow diet led to a decrease in milk fat precursors and to the formation of biohydrogenation intermediates inhibiting mammary milk fat synthesis (Bauman and Griinari, 2003; Harvatine *et al.*, 2009). Furthermore, this result was consistent with the dose-decrease of 0.30 g/kg by



250 g of EL estimated by Meignan *et al.* (2017). However, the nature of the forage in the diet could not be studied while this factor plays a major role in modulating milk fat responses in interaction with fat supplement (Chilliard and Ferlay, 2004; Ferlay *et al.*, 2013). For example, EL supplementation in high corn silage-based diet decreased MFC by 2.8 g/kg compared to EL supplementation in low corn silage-based diet (Meignan *et al.*, 2017). The slight decrease in MPC could result from a dilutive effect as milk protein synthesis was not affected by supplementing any source of fat including oilseeds in a meta-analysis (Rabiee *et al.*, 2012).

### ***b) Strength and reliability of the study***

This study estimated an average daily intake of EL in the field of 297 g/cow/d. Cost of EL, as well as well-known negative effects of feeding high-fat diets, may restrict the quantity of EL supplemented in a commercial dairy herd diet. To our knowledge, very few experimental trials investigated effects of such low intake of EL on milk performance. The average estimated daily intake in our study was four times lower than in experimental trials (1 180 g/cow/d) (Meignan *et al.*, 2017). High quantities of EL were supplemented in these experimental trials because they were mainly designed to study the evolution of milk FA profile after EL supplementation. The effect of EL on milk performance was seldom discussed in these trials. Finally, the present study was carried out on a large dataset designed to detect even small effects of a practical range of EL supplementation on milk performance if they exist. Indeed, we detected significant effects on milk performance of EL supplementation in low quantity to dairy cows.

The reference population was composed of cow-TDs recorded in herds that have been supplemented with EL, but during periods of EL non-supplementation, in order to limit potential confounding factors due to different herd managements between herds. Nevertheless, we recognized that the within-herd management may have evolved during this long study period. A random herd effect was added to account for possible disparities between herds. Another option could have consisted in selecting cow-TDs from herds that were never fed EL as the reference population. However, it would have presented many difficulties such as finding relevant matching criteria to study milk yield. The reference herds would have been selected based only on geographical area and so probably subjected to high selection bias.

Misclassification bias regarding EL exposure between the reference and exposed cow-TD within a herd could have occurred as we hypothesized that all lactating cows within a herd were supplemented with the same quantity of EL whatever their days in milk. Cows in late lactation were less likely to be fed EL than cows in early and mid lactation. Indeed, a cow-TD

occurring in late lactation could have been classified as exposed whereas the cow was not fed EL. Consequently, all TDs occurring after 180 days in milk were excluded to limit this bias. A misclassification bias regarding EL exposure could also have occurred within the exposed cow-TD in relation to the same hypothesis (i.e., all lactating cows within a herd were supplemented with the same quantity of EL whatever their MY and days in milk). The true intake of EL for each cow could have been under or overestimated. Consequently, exposure levels were defined with broad ranges, based on several farmer's distribution strategies in field conditions, in order to smooth the effect of this misclassification bias. Finally, clear dose-dependent associations between EL exposure and milk performance, observed within all parities, confirmed that very little misclassification bias occurred between EL exposure levels. A prospective cohort study with a specific design to record diet composition for each group of cows could increase precision on EL exposure to reduce any intake-related bias. However, there is still a measurement error between distribution of diet and true intakes by each cow due to cow variability in feed intake and the competition for access to feeds. Another option could be the use of biomarkers of specific intake which has growing interest in human nutritional epidemiological studies (Shim *et al.*, 2014; Naska *et al.*, 2017). The milk ALA content would be the target biomarker in the present study. Indeed, mid-infrared spectroscopy is available in routine and at an affordable price to estimate milk FA profile. However, milk ALA content i) is still not well estimated by mid-infrared spectroscopy (Soyeurt *et al.*, 2011; Ferrand-Calmels *et al.*, 2014) and ii) is closely dependent on ruminal biohydrogenation and modulated by other dietary components as grass or alfalfa (Glasser *et al.*, 2013). Whatever the option chosen to increase the reliability of EL exposure, such cohort studies would be difficult to carry out because of their cost and lack of practical feasibility.

In conclusion, under field conditions, supplementing EL to dairy cows was associated with an increase in MY and a moderate decrease in milk fat content. We clearly demonstrated that large scale epidemiological studies in commercial herds are complementary to experimental trials in order to quantify the associations between cow nutrition and cow performance, despite lack of precise data on cow diets. To our knowledge, this is the first time an association between cow nutrition and milk performance was assessed by this way. Further study under field conditions exploring the association between EL exposure and other cow performance such as reproduction is needed to evaluate the profitability of this feeding practice for dairy farmers.

## 7. Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge Chambres d'Agriculture, INRA, organismes de contrôle de performances et d'insémination artificielle, and organismes de sélection aux Systèmes Nationaux d'Information Génétique for providing the performance data. The authors also acknowledge P. Gontier (BIOEPAR, Oniris, Nantes, France) for aggregating deliveries data. The authors acknowledge Valorex (Combourtillé, France), Terrena (Ancenis, France) and Association Nationale de la Recherche et de la Technologie (ANRT, Paris, France) for financial support of T.M. PhD studentship. T.M. is affiliated with Valorex for the sake of transparency as Valorex is the official PhD employer in the official financing arrangement Conventions Industrielles de Formation par la Recherche (CIFRE). Two employees of Valorex, Guillaume Chesneau and Vincent Chatellier, were observers during the study. Data collection of feed deliveries of feeds containing extruded linseed was performed by Valorex and 21 companies selling TRADILIN® products. The funders had no role in study design, data analysis, decision to publish and preparation of the manuscript. The funding agreement allowed us to independently publish our findings whatever the nature of the results.

T.M., A.M., F.B., and N.B. designed the study. T.M. and A.M. analyzed the data. T.M., A.M., F.B., C.L., and N.B. interpreted results. T.M. and N.B. drafted the manuscript. All authors revised critically the manuscript for important intellectual content and approved the final version to be published.

**Chapitre III. Les effets de l'utilisation de la graine de lin extrudée sur les performances de reproduction et les mammites subcliniques**

**A. Détermination des effets moyens de l'utilisation de la graine de lin extrudée sur les performances de reproduction en conditions commerciales par une étude épidémiologique**

# Does feeding extruded linseed to dairy cows improve reproductive performance in dairy herds? An observational study (soumis à Theriogenology)

T. Meignan<sup>a,b</sup>, A. Madouasse<sup>a</sup>, F. Beaudeau<sup>a</sup>, C. Lechartier<sup>c</sup>, N. Bareille<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> BIOEPAR, INRA, Oniris, La Chantrerie, F-44307 Nantes, France

<sup>b</sup> VALOREX, La Messayais, F-35210 Combourtille, France

<sup>c</sup> Unité de Recherche sur les Systèmes d'Élevage, Univ Bretagne Loire, Ecole Supérieure d'Agricultures, 55 rue Rabelais, F-49007 Angers, France

\*Corresponding author: Nathalie Bareille  
BIOEPAR, INRA, Oniris  
CS 40706, F-44307 Nantes, France  
Tel +33 2 40 68 78 49  
E-mail [nathalie.bareille@oniris-nantes.fr](mailto:nathalie.bareille@oniris-nantes.fr)

## 1. Abstract

Feeding n-3 fatty acids (FA) is often cited as a promising strategy to tackle impaired reproduction in dairy cows. However, the scientific literature shows conflicting results that may be explained by the nature of n-3 FA used, the amount supplemented and the timing of supplementation. In addition, designing a proper experimental design to study n-3 FA and reproduction is subjected to other difficulties such as the choice of the control diet or gaining enough statistical power. The objective of this retrospective observational study was to quantify the average effects of supplementing extruded linseed (EL), a feed rich in  $\alpha$ -linolenic acid, to dairy cows on reproductive performances under field conditions in French commercial farms. Exposure measurement to EL feeding was particularly challenging as exact cow diets are not traced in farms. Therefore, to investigate potential dose-effect relationship, we defined a proxy of EL intake per day by using deliveries of EL based feeds from 22 companies in the study period 2008-2015 in France. The reference population was composed of cows that did not receive EL within herds that were supplied, but not continuously during the study period. An artificial insemination (AI) was considered exposed only if the cow was supplemented with EL from the calving to 17 days after AI. Mean daily EL intake in exposed population was 337 ( $\pm$  239.4) g/cow/d. Reproductive performance was studied on 423,605 AIs from 1,096 herds and 158,125 cows using Cox models for days to first AI and days to conception, and logistic regression models for risk of return-to-AI, adjusted for factors likely to influence the reproductive performance and for a herd random effect. Risk of return-to-AI between 18-78 days after first and second AI did not differ

between exposed and reference populations, but a reduced number of days to first AI (and a reduced number of days to conception) was observed. The effect on the days to first AI was higher with the lowest EL intake (HR: 1.13; 95% CI: 1.10, 1.15) than with higher EL intake levels (HR ranging from 1.06 to 1.07). This original large scale epidemiological study provides new insights into the effects of feeding EL at a commercially sustainable level to dairy cows and raises hypothesis on the biological mechanisms involved in the complex relationship between EL and reproduction.

**Keywords:** dairy cow, extruded linseed, fertility, epidemiological study

## 2. Introduction

The deterioration of the reproductive performance of dairy cows is one of the main concerns of the modern dairy industry because it is closely linked to the profitability of the dairy farm (Inchaisri et al., 2010). The length and depth of negative energy balance (**NEB**) post-partum are major risk factors for poor fertility (Butler, 2003; Walsh et al., 2011). Improving fertility and energy status of the cow by adding fat to the diet could be a sustainable and cost-effective lever. Indeed, fat supplementation increases the energy content of the diet. However, large amounts of fat were found undesirable for the rumen function (Palmquist and Jenkins, 1980). Besides, fat supplementation seldom improves the energy status of the cow (Staples et al., 1998) and could even aggravate the metabolic pressure on the cow in early post-partum by stimulating milk production (Leroy et al., 2014). The impact of supplementing dairy cows' diet with fat on reproduction still remains inconsistent and conflicting notably due to the nature of the supplements (Santos et al., 2008; Leroy et al., 2014).

Targeting some fatty acids (**FA**) in reproductive tissues, in particular n-3 polyunsaturated fatty acids (**PUFA**), could improve reproduction in different ways such as accelerating the resumption of the post-partum ovarian cyclicity and follicle development, or by enhancing the quality of the oocyte, embryo and their environment (see reviews by Gulliver et al. (Gulliver et al., 2012) in sheep and cattle and by Wathes et al. (Wathes et al., 2007, 2013) in mammals). Briefly, n-3 FA were found to be involved in reproductive mechanisms through their essential role in the composition of cell membranes, through their status of precursors of prostaglandins and modulators of the expression patterns of enzymes involved in prostaglandins metabolism and steroidogenesis.

The effect of PUFA has been shown in animals using linseed. Indeed, linseed oil contains about 55% of  $\alpha$ -linolenic acid (**ALA**, 18:3 n-3) (Petit, 2010). ALA can be converted

into the eicosapentaenoic acid (**EPA**, 20:5 n-3) and docosahexaenoic acid (**DHA**, 22:6 n-3), the long chain n-3 PUFA. Supplementing EL and encapsulated flaxseed to dairy cows modified FA profiles of both the plasma and the ovarian compartments (i.e., follicular fluid, granulosa cells, cumulus-oocyte complexes) (Zachut et al., 2010, 2011). An increase in ALA and n-3 FA contents and a decrease in n-6:n-3 ratio were observed. Thus, linseed supplementation altered the FA profile in reproductive tissues and could improve the uterine, the oocyte and the embryo environments. Linseed also contains the plant lignan secoisolariciresinol diglucoside (SDG), which is metabolized by the rumen flora to the mammalian lignans enterolactone and enterodiol. This source of phytoestrogens could alter dairy cow reproduction by acting as estrogen-like molecules and interfering with endogenous sex hormone metabolism (Landete, 2012; Pierson and Ferkin, 2015; Kiyama, 2016).

Linseed supplementation to dairy cows influences the follicular and corpus luteum developments. Unlike Petit and Twagiramungu (Petit and Twagiramungu, 2006), Dirandeh et al. (Dirandeh et al., 2013a) and Jahani-Moghadam et al. (Jahani-Moghadam et al., 2015) reported a larger ovulatory follicle in cows supplemented with EL than with protected palm oil. Besides, the corpus luteum was also larger (Petit and Twagiramungu, 2006; Dirandeh et al., 2013a), but not in cows supplemented with rolled linseed compared with rolled sunflower seed (Ambrose et al., 2006). The incidence of cystic follicles in cows supplemented with EL was lower (Dirandeh et al., 2013a; Jahani-Moghadam et al., 2015). However, supplementing EL or other forms of linseed scarcely improved reproductive performance in these experimental trials. The conception and pregnancy rates were not altered by linseed supplementation in comparison with saturated FA or n-6 FA supplementations (Ambrose et al., 2006; Petit and Twagiramungu, 2006; Fuentes et al., 2008; Bork et al., 2010; Dirandeh et al., 2013b; Jahani-Moghadam et al., 2015) even if Ambrose et al. (Ambrose et al., 2006) observed a trend towards an increase of the conception rate at first artificial insemination (**AI**). Pregnancy loss was reduced using whole linseed (Petit and Twagiramungu, 2006) or rolled linseed (Ambrose et al., 2006). Finally, the resumption of the ovarian activity, the number of days open and the interval from calving to pregnancy were not studied or cannot be interpreted due to the presence of estrus synchronization programs in most of the experiments.

Overall the experimental trials provide insights about the effects of PUFA on reproductive tissues but show limitations to explore the effects on reproductive performance at cow level due to their lack of statistical power (Wathes et al., 2013). Besides, difficulties are observed by researchers when balancing the treatment groups for a trial studying reproductive performance because of the numerous parameters influencing the cow fertility.

Thus, an epidemiological work exploring the link between the exposition of dairy cows to EL and their reproductive performance is needed while considering the potential confounding factors under field conditions.

The objective of this epidemiological study was to quantify the average effects of supplementing EL to dairy cows on reproductive performance under field conditions.

### **3. Material and Methods**

#### ***a) General study design and available data***

A retrospective observational study was carried out based on data from French dairy herds enrolled in the official Milk Recording Scheme, where AI was used, and wherein EL was supplemented to dairy cows between January 2008 and December 2015. The reproductive performance of cows inseminated during periods of EL supplementation were compared to the one of cows inseminated during periods of EL non-supplementation within the same herds. The deliveries of commercial feeds containing EL were obtained from companies in France selling TRADILIN<sup>®</sup> products (Tradi-Lin<sup>®</sup> Technology, Patent No. EP 1021 960 B1). TRADILIN<sup>®</sup> products are almost the only feeds with EL sold in France. The extrusion process of linseeds incorporated into these products is protected by a European patent. This ensured that cows in the control group were not supplemented with EL. Thus, the study population consisted of 4,979 French dairy herds having used feeds with EL during the study period. However, the national herd identification number was needed in order to link data from deliveries to data from the official Milk Recording Scheme and AI records. The sample size was reduced to 2,599 herds due to a lack of national herd identification number, and then reduced to 2,250 herds due to a lack of enrollment in the official Milk Recording Scheme. Additionally, in order to obtain a sufficient number of test days exposed to EL, only 1,836 herds with a minimum of 4 deliveries of feeds with EL were retained. Absence of fit between the periods of EL delivery and milk recording data, as well as missing data in deliveries reduced sample size to 1,415 herds, and finally absence of AI to 1,397.

Reproductive events data obtained were calving ease, date and rank of AI, bull breed, whether the semen was sexed or not. Lactation data obtained were calving date, parity, date of test day record, milk yield and milk content (fat, protein and somatic cell count) at each test-day record. Animal data obtained were breed and movements (i.e., date of arrival in and date of exit from the herd).



***b) Estimation of exposure to extruded linseed and determination of exposure status***

A cow daily exposure to EL for each delivery in each herd was calculated from the duration of TRADILIN<sup>®</sup> products delivery distribution, the quantity delivered, the products EL content, and the average number of lactating cows in the herd during the delivery distribution. We considered that the beginning of EL supplementation to dairy cows in each herd occurred immediately the day after the arrival date of feed in the farm. The daily number of cows in each herd was calculated based on movements data and test-day records. We considered that all cows (i.e., whatever lactation stage and milk yield) were supplemented with the same EL quantity within a herd. When a farmer distributed several feeds containing EL at the same time, herd daily exposures from each delivery were added. To sum up, at this step we calculated a mean EL intake by cow by herd for each day of the study period.

Exposure status was determined within a herd at the AI level. An AI was considered exposed only if the cow was supplemented with EL continuously from calving until 17 days after AI. Consequently, lactations begun before 1<sup>st</sup> January 2008 as well as AIs recorded after 14<sup>th</sup> December 2015 were excluded because of incomplete exposure sequences. For each AI, an average daily EL exposure during the interval between calving and 17 days after AI was calculated by adding each daily exposure (from each day in this interval), estimated as described above, divided by the number of days in this interval. The exposure variable was categorized into several levels of EL daily intake: 0 (i.e., unexposed), ]0,50], ]50,300], ]300,600] and ]600,1500] g/cow/d based on EL use on the field. We considered that estimated EL daily intakes superior to 1500 g/cow/d (0.32% of final AI database) were inaccurate and related lactations were removed. Furthermore, in a previous work (Meignan et al., 2017) this value was considered to be the upper limit of the practical range of EL supplementation to dairy cows (i.e., 600 g of fat from EL considering 40% of fat in EL). In summary, the exposure variable accounted for both the dose and minimal time of exposure.

For each herd, all AIs recorded during the study period were considered for the study. All the AIs that were considered not exposed constituted the unexposed reference population. This enabled the comparison of reproductive performance within the same herd, thereby controlling for farming and climatic conditions (Nusinovici et al., 2013).

***c) Definition of reproductive performance and data selection***

The effect of EL on reproductive performance was assessed using several outcome variables.

Firstly, the occurrence of a new AI (i.e., a return-to-service (**RTS**)) after a first AI (dichotomous variable, yes/no) was considered. This indicator was used in several studies quantifying the effect of a disease on fertility or embryonic losses depending on the time when the event was observed (Robert et al., 2004; Malher et al., 2006; Marcé et al., 2009; Nusinovici et al., 2012; Marceau et al., 2014). Three RTS were considered:

(i) a RTS between 18 to 26 days after an AI, which is likely to be associated with fertilization failure or early embryo loss (**early RTS**).

(ii) a RTS between 27 to 78 days after service, which is likely to be associated with late embryo (after the stage of maternal recognition of gestation) or fetal (after day 42 of gestation) loss (**delayed RTS**).

(iii) a RTS between 18 to 78 days after service (**overall RTS**).

Late RTS (after 78 days post-service) was not studied as no scientific literature pointed out a possible effect of EL on risk of abortion. Only RTS after first and second AI were considered. Returns to service occurring before a given interval were excluded for the assessment of the risk of RTS during this interval (i.e., RTS before day 27 were excluded for assessing the risk of delayed RTS after AI).

Secondly, the time from calving to first AI (**DAI1**; continuous variable) was considered as a proxy to assess the resumption of cyclicity postpartum and the ability of the cow to be inseminated.

Finally, the time from calving to conception (days to AI resulting in fertilization of the oocyte **DAIF**; continuous variable) was considered. The AI was considered successful when there was no RTS between 18 to 78 days after AI. When the first AI and the AI resulting in fertilization occurred respectively after 150 or 270 days, DAI1 and DAIF were computed respectively as being 150 or 270 days.

Data from dairy herds with unusual management (i.e., very small herds, extreme primiparous cows proportion, systematic delayed first service, use of synchronization protocols) and suspected to use a breeding bull, as well as data from cows with missing data (i.e., herd identification, parity, test-day record, insemination, calving date) were excluded (Seegers et al., 2001; Robert et al., 2004; Nusinovici et al., 2012). Furthermore, data from cows with events not considered plausible and extreme data were excluded: calving to first test day record >75 d, DAI1 <21 d or >180 d, interval between two successive AI >200 d or <3 d, AI to calving interval >297 d or <175 d, peak milk yield (expressed as the maximum at the 3 first test-day records) <10 kg/d, milk protein content at the second test day record equal to 0. Classification bias can occur when cows are culled because their pregnancy status is

uncertain. Thus cows culled within 200 days after AI were excluded from the analysis in order not to underestimate the risk of RTS. Data from nulliparous cows were excluded because of the lack of information about EL supplementation and so exposure status during their pregnancy. Only data from Holstein cows were included because of the strong effect of breed on reproductive performance (Bedere et al., 2017a; b). This data selection reduced sample size to 1,096 herds.

#### d) *Statistical models*

The statistical unit to study RTS was the AI. The effect of EL exposure on the risk of RTS was assessed using logistic mixed regression model. To account for factors likely to influence the risk of RTS, this association was adjusted for several independent variables (Gröhn and Rajala-Schultz, 2000; Seegers et al., 2001; Robert et al., 2004; Malher et al., 2006; Marcé et al., 2009; Nusinovici et al., 2012): calving to AI interval (10 levels), year of AI (8 levels), month of AI (12 levels), rank of AI (1 or 2), semen from Holstein bull (yes/no), semen sexing (yes/no and one accounting for missing data), parity (4 levels), calving ease (4 levels from easy to cesarian section and one accounting for missing data), peak milk yield (7 levels), milk protein content at second test day record (7 levels), and geographical area (7 levels). A herd random effect was also added in the model to take into account in particular diseases and feeding management differences between herds:

$$Y_{ijt} \sim \text{Bernoulli}(p_{ijt})$$

$$\ln\left(\frac{p_{ijt}}{1-p_{ijt}}\right) = \alpha + X_{ijt} \beta + v_j$$

$$v_j \sim \text{Normal}(0, \sigma^2)$$

where  $Y_{ijt} = 1$  when a RTS occurred in interval  $t$  for a cow  $i$  in herd  $j$  and 0 otherwise,  $\alpha =$  intercept,  $X_{ijt} =$  matrix of predictors including exposure status with  $\beta$  the vector of associated regression parameters,  $v_j =$  herd  $j$  random effect.

Odds-ratios were converted into relative risks (RR) using the formula from Beaudeau and Fourichon (Beaudeau and Fourichon, 1998).

The statistical units to study respectively DAI1 and DAIF were respectively the first AI and the successful AI. The effects of EL exposure on the DAI1 and DAIF were assessed using multivariable proportional hazards Cox models. The association between EL exposure and each outcome was adjusted for the same factors used to study RTS, except that the factors rank of AI, semen from Holstein bull, semen sexing and calving to AI interval for DAI1, rank

of AI and calving to AI interval for DAIF, were obviously removed from the models. A herd random effect (frailty term) assuming a gamma distribution (Ducrocq and Casella, 1996) was added to the models to take into account health and management differences between herds:

$$\lambda_{ij}(t, Z_{ij} | w_j) = w_j \lambda_0(t) \exp(Z_{ij}' \beta)$$

$$w_j \sim \Gamma\left(\frac{1}{\theta}, \frac{1}{\theta}\right)$$

where  $\lambda_0(t)$  = baseline hazard function,  $Z_{ij}$  = matrix of predictors including exposure status with  $\beta$  the vector of associated regression parameters,  $w_j$  = herd j random effect.

All statistical analyses were performed in R (version 3.3.2) (R Core Team, 2016) using the function `glmer` from the package `lme4` (version 1.1-12) and the function `coxph` from the package `survival` (version 2.40-1).

## 4. Results

### a) *Descriptive results*

The final sample was composed of 1,096 herds, 158,125 cows, and 423,605 AIs (Table 3.1). Almost half of the AIs were unexposed. More than 78% of the exposed AIs were at levels [50, 300] or [300, 600] g/cow/d whatever the reproductive outcome considered. Mean daily EL intake in exposed population was 337 ( $\pm$  239.4) g/cow/d. Rates of early RTS, delayed RTS, and overall RTS were respectively 22.6%, 33.3% and 48.4% in the reference population, and respectively 24.0%, 33.2% and 49.2% in the whole exposed population (Table 3.1). Calving-to-first AI interval and calving-to-conception interval were respectively 91 ( $\pm$ 28.2) d and 110 ( $\pm$ 42.0) d in the reference population, and respectively 90 ( $\pm$ 27.9) d and 107 ( $\pm$ 40.8) in the whole exposed population (Table 3.1).

### b) *Return rates were not associated with exposure to extruded linseed*

Overall RTS did not differ between the reference population and the exposed population (Table 3.2). Very low level of EL exposure (i.e., <50 g/cow/d from calving to 17 days after AI) was not associated with early or delayed RTS. Other levels of exposure to EL were slightly associated with increased risk of early RTS (RR from 1.02 to 1.04) and with decreased risk of delayed RTS (RR from 0.95 to 0.96) (Table 3.2). No clear dose-dependent relationships within EL exposure levels were observed (Table 3.2).

***c) Earlier days to first AI and to conception associated with exposure to extruded linseed***

Exposure to EL was associated with reduced DAI1 and reduced DAIF (Table 3.3). Very low level of EL exposure was associated with the highest reduction in DAI1 and DAIF (HR = 1.14 and HR = 1.19) compared to other levels of exposure.

***d) Adjustment variables associated with reproductive performance***

The magnitude of the association between RTS and the adjustment variables varied according to early or delayed RTS (Table 3.4), but not its direction (except for parity 3). Dystocia was strongly associated with increased risk of early and delayed RTS, as well as sexing semen and Holstein semen. As expected, increased calving-to-AI interval was positively associated with decreased risk of RTS, whereas increased peak milk yield was positively associated with increased risk of RTS (Table 3.4). Increased peak milk yield and decreased MPC at 2<sup>nd</sup> test day record were also associated with increased DAI1 and DAIF (Table 3.5). Strong associations of the dystocia with DAI1 and DAIF, and sexing semen and Holstein bull with DAIF were also observed (Table 3.5). Finally, inseminating in spring and early summer was associated with early and delayed RTS, as well as increased days open (Table 3.4, Table 3.5).

**Table 3.1** Return-to-service (RTS) rates, time from calving to first AI (DAII) and time from calving to conception (DAIF) according to extruded linseed (EL) exposure status in 1096 French Holstein dairy herds during the study period 2008-2015 (n = 423,605 AI from 158,125 cows).

		EL Exposure status <sup>1</sup>				
		Unexposed	]0,50]	]50,300]	]300,600]	]600,1500]
Herds		1,064	255	915	699	372
Cows		95,083	7,583	44,409	34,110	14,152
Total AI		226,795	14,126	88,261	66,136	28,287
EL (g/cow/d)	Mean	0	27	176	432	772
	SD	0.0	12.1	69.4	84.9	166.2
18 to 26 d RTS rate (%)		22.6	22.3	23.9	24.2	24.6
26 to 78 d RTS rate (%)		33.3	34.2	33.3	32.8	33.1
18 to 78 d RTS rate (%)		48.4	48.9	49.3	49.0	49.6
Calving-to-first AI interval (d) <sup>2</sup>	n	147,377	9,528	58,853	43,597	18,593
	Mean	91	88	90	91	91
	SD	28.2	28.0	27.7	28.2	27.8
Calving-to-conception interval (d) <sup>3</sup>	n	116,963	7,218	44,792	33,706	14,261
	Mean	110	106	107	108	107
	SD	42.0	41.6	40.4	41.1	40.6

<sup>1</sup>Exposure status was defined by average daily intake of EL per cow per day during the interval from calving to 17 days after AI.

<sup>2</sup>Mean and SD were calculated including censored AI1 with their calving-to-first AI interval fixed at 150 days.

<sup>3</sup>Mean and SD were calculated including censored AIF with their calving-to-conception interval fixed at 270 days.

**Table 3.2** Relative risk of return-to-service (RTS) according to the extruded linseed exposure status in 1096 French Holstein dairy herds during the study period January 2008 to December 2015 (n = 423,605 AI from 158,125 cows).

Extruded linseed exposure status <sup>1</sup>	Interval of return								
	18 to 26 d			27 to 78 d			18 to 78 d		
	RR <sup>2</sup>	95% CI <sup>3</sup>	P <sup>4</sup>	RR	95% CI	P	RR	95% CI	P
Unexposed	1	Ref <sup>5</sup>		1	Ref		1	Ref	
]0,50]	0.98	0.94 ; 1.02	NS	0.99	0.95 ; 1.05	NS	0.99	0.98 ; 1.01	NS
]50,300]	1.02	1.00 ; 1.04	0.029	0.97	0.94 ; 0.99	0.004	0.99	0.98 ; 1.01	NS
]300,600]	1.04	1.02 ; 1.06	<0.001	0.95	0.92 ; 0.98	<0.001	0.99	0.98 ; 1.01	NS
]600,1500]	1.04	1.01 ; 1.07	0.013	0.96	0.92 ; 1.00	0.040	0.99	0.98 ; 1.02	NS

Herd random effect variance and standard deviation were respectively 0.08 and 0.285, 0.07 and 0.260, 0.07 and 0.273 in models respectively studying interval of return 18 to 26, 27 to 78 and 18 to 78 days.

<sup>1</sup>Exposure status was defined by average daily intake of EL per cow per day during the interval from calving to 17 days after AI.

<sup>2</sup>RR = relative risk adjusted for calving-to-AI interval (10 levels), year of AI (8 levels), month of AI (12 levels), rank of AI (1 or 2), semen from Holstein bull (yes/no), semen sexing (yes/no and missing data), parity (4 levels), difficulty of the last calving (5 levels including one for missing data), peak milk yield (7 levels), milk protein content at second test day record (7 levels), geographical area (7 levels) and herd random effect.

<sup>3</sup>CI = confidence interval.

<sup>4</sup>P = P-value.

<sup>5</sup>Ref = Reference.

**Table 3.3** Hazard ratios of the time from calving to first AI (**DAI1**) and the time from calving to conception (**DAIF**) expressed in days according to the extruded linseed exposure status in 1096 French Holstein dairy herds during the study period January 2008 to December 2015 (respectively, n = 277,948 AI1 from 156,203 cows and n = 216,940 AIF from 129,215 cows).

Extruded linseed exposure status <sup>1</sup>	DAI1 (d)			DAIF (d)		
	HR <sup>2</sup>	95% CI <sup>3</sup>	P <sup>4</sup>	HR	95% CI	P
Unexposed	1	Ref <sup>5</sup>		1	Ref	
]0,50]	1.14	1.11 ; 1.17	<0.001	1.19	1.15 ; 1.23	<0.001
]50,300]	1.06	1.04 ; 1.07	<0.001	1.10	1.08 ; 1.11	<0.001
]300,600]	1.06	1.05 ; 1.08	<0.001	1.08	1.06 ; 1.10	<0.001
]600,1500]	1.07	1.05 ; 1.09	<0.001	1.11	1.08 ; 1.14	<0.001

Number of events was 263,859 and 216,066 respectively for DAI1 and DAIF. Herd random effect variance was respectively 0.62 and 0.28.

<sup>1</sup>Exposure status was defined by average daily intake of EL per cow per day during the interval from calving to 17 days after AI.

<sup>2</sup>HR = hazard ratio adjusted for year of AI (8 levels), month of AI (12 levels), parity (4 levels), difficulty of the last calving (5 levels including one for missing data), peak milk yield (7 levels), milk protein content at second test day record (7 levels), geographical area (7 levels) and a herd random effect, plus semen from Holstein bull (yes/no), semen sexing (yes/no and missing data) for DAIF.

<sup>3</sup>CI = confidence interval.

<sup>4</sup>P = P-value.

<sup>5</sup>Ref = Reference.



**Table 3.4** Effect of adjustment variables on risk of return-to-service (RTS) according to the extruded linseed exposure status in 1096 French Holstein dairy herds during the study period January 2008 to December 2015 (n = 423,605 AI from 158,125 cows).

Variable and class	Interval of return									Number of AI <sup>4</sup>
	18 to 26 d			27 to 78 d			18 to 78 d			
	RR <sup>1</sup>	95% CI <sup>2</sup>	P <sup>3</sup>	RR	95% CI	P	RR	95% CI	P	
<b>Parity</b>										
1	0.97	0.95; 0.98	<0.001	0.93	0.92; 0.94	<0.001	0.95	0.94; 0.96	<0.001	160,820
2	1	Ref <sup>5</sup>		1	Ref		1	Ref		120,810
3	0.98	0.96; 0.99	0.006	1.02	1.01; 1.04	0.005	1.01	0.99; 1.01	NS	75,003
4+	1.00	0.98; 1.02	NS	1.08	1.06; 1.09	<0.001	1.04	1.03; 1.05	<0.001	66,972
<b>Difficulty of last calving</b>										
1	1	Ref		1	Ref		1	Ref		258,810
2	1.02	1.00; 1.03	NS	1.05	1.04; 1.07	<0.001	1.03	1.03; 1.04	<0.001	83,501
3	1.08	1.05; 1.11	<0.001	1.20	1.17; 1.22	<0.001	1.12	1.11; 1.14	<0.001	18,408
4	1.15	1.07; 1.23	<0.001	1.39	1.31; 1.47	<0.001	1.24	1.20; 1.28	<0.001	2,628
Missing data	1.03	1.02; 1.05	<0.001	1.09	1.07; 1.10	<0.001	1.05	1.04; 1.06	<0.001	60,258
<b>Peak milk yield (kg/d)</b>										
≥10.0; ≤27.2	1.01	0.98; 1.03	NS	0.90	0.88; 0.92	<0.001	0.95	0.93; 0.96	<0.001	43,742
>27.2; ≤30.0	1.00	0.98; 1.02	NS	0.94	0.92; 0.96	<0.001	0.97	0.95; 0.98	<0.001	42,001
>30.0; ≤34.4	1.00	0.98; 1.02	NS	0.97	0.95; 0.98	<0.001	0.98	0.97; 0.99	<0.001	84,601
>34.4; ≤38.8	1	Ref		1	Ref		1	Ref		86,188
>38.8; ≤43.6	1.02	1.00; 1.04	0.066	1.03	1.01; 1.05	<0.001	1.02	1.01; 1.03	<0.001	82,627
>43.6; ≤47.2	1.02	1.00; 1.05	0.064	1.07	1.05; 1.09	<0.001	1.04	1.03; 1.06	<0.001	43,189
>47.2	1.04	1.02; 1.07	<0.001	1.11	1.09; 1.14	<0.001	1.07	1.06; 1.08	<0.001	41,257
<b>MPC at 2<sup>nd</sup> TD record (g/kg)</b>										
≥13.9; ≤26.4	0.99	0.97; 1.01	NS	1.03	1.01; 1.05	0.004	1.01	1.00; 1.05	0.056	43,081
>26.4; ≤27.4	0.98	0.97; 1.01	NS	1.01	0.99; 1.03	NS	1.01	0.99; 1.02	NS	47,050
>27.4; ≤28.6	1.00	0.98; 1.02	NS	1.00	0.99; 1.02	NS	1.00	0.99; 1.01	NS	80,906
>28.6; ≤29.8	1	Ref		1	Ref		1	Ref		86,040
>29.8; ≤31.3	1.00	0.98; 1.02	NS	0.99	0.97; 1.00	0.073	0.99	0.98; 1.01	NS	84,692
>31.3; ≤32.5	1.00	0.98; 1.02	NS	0.98	0.96; 1.00	0.031	0.99	0.98; 1.00	NS	41,286
>32.5	1.01	0.98; 1.03	NS	0.97	0.95; 0.99	0.008	0.98	0.97; 1.00	0.046	40,550

Calving-to-AI interval (d)										
≥21; ≤50	1.15	1.11; 1.20	<0.001	1.23	1.19; 1.27	<0.001	1.16	1.14; 1.19	<0.001	9,626
>50; ≤60	1.13	1.10; 1.17	<0.001	1.09	1.06; 1.11	<0.001	1.08	1.07; 1.10	<0.001	26,765
>60; ≤70	1.10	1.07; 1.13	<0.001	1.06	1.04; 1.08	<0.001	1.06	1.05; 1.08	<0.001	39,862
>70; ≤80	1.08	1.05; 1.10	<0.001	1.00	0.98; 1.03	NS	1.03	1.01; 1.04	<0.001	48,868
>80; ≤90	1.04	1.02; 1.06	0.002	1.01	0.99; 1.03	NS	1.02	1.01; 1.03	0.007	48,406
>90; ≤100	1	Ref		1	Ref		1	Ref		45,001
>100; ≤125	0.98	0.96; 1.01	NS	0.99	0.97; 1.01	NS	0.99	0.98; 1.00	0.053	89,013
>125; ≤150	0.92	0.91; 0.95	<0.001	0.96	0.94; 0.98	<0.001	0.96	0.94; 0.97	<0.001	56,116
>150; ≤180	0.88	0.86; 0.91	<0.001	0.90	0.88; 0.92	<0.001	0.91	0.89; 0.92	<0.001	37,960
>180	0.79	0.76; 0.82	<0.001	0.86	0.84; 0.89	<0.001	0.86	0.84; 0.87	<0.001	21,988
Rank of AI										
1	1	Ref		1	Ref		1	Ref		277,948
2	1.17	1.16; 1.19	<0.001	1.02	1.01; 1.03	0.001	1.06	1.05; 1.07	<0.001	145,657
Semen sexing										
No	1	Ref		1	Ref		1	Ref		120,799
Yes	1.36	1.31; 1.42	<0.001	1.25	1.20; 1.30	<0.001	1.23	1.20; 1.25	<0.001	6,614
Missing data	0.99	0.98; 1.02	NS	0.99	0.97; 1.00	0.082	0.99	0.98; 1.01	NS	296,192
Holstein bull										
Yes	1	Ref		1	Ref		1	Ref		404,474
No	0.93	0.91; 0.96	<0.001	0.90	0.88; 0.93	<0.001	0.93	0.91; 0.94	<0.001	19,131
Month of AI										
January	1.02	0.99; 1.04	NS	0.98	0.96; 1.00	0.032	0.99	0.98; 1.01	NS	48,783
February	0.94	0.91; 0.96	<0.001	0.94	0.92; 0.96	<0.001	0.95	0.94; 0.96	<0.001	40,358
March	0.90	0.87; 0.92	<0.001	0.97	0.95; 0.99	0.002	0.95	0.94; 0.96	<0.001	37,536
April	0.93	0.91; 0.95	<0.001	0.94	0.92; 0.97	<0.001	0.94	0.93; 0.96	<0.001	30,715
May	0.89	0.87; 0.91	<0.001	0.92	0.90; 0.95	<0.001	0.92	0.91; 0.94	<0.001	27,542
June	0.82	0.80; 0.85	<0.001	0.99	0.97; 1.02	NS	0.89	0.92; 0.96	<0.001	23,531
July	0.92	0.90; 0.95	<0.001	1.10	1.06; 1.12	<0.001	1.02	1.01; 1.04	0.003	23,219
August	0.99	0.96; 1.02	NS	1.09	1.06; 1.11	<0.001	1.04	1.02; 1.06	<0.001	26,166
September	1.00	0.97; 1.02	NS	1.07	1.05; 1.1	<0.001	1.03	1.02; 1.05	<0.001	31,579
October	1.05	1.03; 1.07	<0.001	1.03	1.01; 1.05	0.007	1.03	1.02; 1.04	<0.001	39,506
November	1.05	1.03; 1.07	<0.001	1.00	0.98; 1.02	NS	1.02	1.01; 1.03	0.009	47,176
December	1	Ref		1	Ref		1	Ref		47,494

Year of AI										
2008	1.03	1.01; 1.06	0.011	0.99	0.97; 1.01	NS	1.01	0.99; 1.02	NS	54,375
2009	1.00	0.98; 1.02	NS	0.99	0.97; 1.01	NS	0.99	0.98; 1.01	NS	53,021
2010	0.98	0.96; 1.01	NS	0.99	0.97; 1.01	NS	0.99	0.98; 1.01	NS	50,031
2011	1.00	0.98; 1.02	NS	1.03	1.01; 1.05	0.016	1.02	1.00; 1.03	0.020	51,785
2012	1	Ref		1	Ref		1	Ref		51,547
2013	1.02	1.00; 1.05	0.085	0.99	0.97; 1.01	NS	1.00	0.98; 1.02	NS	53,552
2014	1.03	1.01; 1.05	0.019	0.99	0.97; 1.01	NS	1.01	0.99; 1.02	NS	56,282
2015	1.04	1.02; 1.07	0.002	0.96	0.94; 0.99	<0.001	0.99	0.98; 1.01	NS	53,012
Geographic area										
Intensive areas in western France	1	Ref		1	Ref		1	Ref		212,067
Field crops areas	1.05	0.98; 1.12	NS	1.03	0.97; 1.08	NS	1.03	0.99; 1.07	NS	24,837
Grassland areas in northern Massif Central	0.95	0.88; 1.02	NS	0.97	0.92; 1.03	NS	0.97	0.92; 1.01	NS	16,335
Grassland areas in northwestern France	1.02	0.97; 1.06	NS	1.03	0.99; 1.06	NS	1.02	0.99; 1.05	NS	58,955
Intensive piedmont areas	1.00	0.92; 1.08	NS	0.92	0.87; 0.99	0.020	0.96	0.91; 1.01	0.090	12,776
Mountains wetlands in Massif Central	0.92	0.83; 1.02	0.095	0.83	0.77; 0.90	<0.001	0.88	0.83; 0.94	<0.001	8,997
Mixed crop-livestock systems in Parisian Basin	1.00	0.96; 1.04	NS	0.99	0.96; 1.03	NS	1.00	0.97; 1.02	NS	89,638

<sup>1</sup>RR = relative risk adjusted for EL exposure status in addition to all adjustment variables.

<sup>2</sup>CI = confidence interval.

<sup>3</sup>P = P-value.

<sup>4</sup>Number of AI used for intervals of return 18 to 26 days and 18 to 78 days.

<sup>5</sup>Ref = Reference.

**Table 3.5** Effect of adjustment variables on the time from calving to first AI (**DAI1**) and the time from calving to conception (**DAIF**) expressed in days according to the extruded linseed exposure status in 1096 French Holstein dairy herds during the study period January 2008 to December 2015 (respectively, n = 277,948 AI1 from 156,203 cows and n = 216,940 AIF from 129,215 cows).

Variable and class	DAI1 (d)			Number of AI1	DAIF (d)			Number of AIF
	HR <sup>1</sup>	95% CI <sup>2</sup>	P <sup>3</sup>		HR	95% CI	P	
<b>Parity</b>								
1	1.05	1.03; 1.06	<0.001	107,075	1.03	1.02; 1.04	<0.001	86,316
2	1	Ref <sup>4</sup>		78,803	1	Ref		60,994
3	1.00	0.99; 1.01	NS	48,760	1.02	1.00; 1.03	0.019	37,372
4+	0.98	0.97; 0.99	0.003	43,310	1.02	1.00; 1.03	0.029	32,258
<b>Difficulty of last calving</b>								
1	1	Ref		170,701	1	Ref		134,114
2	0.95	0.94; 0.96	<0.001	54,431	0.95	0.94; 0.96	<0.001	42,447
3	0.90	0.88; 0.92	<0.001	11,748	0.90	0.88; 0.92	<0.001	8,734
4	0.88	0.83; 0.93	<0.001	1,647	0.85	0.80; 0.91	<0.001	1,133
Missing data	0.96	0.95; 0.97	<0.001	39,421	0.98	0.97; 1.00	0.016	30,512
<b>Peak milk yield (kg/d)</b>								
≥10.0; ≤27.2	1.07	1.05; 1.08	<0.001	29,615	1.11	1.09; 1.13	<0.001	24,022
>27.2; ≤30.0	1.06	1.05; 1.08	<0.001	28,065	1.08	1.06; 1.10	<0.001	22,602
>30.0; ≤34.4	1.03	1.02; 1.04	<0.001	55,902	1.04	1.03; 1.06	<0.001	44,606
>34.4; ≤38.8	1	Ref		56,483	1	Ref		44,197
>38.8; ≤43.6	0.97	0.96; 0.98	<0.001	53,669	0.96	0.95; 0.97	<0.001	41,169
>43.6; ≤47.2	0.95	0.93; 0.96	<0.001	27,823	0.93	0.92; 0.95	<0.001	20,912
>47.2	0.87	0.85; 0.88	<0.001	26,391	0.87	0.85; 0.89	<0.001	19,432
<b>MPC at 2<sup>nd</sup> TD record (g/kg)</b>								
≥13.9; ≤26.4	0.83	0.82; 0.84	<0.001	27,884	0.85	0.84; 0.87	<0.001	21,559
>26.4; ≤27.4	0.90	0.89; 0.91	<0.001	30,578	0.91	0.90; 0.92	<0.001	23,825
>27.4; ≤28.6	0.95	0.94; 0.97	<0.001	52,827	0.96	0.94; 0.97	<0.001	41,135
>28.6; ≤29.8	1	Ref		56,364	1	Ref		43,938
>29.8; ≤31.3	1.04	1.03; 1.06	<0.001	55,821	1.03	1.02; 1.05	<0.001	43,794
>31.3; ≤32.5	1.08	1.06; 1.09	<0.001	27,427	1.08	1.06; 1.10	<0.001	21,483
>32.5	1.12	1.11; 1.14	<0.001	27,047	1.12	1.10; 1.14	<0.001	21,206

Semen sexing								
No	-				1	Ref		60,967
yes	-				1.35	1.29; 1.40	<0.001	2,703
Missing data	-				1.00	0.98; 1.01	NS	153,270
Holstein bull								
yes	-				1	Ref		206,565
no	-				0.71	0.69; 0.72	<0.001	10,375
Month of AI								
January	0.92	0.91; 0.94	<0.001	31,107	0.92	0.90; 0.93	<0.001	25,024
February	0.87	0.85; 0.88	<0.001	25,519	0.87	0.85; 0.88	<0.001	21,522
March	0.80	0.79; 0.82	<0.001	23,456	0.81	0.79; 0.82	<0.001	19,982
April	0.74	0.73; 0.76	<0.001	18,940	0.75	0.73; 0.76	<0.001	16,355
May	0.72	0.71; 0.74	<0.001	16,929	0.72	0.70; 0.73	<0.001	14,871
June	0.73	0.71; 0.74	<0.001	14,906	0.71	0.70; 0.73	<0.001	12,466
July	0.77	0.75; 0.78	<0.001	15,070	0.74	0.72; 0.75	<0.001	11,357
August	0.82	0.80; 0.83	<0.001	17,501	0.76	0.75; 0.78	<0.001	12,661
September	0.87	0.85; 0.88	<0.001	21,572	0.83	0.81; 0.85	<0.001	15,458
October	0.97	0.96; 0.99	0.001	27,745	0.94	0.93; 0.96	<0.001	19,417
November	1.04	1.02; 1.05	<0.001	33,293	1.03	1.01; 1.04	0.007	23,620
December	1	Ref		31,910	1	Ref		24,207
Year of AI								
2008	1.13	1.12; 1.15	<0.001	35,350	1.11	1.09; 1.13	<0.001	27,869
2009	1.09	1.07; 1.11	<0.001	34,545	1.07	1.05; 1.09	<0.001	27,456
2010	1.09	1.08; 1.11	<0.001	32,784	1.07	1.05; 1.09	<0.001	25,909
2011	1.04	1.02; 1.06	<0.001	33,966	1.04	1.03; 1.06	<0.001	26,183
2012	1	Ref		33,706	1	Ref		26,421
2013	1.02	1.00; 1.04	0.013	35,209	1.02	1.00; 1.03	0.066	27,447
2014	1.02	1.00; 1.03	0.019	37,247	1.02	1.00; 1.04	0.029	28,579
2015	1.08	1.06; 1.09	<0.001	35,141	1.09	1.07; 1.11	<0.001	27,076

Geographic area								
Intensive areas in western France	1	Ref		139,337	1	Ref		108,995
Field crops areas	1.05	0.84; 1.31	NS	16,181	1.05	0.91; 1.21	NS	12,379
Grassland areas in northern Massif Central	0.95	0.75; 1.21	NS	10,785	0.97	0.83; 1.14	NS	8,650
Grassland areas in northwestern France	1.07	0.92; 1.25	NS	38,287	1.03	0.93; 1.14	NS	29,261
Intensive piedmont areas	1.11	0.86; 1.45	NS	8,433	1.19	1.00; 1.42	0.044	6,512
Mountains wetlands in Massif Central	1.07	0.77; 1.48	NS	6,121	1.10	0.89; 1.37	NS	5,023
Mixed crop-livestock systems in Parisian Basin	0.98	0.86; 1.13	NS	58,804	0.98	0.90; 1.07	NS	46,120

<sup>1</sup>HR = hazard ratio adjusted for EL exposure status in addition to all adjustment variables.

<sup>2</sup>CI = confidence interval.

<sup>3</sup>P = P-value.

<sup>4</sup>Ref = Reference.

## 5. Discussion

This observational study is to our knowledge the first one exploring the link between a feed supplementation and reproductive performance of dairy cows based on a large dataset under field conditions. This study provides further insight into supplementing EL, a feed rich in ALA, on reproductive performance. It complements work from experimental trials through its original design which allowed us to detect small effects on reproduction, to study a dose-effect relationship while controlling for confounding factors.

Exposure to EL was associated with a reduced DAIF through a reduced DAI1. Few of the studies performed so far were adapted to study the effect of linseed on DAI1 and DAIF because of estrus synchronization protocols and/or fat supplementation initiated several weeks postpartum. The direction of the effect is consistent with the one found in a previous experimental trial where a reduction of 6.5 days in DAI1 was observed in EL supplemented group (about 826 g/cow/d, immediately postpartum until 40d after calving) compared to protected palm oil supplemented group (Jahani-Moghadam et al., 2015). Surprisingly, no effect of EL supplementation on overall RTS was observed. Decreased risk of delayed RTS was offset by increased risk of early RTS. A decreased risk of delayed RTS is consistent with reduced pregnancy loss observed in cows supplemented with whole linseed (Petit and Twagiramungu, 2006) or rolled linseed (Ambrose et al., 2006). Risk of early RTS reflects as well non fertilization of oocyte and early embryo mortality (before 15-17 days after AI), and so oocyte and embryo quality. Zachut et al. (Zachut et al., 2010) and Moallem et al. (Moallem et al., 2013) observed an improvement in embryo cleavage rate with a diet supplemented with encapsulated linseed relative to a diet supplemented with saturated FA but not relative to a diet supplemented with different sources of UFA such as sunflower oil and fish oil. Besides, Thangavelu et al. (Thangavelu et al., 2007) found that a diet supplemented with sunflower oil or linseed enhanced embryonic development relative to a diet enriched in saturated FA. However, Petit et al. (Petit et al., 2008) found a decreased embryo quality with whole linseed supplementation relative to a commercial product rich in saturated and oleic FA supplementation. Evaluating and comparing such studies is complex because of substantial disparities between precise timing, duration, amount and nature of dietary intervention as mentioned by Leroy et al. (Leroy et al., 2014) in its review on the relationship between dietary fat and oocyte and embryo quality. Besides, quantities of EL observed under field conditions were far lower than in these cited experimental trials.

In our study, overall mean of EL supplementation under field conditions was quite low: EL was supplemented at an average of 337 ( $\pm$  239.4) g/cow/d compared to 1181 ( $\pm$  742.5) g/cow/d in 29 treatment diets from 21 trials studying EL and production performance (Meignan et al., 2017), and to 826 g/cow/d, 1700 g/cow/d and 1745 g/cow/d in three trials studying EL and reproductive performance (Fuentes et al., 2008; Zachut et al., 2011; Jahani-Moghadam et al., 2015). Thus, we lack knowledge to comment on the largest magnitude of the association between DAI1 or DIAF and EL exposure with the lowest intake of EL (<50 g of EL, <11 g of ALA). Such low level of ALA supplementation was not studied previously in the literature, but two studies found huge beneficial effects of low intakes of other PUFA. Sinedino et al. (Sinedino et al., 2017) in a study conducted with 739 lactating cows showed a very strong effect of supplementing an algae product containing 10 g of DHA on reproductive performance with reduction in the days-to-pregnancy interval of 22 days. De Veth et al. (de Veth et al., 2009) in a multi-study analysis, predicted an optimal effect of conjugated linoleic acid on time to first ovulation (-8 d) and time to conception (-34 d) at a quantity from 8 to 10 g/d. In light of these elements, there is need for experimental trials to focus on EL supplementation in a range observed under field conditions to strengthen our results obtained with low EL supplementation.

Our study was, to our knowledge, the first one exploring a dose-dependent association of reproductive performance with EL or n-3 FA. In the present study, the dose-dependent relationship was far from being linear: no effect was demonstrated on risk of RTS and a quite constant positive effect was observed on DAI1 and DAIF. Besides, contrary to other exposure levels, the lowest level of EL intake was not associated with early and delayed RTS, whereas its association with reduced DAI1 or DIAF was of larger magnitude than other exposure levels. Yet, linear dose-dependent associations between intake of EL and other dairy cows production traits were reported: milk FA profile (Meignan et al., 2017), enteric methane emission (Martin et al., 2016), and milk yield and milk contents (Meignan et al., under review). Interestingly, this latter study was based on the same initial dataset than the one used in the present study. Estimated daily milk yield increased with increased estimated EL daily intake compared to the daily milk yield of the reference population: respectively +0.00, +0.59, +0.90 and +1.13 kg/d with an EL intake of ]0, 50], ]50, 300], ]300, 600] and ]600, 1500] g/cow/d considering a second parity Holstein cow. Milk yield and negative energy balance (**NEB**) are known to negatively influence the return to ovarian cyclicity and the estrous behavior (Lopez et al., 2004; Dobson et al., 2007; Cutullic et al., 2009), and the oocyte and embryo quality (Leroy et al., 2008a). Therefore, milk yield could act as a confounding



factor and/or an explanatory factor on the association between EL exposure and reproductive performances. Here, the estimates of reproductive performances were adjusted for peak milk yield in order to take into account both milk yield and level of NEB. High peak milk yield was associated with an increased risk of overall RTS and increased DAI1 and DAIF. However, the way we adjusted for milk yield (using a discrete variable with categories of 5kg-range) did not allow to fully account for the concomitant association between milk yield and EL supplementation (of 0.6 to 1.1 kg/d) while estimating the effects on reproductive performances. Another explanation for this non-linear effect of the EL supplementation could be that the antagonistic biological effect of PUFA depending on their concentration. For example, long-chain n-3 FA could act rather as pro- or anti-oxidant agents depending on the level used (Giordano and Visioli, 2014).

Several biological processes could have been involved in the alteration of reproductive performances with EL supplementation. Indeed, EL contains ALA and lignans which could alter reproductive tissues. Firstly, EL supplementation, even at low levels, could alter FA profile and lignan content in ovarian compartments. It is well-known that specific FA dietary supplementation altered the FA profile in ovarian compartments (Leroy et al., 2014). Indeed, supplementing encapsulated linseed or EL increased ALA content, decrease arachidonic acid (ARA, 20:4 n-6), and decreased n-6:n-3 ratio in plasma, follicles follicular fluid and granulosa cells, and cumulus-oocyte complexes (Zachut et al., 2010, 2011; Moallem et al., 2013). Besides, supplementing whole linseed increased enterolactone in milk (Petit and Gagnon, 2009) and supplementing EL increased enterolactone in follicular fluid of pre-ovulatory follicles which was correlated to intrafollicular estradiol concentration and estradiol-to-progesterone ratio (Zachut, 2015). Secondly, supplementing EL may have stimulated follicular development (resulting in shorter DAI), and estrous behavior (resulting in more returns within the interval 18 to 26 days and less in the interval 27 to 78 days) through its ALA and lignan contents. Extensively reviewed by Gulliver et al. (Gulliver et al., 2012), Wathes et al. (Wathes et al., 2013) and Leroy et al. (Leroy et al., 2014), n-3 FA increased the number of follicles, the size of the dominant follicle and its production of estradiol. It is important to emphasize that EL could interfere in follicular steroidogenesis by its ALA content but also by its lignan content (Zachut, 2015). Earlier ovulation after calving with PUFA supplementation seem also a consistent finding (Wathes et al., 2013), even if the biological mechanism is not understood. However, n-3 FA could also delay onset of estrus through inhibition of PGF<sub>2α</sub> and PGE<sub>2</sub> (Gulliver et al., 2012). Wathes et al. (Wathes et al., 2013) stated that n-3 FA reduced production of PGE<sub>2</sub>, leading to larger follicles producing

more estradiol, the latter being closely related to estrus expression (Perry et al., 2014). Very little is known about the effect of ALA and lignan on estrous behavior and duration. However, Zachut et al. (Zachut et al., 2011) observed a longer duration and greater intensity of behavioral estrus in cows supplemented with EL compared to cows supplemented with calcium salts of palm oil distillate, as well as longer estradiol surge. Third, supplementing EL could also reduce reproductive health disorders early postpartum as Jahani-Moghadam (Jahani-Moghadam et al., 2015) observed a reduction in the incidence of cystic follicles which is associated with a reduced number DAI1 (Fourichon et al., 2000). Extruded linseed through its ALA and lignan contents could in particular prevent oxidative stress and could modulate inflammation response (Petit, 2009; Friggens et al., 2010; Mavangira and Sordillo, 2017). Finally, decreased risk in delayed RTS could be partly explained by better embryo survival due to the inhibition of PGF<sub>2α</sub> endometrial secretion (Gulliver et al., 2012).

## **6. Conclusions**

Under field conditions, supplementing EL to dairy cows was associated with reduced number of days to first AI and days to conception but was not associated with overall risk of return-to-service. To our knowledge, this is the first time that an association between cow nutrition and reproductive performances was assessed by a large-scale retrospective observational study. Further experimental trials using low levels of EL and at proper timing are still needed to fully understand underlying biological mechanisms associated with ALA, phytoestrogens, antioxydants and dairy cow reproduction.

## **7. Acknowledgments**

The authors gratefully acknowledge Chambres d'Agriculture, INRA, organismes de contrôle de performances et d'insémination artificielle, and organismes de sélection aux Systèmes Nationaux d'Information Génétique for providing the performance data. The authors also acknowledge P. Gontier (BIOEPAR, Oniris, Nantes, France) for aggregating deliveries data. This work was supported by Valorex, Combourtillé, France; Terrena, Ancenis, France; and Association Nationale de la Recherche et de la Technologie (ANRT), Paris, France. T.M. is affiliated with Valorex for the sake of transparency as Valorex is the official PhD employer in the official financing arrangement Conventions Industrielles de Formation par la Recherche (CIFRE). Two employees of Valorex, Guillaume Chesneau and Vincent Chatellier, were observers during the study. Data collection of feed deliveries of feeds containing extruded linseed was performed by Valorex and 21 companies selling TRADILIN<sup>®</sup> products. The funders had no role in study design, data analysis, decision to publish and preparation of the

manuscript. The funding agreement allowed us to independently publish our findings whatever the nature of the results.

T.M., A.M., F.B., and N.B. designed the study. T.M. and A.M. analyzed the data. T.M., A.M., F.B., C.L., and N.B interpreted results. T.M. and N.B. drafted the manuscript. All authors revised critically the manuscript for important intellectual content and approved the final version to be published.

## **B. Détermination des effets moyens de l'utilisation de la graine de lin extrudée sur l'incidence et la persistance des mammites subcliniques en conditions commerciales par une étude épidémiologique**

### **1. Introduction**

Comme évoqué en introduction générale, les AGPI n-6 (AA) et n-3 (ALA, EPA, DHA) à l'origine de la formation des oxylipides sont susceptibles de moduler la réponse inflammatoire des animaux (Mavangira and Sordillo, 2017). La supplémentation en AGPI n-3 pourrait, en agissant entre autres sur la synthèse des oxylipides à propriétés anti-inflammatoires, modifier la réponse inflammatoire lors d'infections intra-mammaires (Ryman et al., 2017). Cependant, compte tenu de la littérature scientifique très récente et de la complexité des mécanismes biologiques sous-jacents, il serait présomptueux d'émettre une hypothèse d'effet bénéfique de la supplémentation en GLE sur les maladies à composante infectieuse des bovins. Nous avons toutefois tenu à explorer cette piste avec les données sanitaires à notre disposition issues de l'étude épidémiologique : la concentration en cellules somatiques du lait (CCS) le jour du contrôle laitier (CL).

Le terme « cellules somatiques du lait » signifie cellules appartenant au corps de l'animal (soma en grec signifie corps) et présentes dans le lait (Schalm and Lasmanis, 1968). Elles sont divisées en deux grands groupes : les cellules épithéliales et les leucocytes (macrophages, granulocytes neutrophiles et lymphocytes). Lors d'infection intramammaire, on observe une très forte augmentation du pourcentage des granulocytes neutrophiles et diminution du pourcentage relatif des cellules épithéliales (Dulin et al., 1982; Miller et al., 1986). Cette réaction inflammatoire de la glande mammaire, nommée mammite, en réponse à une infection par une ou plusieurs espèces bactériennes conduit à des modifications plus ou moins importantes de la composition du lait dues notamment à une augmentation de la perméabilité capillaire. Réduire la réponse inflammatoire consécutive à une infection intramammaire pourrait donc permettre de réduire les dommages cellulaires au niveau de l'épithélium mammaire.

L'objectif de l'étude était de produire des connaissances sur les effets de la GLE sur l'incidence et la persistance des mammites subcliniques (MSC) en conditions d'utilisation de terrain.

## 2. Matériel et méthodes

### a) *Dispositif expérimental*

L'étude a été réalisée à partir du même jeu de données que pour l'évaluation de l'effet de la GLE sur les performances de production et les taux (cf. matériel et méthodes chapitre 2 partie B). Brièvement, une étude épidémiologique exposé/non exposé rétrospective a été réalisée sur les données issues d'élevages commerciaux pendant la période 2008-2015. Les données de concentrations en CCS mesurées lors du CL issues de vaches ayant reçu de la GLE ont été comparées à des données CCS issues de vaches n'ayant pas reçu de la GLE. L'exposition à la GLE a été calculée à partir des livraisons d'aliments commerciaux à base de GLE étant donné que les données de la ration n'étaient pas disponibles.

### b) *Définition de la variable d'exposition*

Nous avons repris les données d'exposition considérées pour étudier les performances de production. Chaque CL a été classé selon la distribution journalière moyenne estimée de GLE depuis le contrôle laitier précédent. Les classes d'exposition sont donc les mêmes : 0 (i.e., non exposé), ]0, 50], ]50, 300], ]300, 600] and ]600, 1 500] g/vache/j. Les CL des élevages ayant distribué de la GLE durant la période d'étude 2008-2015 qui n'ont pas été considérés comme exposés ont constitué la base de données « non exposé ».

### c) *Définition des variables à expliquer*

Deux variables à expliquer ont été définies afin de tester l'effet prévention et l'effet curatif de la GLE : l'incidence de MSC et la guérison de MSC. La CCS a été utilisée comme indicateur de MSC. Deux seuils ont été étudiés : 100,000 et 200,000 cellules/mL. Ces seuils ont été choisis sur la base notamment du travail réalisé par (Djabri, 2002). Il a réalisé la synthèse de 9 études ayant publié la valeur informative (sensibilité et spécificité) des tests basés sur le CCS du lait de mamelle. Il en a déduit que le seuil permettant le mieux de discriminer les mamelles infectées dans au moins un quartier ou non était de 100 000 cellules/mL (sensibilité de 63% et spécificité de 71%). Celui permettant le mieux de discriminer les mamelles infectées par un pathogène majeur dans au moins un quartier ou non était de 180 000 cellules/mL (sensibilité de 77% et spécificité de 80%).

L'incidence de MSC est définie par une variable dichotomique à chaque CL à partir de la donnée du CL précédent : la variable d'incidence prend la valeur 1 lorsque la CCS au CL considéré dépasse le seuil défini par rapport au CL précédent. La guérison de MSC est définie à l'inverse : la variable prend la valeur 1 lorsque la CCS au CL considéré passe en dessous du

seuil défini par rapport au CL précédent. Pour étudier l'incidence de MSC, la vache doit donc être considérée saine au CL précédent et pour la guérison de MSC, la vache doit être considérée malade au CL précédent. Le critère de jugement de l'état sain vis-à-vis de MSC a été défini de deux manières : soit un CL soit deux CL sous le seuil défini pour définir le statut sain. Le choix de faire varier ce critère permet d'améliorer la spécificité du test basé sur les CCS : le jugement d'une vache saine sur la base de 2 CL inférieurs au seuil est plus fiable que celui sur la base d'un seul CL.

#### *d) Modélisation statistique*

L'unité statistique est le couple de deux CL consécutifs. L'effet de la GLE sur l'incidence de MSC et la guérison de MSC a été étudié par des modèles de régression logistique à effets mixtes. Les modèles ont été ajustés des effets fixes de facteurs influençant la survenue de MSC et leur guérison : parité (5 niveaux), stade de lactation (6 niveaux), production laitière au CL précédent (ou 1er contrôle du couple de CL étudié) (8 niveaux), mois du contrôle (12 niveaux), année du contrôle (8 niveaux), localisation géographique (7 niveaux). De plus, les modèles ont été ajustés d'un effet aléatoire troupeau afin de tenir compte des disparités entre élevages notamment de gestion de la santé et des conditions d'hygiène du bâtiment et de traite, facteurs de risque importants de la survenue ou guérison de MSC.

Les analyses statistiques ont été réalisées à partir de la fonction `glmer` du package `lme4` (version 1.1-12) du logiciel R (R Core Team, 2016).

### **3. Résultats**

#### *a) Statistiques descriptives*

L'échantillon final était constitué de 1 204 troupeaux et 1 997 763 CL dont 400 716 premiers CL après vêlage. Le taux d'incidence de MSC de l'échantillon n'a pas varié selon le critère de définition du statut sain (17,4% vs. 17,5% au seuil 100 000 cellules/mL) mais a évolué selon le seuil de CCS retenu (respectivement, 17,4% vs. 10,4% pour 100 000 et 200 000 cellules/mL) (Tableau 3.6). Plus de la moitié des couples de CL a été non-exposée. Le taux d'incidence de MSC dans la population de référence a été de 17,7 (10,7) % au seuil de 100,000 (200,000) cellules/mL, supérieur aux taux d'incidence de MSC dans chacune des catégories d'exposition quel que soit le seuil ou l'hypothèse de définition du statut sain retenus : respectivement 17,0 (10,4), 16,6 (9,9), 17,4 (10,4), 17,1 (10,4) % au seuil 100 000 (200 000) cellules/mL pour les catégories d'exposition ]0, 50], ]50, 300], ]300, 600] et ]600,

1 500] g/vache/j (Tableau 3.6). Le taux de guérison de MSC de l'échantillon a varié selon le critère de définition du statut sain (27,2% vs. 19,5% en considérant respectivement 1 ou 2 CL sous le seuil 100 000 cellules/mL) et a aussi évolué selon le seuil de CCS retenu (respectivement, 27,2% vs. 37,3% pour 100 000 et 200 000 cellules/mL) (Tableau 3.7). Plus de la moitié des couples de CL a été non-exposée. Le taux de guérison de MSC dans la population de référence a été de 26,5 (36,6) % au seuil de 100 000 (200 000) cellules/mL, inférieur aux taux de guérison de MSC pour chacune des catégories d'exposition quel que soit le seuil ou l'hypothèse de définition du statut sain retenus sauf pour l'exposition la plus faible: respectivement 28,0 (37,7), 28,4 (38,6), 28,6 (39,9) au seuil 100 000 (200 000) cellules/mL pour les catégories d'exposition ]50, 300], ]300, 600] and ]600, 1 500] g/vache/j (Tableau 3.7).

***b) La supplémentation en GLE n'est pas associée au risque d'incidence de mammites subcliniques***

Quelle que soit la quantité de GLE, le seuil de CCS considéré ou le nombre de CL pour définir le statut sain, la supplémentation en GLE n'a pas modifié le risque d'incidence de MSC par rapport à la population de référence (Tableau 3.8), à l'exception d'une légère augmentation du risque de nouvelles MSC au seuil 100,000 cellules/mL (OR de 1,03 à 1,04) pour la quantité de GLE de ]300, 600] g/vache/jour.

***c) La supplémentation en GLE est associée à une meilleure guérison des mammites subcliniques***

A l'exception de la quantité de GLE la plus faible, quelle que soit la quantité de GLE, le seuil de CCS considéré ou le nombre de CL pour définir le statut sain, la supplémentation en GLE était associée à une légère augmentation du risque de guérison de MSC par rapport à la population de référence (OR de 1,03 à 1,10) (Tableau 3.9).

***d) Des variables d'ajustement intéressantes***

Le risque d'incidence de MSC augmente avec la parité, tandis que le risque de guérison de MSC diminue (Tableau 3.10). Le risque d'incidence de MSC augmente avec le stade de lactation, tandis que le risque de guérison de MSC diminue. La production laitière au CL précédent (ou 1<sup>er</sup> contrôle du couple de CL étudié) n'est pas associée au risque d'incidence de MSC tandis qu'une faible production laitière au CL précédent augmente le risque de guérison par rapport à une production moyenne. Le risque d'incidence de MSC

augmente lors des mois d'été tandis le risque de guérison de MSC diminue lors des mois de printemps et d'été.



**Table 3.6** Means of subclinical mastitis (SCM) incidence rate per pair of test day records (TD) according to methodology used and extruded linseed (EL) exposure status in 1 204 French Holstein dairy herds during the study period 2008-2015 (n = 1 997 763 cow-TDs including first TDs after calving).

		Threshold of somatic cells count (cells/mL)							
		100,000				200,000			
		Number of consecutive TDs below the threshold to consider a cow healthy							
		1	2	1	2			1	2
Herds		1,204	1,204	1,204	1,204			1,204	1,204
Cows		177,176	155,283	187,554	175,397			187,554	175,397
Lactations		338,307	272,728	374,031	330,399			374,031	330,399
Pairs of TDs <sup>1</sup>	Total	1,048,244	582,540	1,281,647	801,594			1,281,647	801,594
	0	866,102	480,357	1,147,466	722,739			1,147,466	722,739
	1	182,142	102,183	134,181	78,855			134,181	78,855
	Rate (%)	17.4	17.5	10.5	9.8			10.5	9.8
EL exposure status <sup>2</sup>		n	Rate (%)	n	Rate (%)	n	Rate (%)	n	Rate (%)
Unexposed		568,884	17.7	312,630	17.8	699,105	10.7	432,707	10.1
]0,50]		40,222	17.0	22,547	17.3	48,927	10.4	30,669	9.8
]50,300]		207,517	16.6	117,582	16.6	251,764	9.9	160,257	9.3
]300,600]		135,462	17.4	76,206	17.7	164,929	10.4	104,516	9.7
]600,1500]		53,570	17.1	30,070	17.4	64,808	10.4	40,972	9.8
TR		24,261	17.9	12,808	18.4	29,761	11.0	17,790	10.5
CO		18,328	17.7	10,697	17.9	22,353	10.4	14,683	9.8

<sup>1</sup>Considering two consecutive TDs, the variable to study new SCM rate was coded as 1 when the cow was considered healthy at the first TD and ill at the second TD (i.e., below then above somatic cells count threshold).

<sup>2</sup>Exposure status was defined by average daily intake of EL per cow per day during the interval between two TDs. Two other levels were considered: (i) transition (TR) corresponding to the first TD after beginning EL supplementation (ii) carry-over (CO) corresponding to the first TD after stopping EL supplementation.

**Table 3.7** Means of subclinical mastitis (**SCM**) cure rate per pair of test day records (**TD**) according to methodology used and extruded linseed (**EL**) exposure status in 1 204 French Holstein dairy herds during the study period 2008-2015 (n = 1 997 763 cow-TDs including first TDs after calving).

		Threshold of somatic cells count (cells/mL)							
		100,000				200,000			
		Number of consecutive TDs below the threshold to consider a cow healthy							
		1	2	1	2				
Herds		1,204	1,204	1,204	1,204				
Cows		145,162	140,862	109,024	105,349				
Lactations		235,479	223,997	157,450	149,413				
Pairs of TDs <sup>1</sup>	Total	548,803	496,639	315,400	282,830				
	0	399,729	399,729	197,896	197,896				
	1	149,074	96,910	117,504	84,934				
	Rate (%)	27.2	19.5	37.3	30.0				
EL exposure status <sup>2</sup>		n	Rate (%)	n	Rate (%)	n	Rate (%)	n	Rate (%)
Unexposed		307,501	26.5	278,447	18.9	177,280	36.6	158,878	29.3
]0,50]		20,880	25.8	18,999	18.4	12,175	35.8	10,936	28.5
]50,300]		103,332	28.0	93,468	20.4	59,085	37.7	53,231	30.9
]300,600]		68,496	28.4	61,774	20.6	39,029	38.6	34,832	31.1
]600,1500]		26,227	28.6	23,682	20.9	14,989	39.9	13,431	32.9
TR		12,820	27.6	11,593	20.0	7,320	38.3	6,545	31.0
CO		9,547	27.1	8,676	19.7	5,522	37.6	4,977	30.8

<sup>1</sup>Considering two consecutive TDs, the variable to study SCM cure rate was coded as 1 when the cow was considered ill at the first TD and healthy at the second TD (i.e., above then below somatic cells count threshold).

<sup>2</sup>Exposure status was defined by average daily intake of EL per cow per day during the interval between two TDs. Two other levels were considered: (i) transition (**TR**) corresponding to the first TD after beginning EL supplementation (ii) carry-over (**CO**) corresponding to the first TD after stopping EL supplementation.

**Table 3.8** Model results for the association between extruded linseed (EL) exposure status and risks of new subclinical mastitis between two consecutive test day records (TD) in 1 204 French Holstein dairy herds during the study period 2008-2015 (n = 1 997 763 cow test-day records including first test day records after calving).

	Threshold of somatic cells count (cells/mL)											
	100,000						200,000					
	Number of consecutive TDs below the threshold to consider a cow healthy											
	1			2			1			2		
OR <sup>1</sup>	95% CI <sup>2</sup>	P <sup>3</sup>	OR	95% CI	P	OR	95% CI	P	OR	95% CI	P	
EL exposure status <sup>4</sup>												
Unexposed	1	Ref <sup>5</sup>		1	Ref		1	Ref		1	Ref	
]0,50]	1.00	0.97 ; 1.04	NS	1.02	0.97 ; 1.06	NS	1.01	0.97 ; 1.05	NS	1.00	0.96 ; 1.05	NS
]50,300]	1.00	0.98 ; 1.02	NS	1.00	0.98 ; 1.02	NS	0.98	0.97 ; 1.00	0.074	0.98	0.96 ; 1.01	NS
]300,600]	1.03	1.01 ; 1.05	0.004	1.04	1.01 ; 1.07	0.003	1.01	0.99 ; 1.03	NS	1.00	0.97 ; 1.03	NS
]600,1500]	1.01	0.98 ; 1.04	NS	1.03	0.99 ; 1.07	NS	1.01	0.98 ; 1.05	NS	1.00	0.96 ; 1.04	NS
TR	1.02	0.99 ; 1.06	NS	1.04	0.99 ; 1.09	NS	1.03	1.00 ; 1.07	0.086	1.04	0.99 ; 1.10	0.097
CO	1.02	0.98 ; 1.06	NS	1.03	0.98 ; 1.08	NS	0.98	0.94 ; 1.03	NS	0.99	0.93 ; 1.05	NS

Herd random effect variance and standard deviation were 0.15 and 0.385, 0.22 and 0.466, 0.13 and 0.360, 0.17 and 0.407 respectively from threshold 100,000 somatic cells count and 1 TD to consider a cow healthy to threshold 200,000 somatic cells count and 2 TDs to consider a cow healthy.

<sup>1</sup>OR = odds-ratio adjusted for parity (5 levels), days in milk at TD (6 levels), milk yield at the previous TD (or first TD of the pair of TDs) (8 levels), month of TD (12 levels), year of TD (8 levels), geographical area (7 levels) and herd random effect.

<sup>2</sup>CI = confidence interval.

<sup>3</sup>P = P-value.

<sup>4</sup>Exposure status was defined by average daily intake of EL per cow per day during the interval between two TDs. Two other levels were considered: (i) transition (**TR**) corresponding to the first TD after beginning EL supplementation (ii) carry-over (**CO**) corresponding to the first TD after stopping EL supplementation.

<sup>5</sup>Ref = Reference.

**Table 3.9** Model results for the association between extruded linseed (EL) exposure status and risks of subclinical mastitis cure between two consecutive test day records (TD) in 1 204 French Holstein dairy herds during the study period 2008-2015 (n = 1 997 763 cow test-day records including first test day records after calving).

	Threshold of somatic cells count (cells/mL)											
	100,000						200,000					
	Number of consecutive TDs below the threshold to consider a cow healthy											
	1			2			1			2		
OR <sup>1</sup>	95% CI <sup>2</sup>	P <sup>3</sup>	OR	95% CI	P	OR	95% CI	P	OR	95% CI	P	
EL exposure status <sup>4</sup>												
Unexposed	1	Ref		1	Ref		1	Ref		1	Ref	
]0,50]	0.97	0.93 ; 1.01	0.094	0.97	0.92 ; 1.01	NS	0.99	0.94 ; 1.03	NS	0.99	0.94 ; 1.04	NS
]50,300]	1.03	1.01 ; 1.05	0.003	1.03	1.01 ; 1.06	0.005	1.03	1.00 ; 1.05	0.036	1.05	1.02 ; 1.07	<0.001
]300,600]	1.03	1.01 ; 1.06	0.006	1.04	1.01 ; 1.07	0.010	1.03	1.00 ; 1.06	0.024	1.03	1.00 ; 1.07	0.035
]600,1500]	1.04	1.01 ; 1.08	0.020	1.05	1.01 ; 1.09	0.023	1.08	1.03 ; 1.12	<0.001	1.10	1.05 ; 1.15	<0.001
TR	1.00	0.96 ; 1.05	NS	1.01	0.96 ; 1.06	NS	1.03	0.98 ; 1.08	NS	1.03	0.97 ; 1.09	NS
CO	1.05	1.00 ; 1.10	0.072	1.08	1.02 ; 1.14	0.009	1.07	1.01 ; 1.14	0.021	1.11	1.04 ; 1.18	0.002

Herd random effect variance and standard deviation were 0.07 and 0.258, 0.10 and 0.314, 0.07 and 0.267, 0.10 and 0.310 respectively from threshold 100,000 somatic cells count and 1 TD to consider a cow healthy to threshold 200,000 somatic cells count and 2 TDs to consider a cow healthy.

<sup>1</sup>OR = odds-ratio adjusted for parity (5 levels), days in milk at TD (6 levels), milk yield at the previous TD (or first TD of the pair of TDs) (8 levels), month of TD (12 levels), year of TD (8 levels), geographical area (7 levels) and herd random effect.

<sup>2</sup>CI = confidence interval.

<sup>3</sup>P = P-value.

<sup>4</sup>Exposure status was defined by average daily intake of EL per cow per day during the interval between two TDs. Two other levels were considered: (i) transition (TR) corresponding to the first TD after beginning EL supplementation (ii) carry-over (CO) corresponding to the first TD after stopping EL supplementation.

<sup>5</sup>Ref = Reference.

**Table 3.10** Effect of adjustment variables on risk of new subclinical mastitis (SCM) and risk of SCM cure between two consecutive test day records (TD) according to the extruded linseed (EL) exposure status, with a threshold of 200,000 cells/mL somatic cells count and only one TD below the threshold to consider a cow healthy, in 1 204 French Holstein dairy herds during the study period 2008-2015 (n = 1 281 647 and n = 315 400 pairs of cow-TDs).

Adjustment variable and class	Dependent variable							
	New SCM				SCM cure			
	OR <sup>1</sup>	95% CI <sup>2</sup>	P <sup>3</sup>	Number of pairs of TDs	OR	95% CI	P	Number of pairs of TDs
<b>Parity</b>								
1	0.73	0.72 ; 0.74	<0.001	493,064	1.41	1.37 ; 1.44	<0.001	81,943
2	1	Ref <sup>4</sup>		362,913	1	Ref		75,661
3	1.37	1.35 ; 1.39	<0.001	220,448	0.76	0.74 ; 0.77	<0.001	66,287
4	1.68	1.65 ; 1.71	<0.001	117,479	0.63	0.62 ; 0.65	<0.001	46,814
5+	1.99	1.94 ; 2.03	<0.001	87,743	0.52	0.50 ; 0.53	<0.001	44,155
<b>Days in milk (d)</b>								
≥7; ≤30	0.75	0.41 ; 1.37	NS	126	1.61	0.92 ; 2.84	0.097	53
>30; ≤60	0.91	0.89 ; 0.93	<0.001	174,715	1.59	1.55 ; 1.64	<0.001	46,663
>60; ≤90	1	Ref		277,686	1	Ref		59,425
>90; ≤120	1.07	1.05 ; 1.08	<0.001	283,398	0.78	0.76 ; 0.79	<0.001	63,634
>120; ≤150	1.12	1.10 ; 1.14	<0.001	276,522	0.66	0.64 ; 0.67	<0.001	69,784
>150; ≤180	1.18	1.16 ; 1.21	<0.001	269,200	0.59	0.58 ; 0.61	<0.001	75,841
<b>Milk yield at previous TD (kg/d)</b>								
≥2.0; ≤18.0	1.12	1.07 ; 1.17	<0.001	21,564	1.32	1.26 ; 1.38	<0.001	10,800
≥18.0; ≤23.5	1.02	0.99 ; 1.05	NS	98,817	1.14	1.10 ; 1.17	<0.001	30,098
>23.5; ≤26.5	0.99	0.96 ; 1.01	NS	127,201	1.07	1.04 ; 1.10	<0.001	32,313
>26.5; ≤30.8	0.98	0.96 ; 1.00	0.062	262,800	1.01	0.98 ; 1.03	NS	63,542
>30.8; ≤34.8	1	Ref		256,239	1	Ref		61,680
>34.8; ≤39.7	0.99	0.97 ; 1.00	NS	253,548	1.00	0.98 ; 1.02	NS	60,388
>39.7; ≤43.4	1.00	0.98 ; 1.02	NS	131,830	0.99	0.96 ; 1.02	NS	29,872
>43.4; ≤82.6	1.01	0.99 ; 1.03	NS	129,648	0.98	0.95 ; 1.01	NS	26,707
<b>Month of TD</b>								
January	1.02	1.00 ; 1.05	0.061	148,136	1.00	0.96 ; 1.03	NS	33,749
February	0.91	0.89 ; 0.94	<0.001	136,239	0.95	0.92 ; 0.98	0.003	32,553
March	0.95	0.93 ; 0.97	<0.001	135,394	0.90	0.87 ; 0.93	<0.001	32,219

April	0.94	0.92 ; 0.97	<0.001	113,626	0.89	0.86 ; 0.92	<0.001	28,228
May	0.99	0.96 ; 1.02	NS	100,981	0.83	0.80 ; 0.86	<0.001	25,755
June	1.08	1.05 ; 1.11	<0.001	92,210	0.79	0.76 ; 0.82	<0.001	24,262
July	1.18	1.15 ; 1.22	<0.001	62,842	0.74	0.71 ; 0.77	<0.001	17,489
August	1.37	1.33 ; 1.42	<0.001	40,464	1.01	0.97 ; 1.06	NS	11,295
September	1.15	1.11 ; 1.18	<0.001	83,643	1.03	1.00 ; 1.07	0.081	23,409
October	1.00	0.97 ; 1.03	NS	111,314	0.99	0.96 ; 1.03	NS	28,349
November	1.04	1.01 ; 1.06	0.006	126,383	1.03	1.00 ; 1.07	0.065	28,654
December	1	Ref		130,415	1	Ref		29,438
Year of TD								
2008	1.02	1.00 ; 1.05	0.078	94,134	0.90	0.87 ; 0.93	<0.001	24,964
2009	1.02	1.00 ; 1.04	NS	167,909	0.92	0.89 ; 0.95	<0.001	43,579
2010	0.97	0.95 ; 0.99	0.003	168,139	0.98	0.95 ; 1.01	NS	40,893
2011	1.04	1.01 ; 1.06	0.001	172,252	0.96	0.93 ; 0.99	0.004	43,783
2012	1	Ref		171,092	1	Ref		41,973
2013	0.99	0.97 ; 1.01	NS	179,435	0.96	0.94 ; 0.99	0.010	42,332
2014	0.99	0.97 ; 1.01	NS	184,833	0.93	0.90 ; 0.96	<0.001	45,355
2015	0.89	0.87 ; 0.91	<0.001	143,853	1.03	0.99 ; 1.06	NS	32,521
Geographic area								
Intensive areas in western France	1	Ref		638,548	1	Ref		151,355
Field crops areas	1.20	1.09 ; 1.31	<0.001	75,477	0.99	0.91 ; 1.06	NS	21,193
Grassland areas in northern Massif Central	1.20	1.07 ; 1.33	0.001	49,362	1.05	0.96 ; 1.15	NS	13,287
Grassland areas in northwestern France	1.07	1.01 ; 1.15	0.028	181,075	0.99	0.94 ; 1.04	NS	42,566
Intensive piedmont areas	1.04	0.93 ; 1.16	NS	50,004	1.05	0.96 ; 1.15	NS	12,531
Mountains wetlands in Massif Central	1.22	1.06 ; 1.40	0.006	28,190	1.02	0.91 ; 1.14	NS	8,277
Mixed crop-livestock systems in Parisian Basin	1.14	1.07 ; 1.20	<0.001	258,991	1.03	0.98 ; 1.08	NS	66,191

<sup>1</sup>OR = odds-ratio adjusted for EL exposure status in addition to all adjustment variables.

<sup>2</sup>CI = confidence interval.

<sup>3</sup>P = P-value.

<sup>4</sup>Ref = Reference.

#### 4. Discussion

Cette étude épidémiologique est la première à notre connaissance à étudier la nutrition comme facteur préventif ou comme facteur curatif de MSC à grande échelle en fermes commerciales. La puissance statistique de l'étude nous a permis de détecter un effet curatif de faible amplitude d'une supplémentation en GLE à partir d'une quantité modeste de GLE.

##### *a) Fiabilité et pertinence de l'étude*

Les biais d'exposition liés aux hypothèses de distribution de la GLE (début de la distribution de la livraison des produits à base de GLE le lendemain de l'arrivée de la livraison sur la ferme, quantité identique distribuée à chaque vache en lactation quels que soient son stade de lactation et son niveau de production laitière) ont été largement discutés dans le chapitre 2, partie B. On peut cependant remarquer que les estimations de risque liés aux catégories TR (exposition à la GLE qui a commencé après le premier CL de la paire de CL mais avant le deuxième) et CO (exposition à la GLE qui s'est arrêtée après le premier CL de la paire de CL mais avant le deuxième) définies pour améliorer la fiabilité temporelle de l'exposition à la GLE sont une nouvelle fois cohérentes : pas d'association de TR avec le risque de guérison de MSC mais une augmentation du risque de MSC associé à CO.

Les facteurs de risque d'incidence et de guérison des MSC n'ont été que rarement étudiés, en particulier celles liées aux caractéristiques des vaches et au contexte spatio-temporel des observations qui sont les seuls mobilisables en étude rétrospective. En effet, souvent la variable à expliquer est une prévalence (au niveau du troupeau) ou un état individuel observé à un instant donné sans chercher à connaître la dynamique qui a abouti à cet état (CCS du lait le jour du contrôle et ses dérivés dichotomiques – supérieur ou inférieur à un seuil) (Bodoh et al., 1976; Coulon et al., 1996; Rupp et al., 2000; Ramírez et al., 2014) alors que la connaissance du moment d'apparition (ou non) d'un événement sanitaire est indispensable à la détermination de l'exposition au facteur de risque. Des publications plus récentes étudient les facteurs de risque d'incidence de mammites subcliniques, en prenant en compte leur durée, mais sans réellement étudier le processus de guérison (Cardozo et al., 2015; Frössling et al., 2017).

Dans ces conditions, peu d'études sont disponibles pour juger de la plausibilité des effets associés aux variables d'ajustement. Les risques accrus d'incidence et de non guérison de MSC associés à la saison estivale observés dans notre étude sont bien connus (Cardozo et al., 2015). Comme dans notre étude, la parité a été identifiée comme facteur de risque de nouvelles MSC : plus la parité augmente et plus le risque d'incidence de MSC augmente

(Cardozo et al., 2015; Frössling et al., 2017). Un stade de lactation supérieur à 100 jours a été identifié comme facteur de risque de persistance par Cardozo et al. (2015), ce qui est aussi en accord avec nos résultats. Dans cette même étude, le niveau de production laitière individuelle n'était pas associé ni au risque de nouvelles MSC ni au risque de persistance dans le modèle final retenu. Dans notre étude, le niveau de production laitière était associé au risque de guérison, les vaches faibles productrices ayant plus de chances de guérir. Ceci peut paraître logique, mais peut aussi être dû à un effet de confusion. En effet, la vache à CCS élevée au CL précédent, puisque c'est le critère pour que le CL étudié soit inclus, aurait eu une forte diminution de production laitière. Celle-ci, avec potentiellement d'autres signes cliniques, aurait été détectée par l'éleveur qui aurait décidé de lui administrer un traitement, traitement qui serait alors à l'origine de l'amélioration de la guérison au CL étudié.

### ***b) Hypothèses biologiques associées***

Dans notre étude, la supplémentation en GLE n'était pas associée à un effet préventif sur la survenue de MSC, mais elle était associée à un effet curatif. Dans les faits, il serait plus prudent de parler de réduction de la réponse inflammatoire à l'origine de la disparition de la MSC que de guérison, qui dans le cas des mammites sous-entend une élimination des bactéries, car aucune vérification de la guérison bactériologique n'a pu être mesurée. Toutefois, la réduction de réponses inflammatoires incontrôlées est une voie de recherche thérapeutique des maladies inflammatoires des vaches laitières en début de lactation, en particulier les mammites, afin de permettre de limiter les dommages tissulaires causées par l'inflammation (Sordillo, 2016; Mavangira and Sordillo, 2017; Ryman et al., 2017).

Nous pouvons émettre l'hypothèse que la supplémentation en acide  $\alpha$ -linoléique (ALA) et en anti-oxydants (i.e., lignanes) en quantité modeste (puisque à partir d'environ 170g/vache par jour de GLE) a modulé la réponse inflammatoire de l'hôte (effet anti-inflammatoire) et réduit le risque de persistance de MSC. Ces effets pourraient également provenir des dérivés de l'ALA formés lors de la biohydrogénation ruminale par hydrogénation (Basiricò et al., 2017) ou par élongation dans les tissus. Cependant, l'effet propre de l'ALA est à privilégier. En effet, ces résultats intéressants sont en cohérence avec l'expérience de Ryman et al. (2017) reposant sur l'exposition ex-vivo de leucocytes à des challenges microbiens. Ils ont observé une modulation dans un sens plutôt favorable de la synthèse des oxylipides (anti-inflammatoires) dans des leucocytes issus de vaches supplémentées en ALA par infusion abomasale (donc n'ayant pas subi de BHR) en comparaison de témoins issus de vaches non supplémentées ou supplémentées en acide



linoléique (LA). Une réduction de la réponse inflammatoire a aussi été observée in-vitro sur des cellules endothéliales bovines mises en présence de lipopolysaccharides après supplémentation en AG n-3 à longue chaîne (Contreras et al., 2012).

Ryman et al. (2017) font aussi l'hypothèse que le ratio ALA/LA serait plus influent sur la modulation de la réponse inflammatoire que la quantité absolue d'ALA apportée. Greco et al. (2015) ont d'ailleurs prouvé que la réponse inflammatoire de vaches soumises à une infusion de lipopolysaccharides dans la mamelle était diminuée lorsqu'elles recevaient une ration avec un ratio n-6/n-3 plus faible. Or on sait que même une supplémentation modeste en ALA fait varier ce ratio dans le lait (Meignan et al., 2017) et dans les tissus. Enfin, la synthèse des oxylipides à la supplémentation en ALA pourrait être différente selon l'agent pathogène rencontré (gram négatif ou gram positif) (Ryman et al., 2017). Cependant, dans notre étude nous ne disposons pas de cette information. Il serait donc intéressant de mener une étude prospective avec identification des agents pathogènes et supplémentation en GLE afin d'apporter des éléments de réponse à cette interrogation.

### *c) Conclusion*

Nous avons montré, qu'en conditions de terrain, la supplémentation en GLE en quantités modestes était associée à une moindre persistance des MSC. Cet effet pourrait s'expliquer par une réduction de la réponse inflammatoire suite à l'apport d'ALA. La principale inconnue qui demeure suite à ce travail est l'existence ou pas d'une meilleure guérison bactériologique en parallèle de la disparition des MSC. Au final, cette étude ouvre des perspectives sur l'intérêt thérapeutique de la nutrition chez la vache laitière, à l'heure où l'usage des antibiotiques doit être rationalisé.

## **Chapitre IV. Evaluation de l'intérêt économique de l'utilisation de la graine de lin extrudée par simulations**

*Les simulations décrites dans ce chapitre ont été effectuées par T.Meignan. Le paramétrage du troupeau a été effectué par A.Bekara. Le paramétrage des simulations a été effectué par P.Gontier pour les performances de production et T.Meignan pour les performances de reproduction. Les calculs de surcoût alimentaire ont été effectués par Valorex. La rédaction de ce chapitre de thèse a été assurée par T.Meignan, N.Bareille et A.Bekara.*

### **A. Introduction**

Compte tenu des effets contrastés de la GLE, un aliment haut de gamme, sur les performances animales, la question de l'analyse coûts-bénéfices de l'utilisation de la GLE en exploitation bovine laitière a déjà été soulevée et étudiée (Béguin et al., 2009). Cependant, cette étude montre trois limites importantes compte tenu des connaissances produites depuis cette date, en particulier dans cette thèse.

La première concerne la quantité de GLE qui a été évaluée. Se basant sur les études expérimentales disponibles alors, les auteurs ont retenu une supplémentation de 700 grammes de GLE par vache et par jour (1 kg d'un aliment composé de 70% de GLE). Nous avons pu montrer que sur la période de 2008 à 2015, la quantité journalière moyenne de GLE supplémentée était de 297 g/vache/jour et que seulement 12% des contrôles laitiers exposés étaient catégorisés au-dessus de 600g/vache/jour (Chapitre 2-B).

La deuxième limite de cette étude est relative aux effets sur la production laitière et les taux de matières utiles des vaches pris en compte (cf. Tableau 1.3) qui s'appuyaient sur les travaux réalisés en station expérimentale dans les années 1990. Ainsi, chacun des effets techniques sont moins favorables à ce qu'il a été estimé dans cette thèse dans les conditions actuelles d'utilisation de la GLE.

Enfin, seuls les effets induits par la supplémentation en GLE sur les performances de production ont été pris en compte. Pourtant, l'amélioration des performances de reproduction s'accompagne d'une amélioration du résultat économique des exploitations laitières (De Vries, 2006; Inchaisri et al., 2010; Kalantari and Cabrera, 2012). A titre d'exemple, Inchaisri et al. (2010) ont estimé l'impact de la réduction de l'intervalle entre deux vêlages successifs de 407 jours à 362 jours par un gain moyen de 34 euros par vache et par an. De plus, la moindre persistance des infections intra-mammaires réduit la durée des mammites

subcliniques et leurs conséquences néfastes sur la rentabilité de l'atelier laitier (Seegers et al., 2003).

Compte tenu de la diversité des effets bénéfiques observés, de la relative faiblesse de chacun d'entre eux, et des adaptations constantes des exploitations agricoles au contexte de prix et aux aléas subis sur leur troupeau, il est illusoire de chercher à quantifier les coûts-bénéfices de l'apport de GLE par étude observationnelle; l'approche par modélisation-simulation s'impose. Dans l'étude de Béguin et al. (2009), un modèle de budget partiel a été utilisé. Il permet d'estimer la variation d'un indicateur de résultat économique entre une situation initiale et une situation finale, résultant d'une décision. Cette méthode était adaptée aux hypothèses prises par ces auteurs qui ont raisonné sur des modifications, d'une part, des produits, induites par la valorisation différenciée du prix du lait, et d'autre part, de la composition de rations intégrant ou pas la GLE, et leurs conséquences sur le système fourrager. Dès lors que la fécondité est impactée, il est plus difficile de prévoir les modifications de produits et charges annuelles de l'exploitation. Le recours à une modélisation-simulation dynamique doit alors être privilégié.

L'objectif de ce chapitre de thèse est d'évaluer, par modélisation-simulation dynamique, l'intérêt économique de l'utilisation de la graine de lin extrudée en exploitation bovine laitière.

## **B. Matériel et méthodes**

### **1. Schéma d'étude et scénarios de simulations**

#### ***a) Description de l'atelier d'élevage laitier retenu***

L'intérêt économique de l'utilisation de la graine de lin extrudée peut varier selon les caractéristiques des exploitations bovines laitières concernées. Faute de temps, la priorité a été donnée à l'exploration des résultats dans le contexte dominant des clients de l'entreprise Valorex : l'élevage breton. Afin de se rapprocher du mieux possible de sa réalité technique et économique, un descriptif détaillé du fonctionnement et des performances de l'exploitation a été recherché dans l'observatoire INOSYS – réseaux d'élevage. Il s'agit d'un dispositif partenarial associant des éleveurs volontaires et des ingénieurs de l'Institut de l'élevage et des Chambres d'agriculture dont la finalité est la production de références sur les systèmes d'élevage herbivores.

L'atelier laitier modélisé est un atelier type breton intensif de plaine décrit en 2013. Le troupeau est composé de 50 vaches Prim'Holstein en lactation qui produisent en moyenne

9200 L/an à 40,2 g/L de TB et 32,8 g/L de TP, avec des performances de reproduction et de santé moyennes. La ration est majoritairement constituée d'ensilage de maïs associé à une utilisation maximale du pâturage du printemps à l'automne, et à de l'enrubannage l'hiver. La quantité de concentrés est maîtrisée : 1175 kg/VL/an.

### ***b) Scénarios d'apport de graine de lin extrudée***

Les scénarios testés sont au nombre de 9 : un scénario de référence (pas de distribution de GLE) et 8 scénarios qui correspondent à des stratégies différenciées de supplémentation en GLE. Les stratégies de supplémentation en GLE ont été définies selon la quantité de GLE apportée et selon le ciblage de la supplémentation sur certaines vaches. Il a été considéré que lorsque de la GLE est supplémentée, elle est substituée à une quantité d'aliments concentrés assurant le même apport énergétique et protéique et que l'apport de fourrage n'est pas modifié.

Quatre quantités journalières de GLE ont été testées ; elles correspondent à la valeur moyenne des classes de distribution distinguées dans l'étude épidémiologique : 27 g, 173 g, 427g et 789 g. Deux stratégies de distribution ciblée ont été testées : (1) toutes les vaches tout le temps, (2) les vaches à un stade de lactation inférieur à 180 jours tout le temps. Cette deuxième stratégie est justifiée par deux éléments : une supplémentation ciblée sur l'amélioration des performances de reproduction et une connaissance des effets sur la production laitière et les taux de matières utiles qui n'a été produite que sur les données de vaches à moins de 180 jours de lactation (Chapitre 2.2). Cette stratégie de distribution ciblée n'a cependant pas été testée avec la première quantité de supplémentation en GLE car aucun effet sur les performances de production n'a été observé (Chapitre 2.2).

### ***c) Contraintes de simulation***

De manière empirique, l'horizon temporel des simulations a été fixé à 8 ans dont 3 ans de scénario de référence. Durant les 3 années de référence, aucune utilisation de la GLE n'est simulée quel que soit le scénario. Cet horizon temporel est suffisant pour observer les effets de la GLE sur les performances zootechniques. Chaque simulation a été répliquée 250 fois afin de stabiliser les résultats étant donné la stochasticité du modèle.

Les simulations tendent à respecter chaque année un objectif de production de 450 000 L à un TB de 40,2 g/L avec possibilité de dépassement de 3%, selon les règles du quota matières grasses qui était appliqué en France jusqu'en mars 2015.

## 2. Description du modèle de simulation et paramétrages

### a) Principales caractéristiques du simulateur

Le modèle de fonctionnement d'atelier bovin laitier ECOMAST qui est en développement depuis 20 ans dans l'UMR BIOEPAR a été utilisé. C'est un modèle individu-centré (chaque individu est représenté et a ses caractéristiques propres détaillées dans des variables d'état), dynamique (ces caractéristiques individuelles évoluent dans le temps) et mécaniste (les processus biologiques et de décision sont représentés). Le modèle est aussi dit stochastique car une partie des processus biologiques et des décisions d'éleveur est représentée par des tirages aléatoires dans des lois statistiques. Il présente l'intérêt de représenter : le troupeau en permettant notamment d'intégrer la diversité des individus et la variabilité de leurs réponses biologiques (production, reproduction, événements sanitaires), les décisions de l'éleveur qui peuvent être prises finement selon les caractéristiques individuelles des animaux et enfin, les ventes de produits et les achats d'intrants qui forment, *in fine*, le résultat économique annuel de l'activité (Figure 4.1). Le pas de temps défini est le jour, permettant ainsi la modélisation des processus biologiques et des décisions de l'éleveur avec une bonne précision.

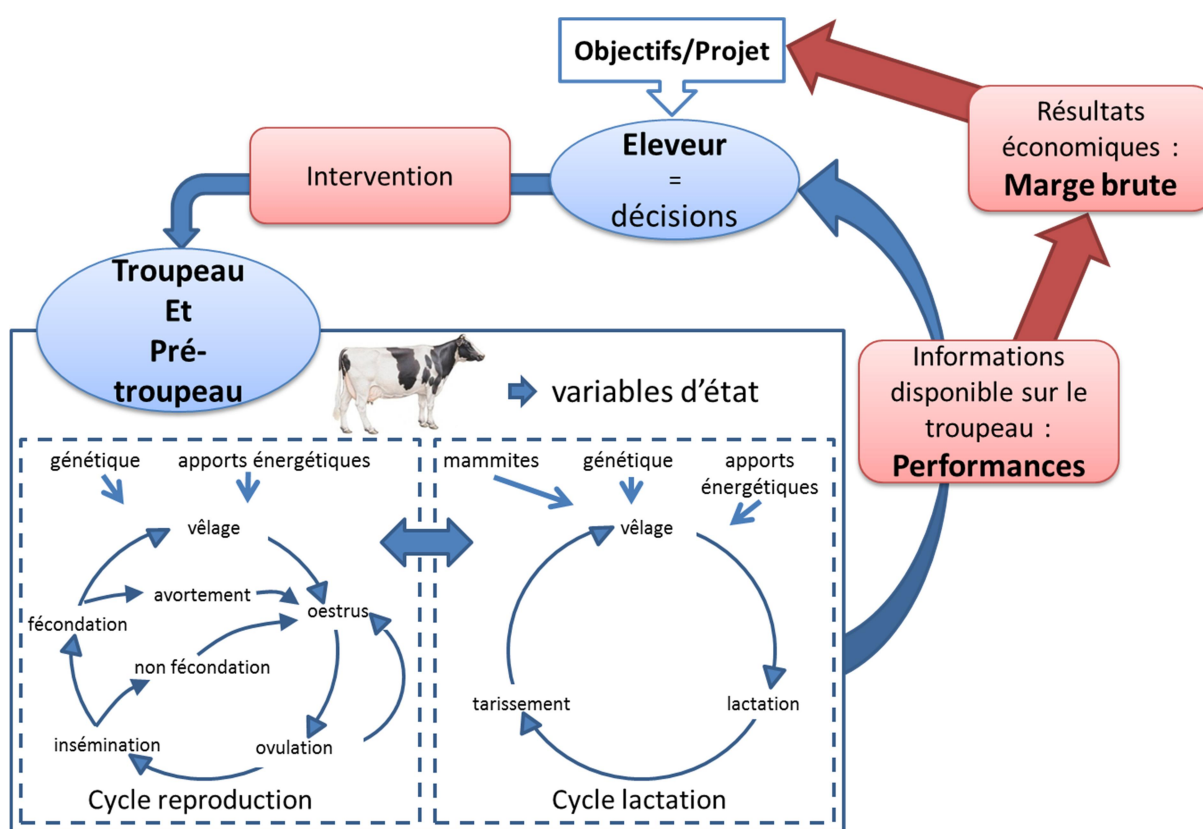


Figure 4.1 Schéma de l'organisation générale du simulateur ECOMAST (Dezetter, 2015).

Les individus représentés dans le simulateur sont les vaches et le pré-troupeau obtenu par auto-renouvellement. Les fonctions de production et de reproduction sont modélisées, l'une et l'autre, par une succession d'évènements qui subissent les influences mutuelles. Ces fonctions sont aussi influencées par la génétique des individus, les apports alimentaires et les troubles de santé. L'éleveur est représenté en tant que décisionnaire ; il prend des décisions relatives à la reproduction des animaux, à leur tarissement, au choix des femelles à conserver ou à réformer, etc. Les performances animales et économiques (marge brute de l'atelier) sont synthétisées avec un pas de temps annuel.

Le modèle a été décrit de façon détaillée dans une publication relative à l'étude des croisements entre races bovines laitières (Dezetter et al., 2017). Nous avons fait le choix ici de ne présenter que des éléments d'intérêt pour l'objectif de ce chapitre.

### ***b) Paramétrisation du troupeau initial***

La complexité de ce modèle dû au nombre élevé de paramètres utilisés et la stochasticité des processus simulés rend la calibration de l'élevage initial et des scénarios simulés plus difficile (Hofmann, 2005).

Afin de calibrer un élevage initial représentatif d'un système d'élevage de bovin laitier, nous avons eu recours à la méthode Approximate Bayesian Computation (**ABC**) pour estimer les paramètres d'entrée du modèle : la sensibilité de détection de chaleurs en fonction du niveau d'expression de chaleurs, de la parité et du rang d'ovulation postpartum (**Se**) et la probabilité de conception à 21 jours (**CR<sub>21</sub>**). Ces paramètres sont susceptibles de changer d'un système d'élevage à l'autre (cette méthode a permis d'en créer 12 dont le système breton que nous avons utilisé dans cette thèse). Les autres paramètres du modèle ont été fixés à partir : des données observées sur des cas types représentatifs du système d'élevage simulé (groupage des vêlages, niveau de production laitière, composition du troupeau), des données de la littérature, et de l'expertise des concepteurs du modèle (Dezetter et al., 2017). Nous avons choisi d'estimer ces deux paramètres (**Se** et **CR<sub>21</sub>**) car ils avaient l'effet le plus important sur les résultats technico-économiques des élevages bovins laitiers dans plusieurs analyses de sensibilité qui ont été faites sur des modèles de simulation (Inchaisri et al., 2010). La méthode ABC permet d'estimer les valeurs des paramètres d'un modèle par simulation, en étudiant la ressemblance entre les données observées et les données simulées par le modèle. Ainsi, les valeurs des paramètres d'entrée du modèle qu'on cherche à estimer (**Se** et **CR<sub>21</sub>**) sont tirées au sort dans une distribution définie, puis chaque valeur est utilisée pour simuler un jeu de données. Plus les données simulées sont semblables aux données observées, plus les valeurs

des paramètres tirées au sort et utilisées pour les simulations sont probables (Toni et al., 2009). Cependant, la probabilité de générer des données simulées présentant une distance faible par rapport aux données observées diminue rapidement lorsque la dimension des données augmente. Cela conduit à une diminution substantielle de l'efficacité d'estimation des paramètres par la méthode ABC. Une approche communément utilisée pour réduire ce problème consiste à remplacer les données observées avec un ensemble de statistiques résumées de dimension réduite, ces statistiques résumées sont sélectionnées de façon à capturer les informations pertinentes dans les données observées (Sunnåker et al., 2013). C'est-à-dire qu'on ne doit pas utiliser toutes les données observées pour estimer les paramètres du modèle, mais qu'il faut choisir des données pertinentes d'un point de vue du processus simulé. Les statistiques résumées utilisées dans le travail de création des troupeaux initiaux sont présentées dans le tableau 4.1.

**Tableau 4.1** Statistiques résumées utilisées pour l'estimation des paramètres d'entrée du modèle (Se et CR<sub>21</sub>).

	Statistiques résumées
Reproduction	<ul style="list-style-type: none"> <li>- IVV moyen</li> <li>- IVIA moyen</li> <li>- IVIAF moyen</li> <li>- IAF par IA moyen</li> <li>- Distribution mensuelle des vêlages (groupé ou étalé)</li> <li>- Age moyen au 1<sup>er</sup> vêlage</li> </ul>
Caractéristiques du troupeau	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Nombre de vaches</li> <li>- Nombre de génisses moins d'un an</li> <li>- Nombre de génisses âgées entre un an et 2 ans</li> <li>- Nombre de génisses âgées plus de 2 ans</li> <li>- % de réalisation du quota</li> </ul>

Les statistiques résumées des données observées, pour un système d'élevage donné, ont été obtenues à partir des données du système d'élevage de l'observatoire INOSYS – réseaux d'élevage, et de la base de données des performances de reproduction des élevages de bovins en France (Observatoire de la reproduction, projet Reproscope). L'observatoire a été utilisé pour calculer la moyenne des performances de reproduction, absente dans le fichier INOSYS, à partir des élevages représentatifs du système d'élevage simulé.

L'algorithme ABC utilisé pour estimer les paramètres d'entrée du modèle est le suivant (Toni et al., 2009) :

- (i) Échantillonner 500 valeurs de Se et CR<sub>21</sub> à partir d'une distribution uniforme [0-1]
- (ii) Simuler pour chaque valeur échantillonnée un jeu de données

(iii) Calculer les statistiques résumées (Tableau 4.1) pour les données observées  $S(X_O)$  et les données simulées  $S(X^*)$

(iv) Calculer pour chaque répétition la distance (d) entre  $S(X_O)$  et  $S(X^*)$ . Dans ce travail, nous avons utilisé la distance euclidienne :

$$d(S(X_O) \text{ et } S(X^*)) = \sqrt{\sum_{j=1}^S \left( \frac{S_j(X^*)}{k_j} - \frac{S_j(X_O)}{k_j} \right)^2}$$

où  $k_j$  est l'écart type empirique des  $j$  ( $j = 1, \dots, S$ ) statistiques résumées des données simulées  $S_j(X^*)$

(v) Fixer la valeur de la distance tolérée  $\epsilon$ . La distance tolérée est déterminée par la proportion des simulations conservées  $p_\epsilon$ . un  $p_\epsilon = x\%$  signifie qu'on garde que  $x\%$  des simulations qui ont la plus petite distance avec les données observées. Dans ce travail, nous avons fixé la valeur de  $p_\epsilon$  à 5%.

(vi) Estimer la médiane de  $Se$  et de  $CR_{21}$  à partir des paramètres d'entrée du modèle qui ont donné les simulations conservées dans l'étape (v). Ces médianes ont été utilisées pour simuler les valeurs initiales de chaque système d'élevage.

Enfin, les valeurs de prix du lait et des intrants correspondent aux prix disponibles dans le descriptif du système d'élevage et ont été complétés par des valeurs de prix de 2014.

### ***c) Paramétrisation des effets de la graine de lin extrudée sur les performances animales***

Les effets zootechniques qui ont été implémentés sont issus de l'étude épidémiologique (Tableau 4.2). La variabilité des réponses de production liée à la parité et à la quantité de GLE a été prise en compte. La variabilité des réponses liée à la nature des fourrages (baisse de 3,2 g/kg de TB avec une ration riche en ensilage de maïs) observée lors de la méta-analyse n'a pas été prise en compte malgré une part d'ensilage de maïs dans la ration distribuée élevée dans le système d'élevage étudié. Nous avons fait le choix de ne pas appliquer cette forte baisse étant donné les quantités élevées de GLE utilisées dans ces expérimentations et le manque d'associations avec d'autres fourrages. De plus, les effets moyens estimés dans l'étude épidémiologique intègrent déjà l'effet de ce fourrage, utilisé de façon dominante en exploitation bovine laitière mais souvent associé avec d'autres fourrages.



**Tableau 4.2** Rappel des effets de l'utilisation de graines de lin extrudées (GLE) sur les performances de production implémentés dans le simulateur ECOMAST.

Quantité de GLE	Effet zootechnique	Parité				
		1	2	3	4	5+
27 g/vache/j	PL (kg/j)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	TB (g/kg)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	TP (g/kg)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
173 g/vache/j	PL (kg/j)	0,39	0,59	0,70	0,76	0,66
	TB (g/kg)	-0,13	-0,41	-0,43	-0,42	-0,35
	TP (g/kg)	0,00	-0,03	-0,05	-0,08	-0,07
427 g/vache/j	PL (kg/j)	0,59	0,90	1,01	1,15	1,03
	TB (g/kg)	-0,26	-0,56	-0,72	-0,81	-0,56
	TP (g/kg)	0,00	-0,07	-0,10	-0,11	-0,14
789 g/vache/j	PL (kg/j)	0,78	1,13	1,24	1,30	1,21
	TB (g/kg)	-0,35	-0,75	-0,74	-0,90	-0,89
	TP (g/kg)	0,00	-0,10	-0,16	-0,12	-0,20

Le gain d'intervalle vêlage-IA première à représenter a été fixé à environ 4 jours pour chaque quantité de GLE. L'intervalle vêlage-IA première n'est pas une variable d'état qui s'applique à chaque vache, mais est un résultat de simulation qui dépend de la succession des évènements de reproduction de l'animal. Ainsi, pour obtenir ce gain moyen de 4 jours au niveau du troupeau, ce gain a été implémenté via l'amélioration de la sensibilité de détection des chaleurs par rapport au scénario de référence, évoluant de 50 à 60%.

Les effets associés à l'exposition à la GLE sur la persistance des mammites-subcliniques n'ont pas été pris en compte dans les simulations étant donné l'antériorité du travail de simulations par rapport au travail sur les mammites subcliniques.

### 3. Analyse des résultats

Les résultats présentés sont la moyenne des performances observées sur les années 6 à 8. Ainsi, les trois années de référence avant l'implémentation de la supplémentation en GLE et les deux années suivantes ne sont pas prises en compte.

#### *a) Analyse des performances zootechniques du troupeau en fonction des stratégies différenciées d'apport de GLE*

L'évolution sur les 3 années des performances zootechniques annuelles du troupeau pour les stratégies différenciées d'apport de GLE ont été analysées en écart aux performances zootechniques de référence sans apport de GLE. Les critères retenus pour mesurer l'intérêt des différentes stratégies sur les performances zootechniques des ateliers ont été :

- Pour les performances de production : la production laitière moyenne par vache présente-année, le TB et le TP annuel moyen du lait livré ;
- Pour les performances de reproduction : l'intervalle vêlage-IA première et l'intervalle vêlage-IA fécondante annuel moyen par vache.

***b) Analyse des performances économiques l'atelier en fonction des stratégies différenciées d'apport de GLE***

Le calcul de surcoût alimentaire a été effectué *a posteriori* des simulations. Le raisonnement pour évaluer ce surcoût est basé sur la différence de la valeur d'un volume iso-énergétique et iso-protéique d'un aliment classique qui est remplacé par de la GLE. La GLE est introduite sous forme du produit Tradi-Mega de Valorex qui contient 70% de graine de lin et 30% de son de blé. Les valeurs alimentaires de cet aliment, particulièrement riche en lipides, ont été recalculées à partir des valeurs des tables INRA (1,36 UFL, 150 PDIN, 122 PDIE et 18,4 % de protéine par kg brut). Sur la base d'une équivalence énergétique et protéique, il a été calculé qu'un kg de Tradi-Mega pouvait remplacer 1,3 kg d'un mélange de blé (88%) et de tourteau de soja (12%). L'écart de prix entre 1 kg de Tradi-Mega (0,54 €, prix moyen sur les 9 dernières années) et 1,3 kg du mélange blé - tourteau de soja (0,27 €, prix moyen sur la même période) est de 0,27 €, ce qui revient à un surcoût de 0,38 € pour un apport de 1 kg de GLE pure (0,27 / 70%). Selon la dose de GLE apportée, le surcoût alimentaire annuel par vache a donc été évalué à 3,80 € pour une dose de 0,27 g, à 24,37 € pour une dose de 173 g, à 60,16 € pour une dose de 427 g et à 111,16 € pour une dose de 789 g. Un compteur du nombre de jours-vaches recevant une dose de GLE a été introduit dans le simulateur pour pouvoir sommer le surcoût alimentaire annuel.

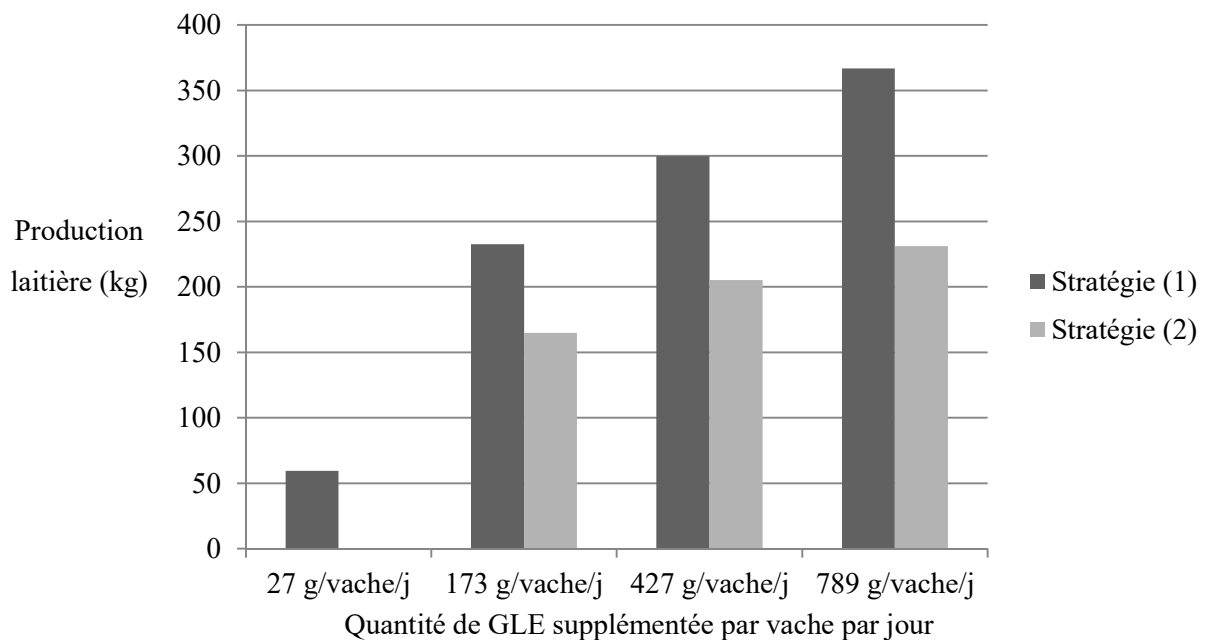
Le critère économique principal étudié a été la marge brute annuelle (MB) de l'atelier bovin laitier. Le simulateur produit une MB qui n'intègre ni le coût des fourrages ni la rémunération du travail. Son évolution sur les trois dernières années de simulation pour les stratégies différenciées de supplémentation en GLE a été analysée en écart aux performances économiques de référence sans supplémentation en GLE. Nous avons aussi choisi de montrer le différentiel de marge avant d'intégrer le coût d'introduction de la GLE dans la ration afin de ne pas dépendre d'un prix fixe alors qu'il est soumis à une forte variabilité sur le marché. Pour comprendre la formation de ce différentiel de marge brute, le produit, les charges opérationnelles et leurs composantes cumulées sur les années 6 à 8 ont été étudiés.

## C. Résultats et discussion

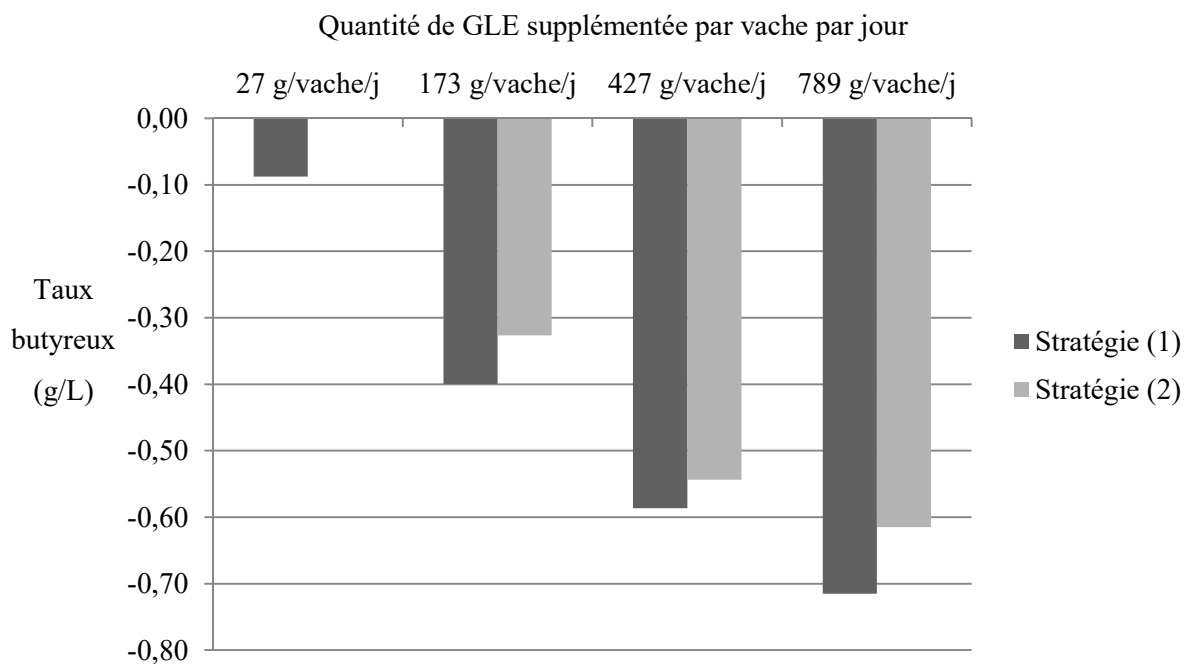
### 1. Effets sur les performances zootechniques du troupeau

Les performances du troupeau de référence (moyennes années 6 à 8) sont 8847 kg de lait produit par vache à 40,2 g/L de TB et 32,8 g/L de TP, 89,6 jours d'intervalle vêlage-IA première insémination et 130,8 jours d'intervalle vêlage-IA fécondante.

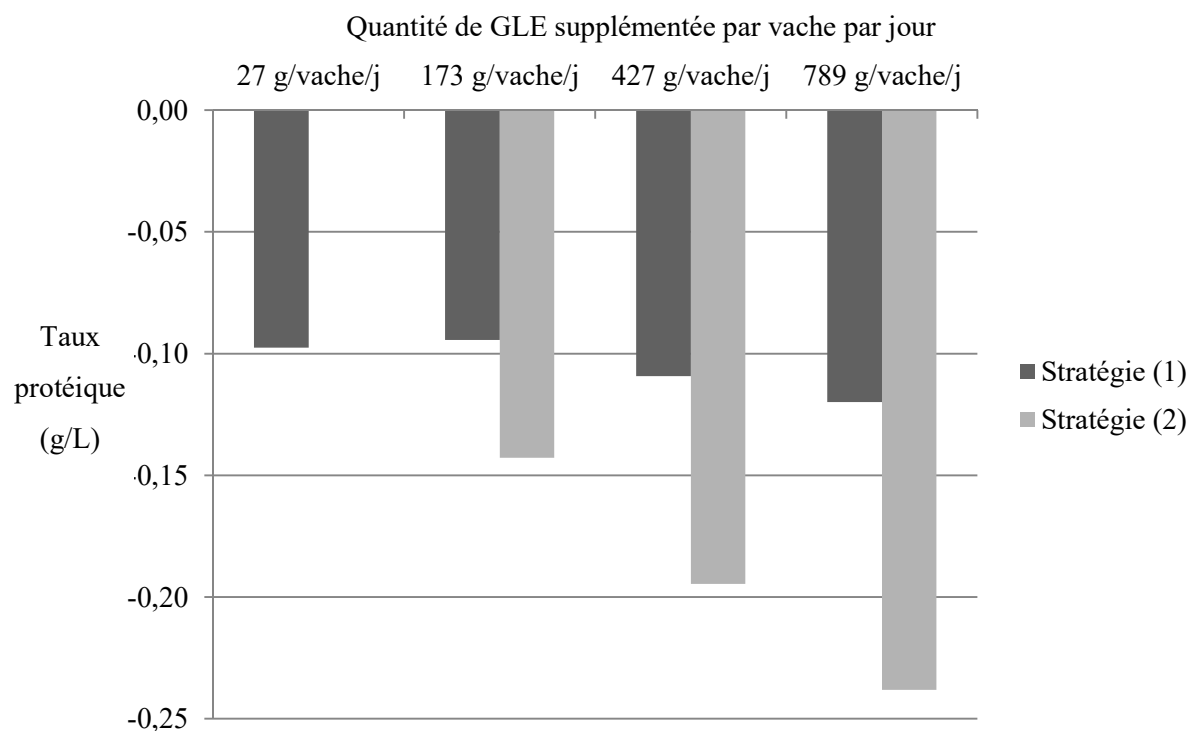
Les différences de performances du troupeau du scénario de référence avec les scénarios de supplémentation en GLE (stratégie 1, toutes les vaches) sont bien représentatives des hypothèses implémentées au niveau individuelle en amont (Figure 4.2, Figure 4.3, Figure 4.4, Figure 4.5, Figure 4.6).



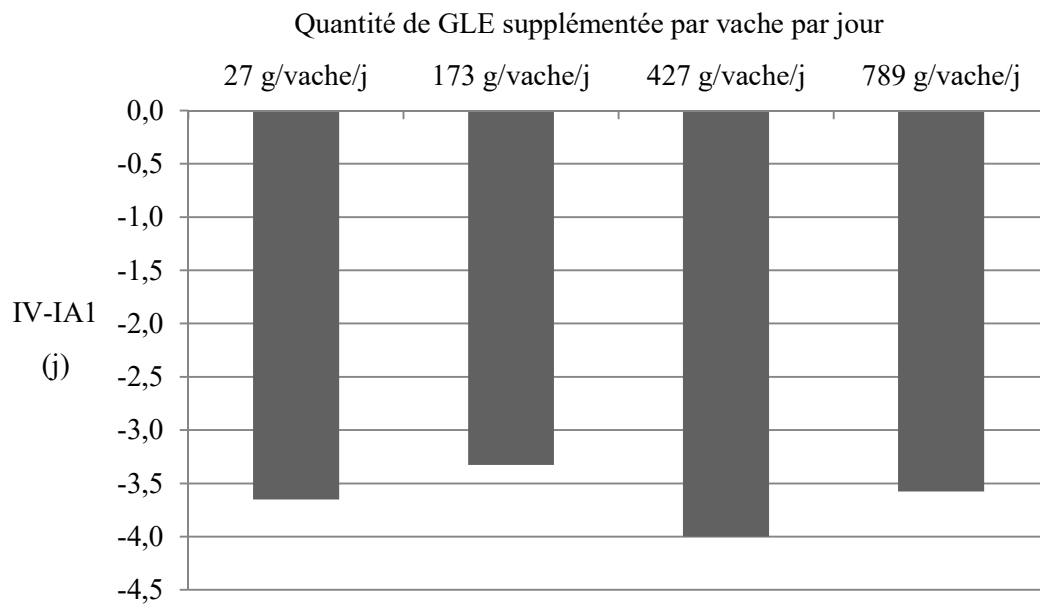
**Figure 4.2** Ecarts de production laitière individuelle (kg) entre le scénario de référence et les sept scénarios de supplémentation en GLE (moyenne des moyennes années 6 à 8). Stratégie (1) : toutes les vaches sont supplémentées. Stratégie (2) : seulement les vaches dans les 180 jours après vêlage sont supplémentées.



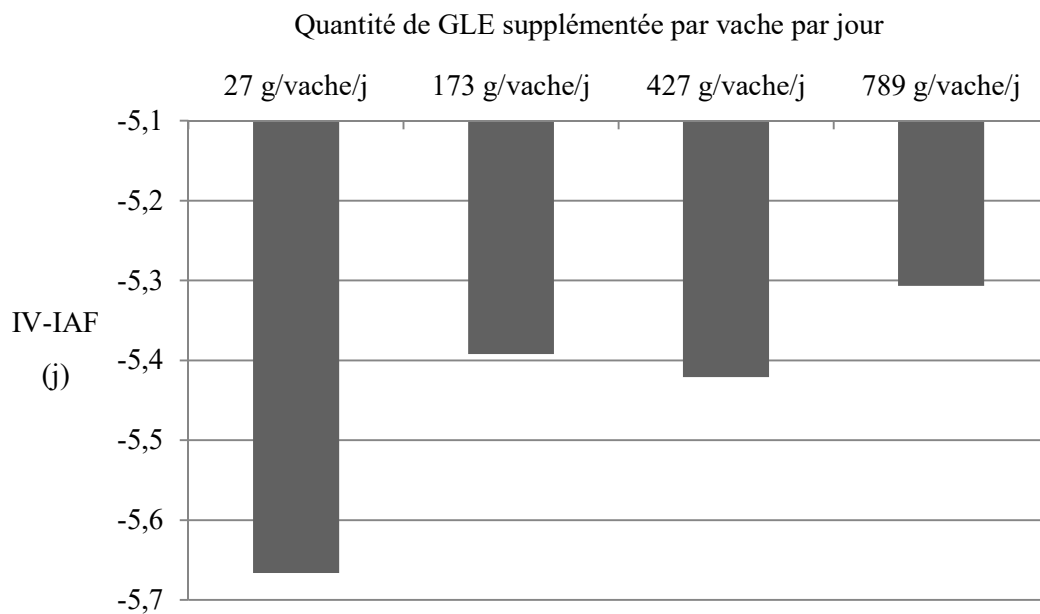
**Figure 4.3** Ecart de TB (g/L) entre le scénario de référence et les sept scénarios de supplémentation en GLE (moyenne des moyennes années 6 à 8). Stratégie (1) : toutes les vaches sont supplémentées. Stratégie (2) : seulement les vaches dans les 180 jours après vêlage sont supplémentées.



**Figure 4.4** Ecart de TP (g/L) entre le scénario de référence et les sept scénarios de supplémentation en GLE (moyenne des moyennes années 6 à 8). Stratégie (1) : toutes les vaches sont supplémentées. Stratégie (2) : seulement les vaches dans les 180 jours après vêlage sont supplémentées.



**Figure 4.5** Ecart d'intervalle-IA première entre le scénario de référence et les quatre principaux scénarios de supplémentation en GLE (moyenne des moyennes années 6 à 8).

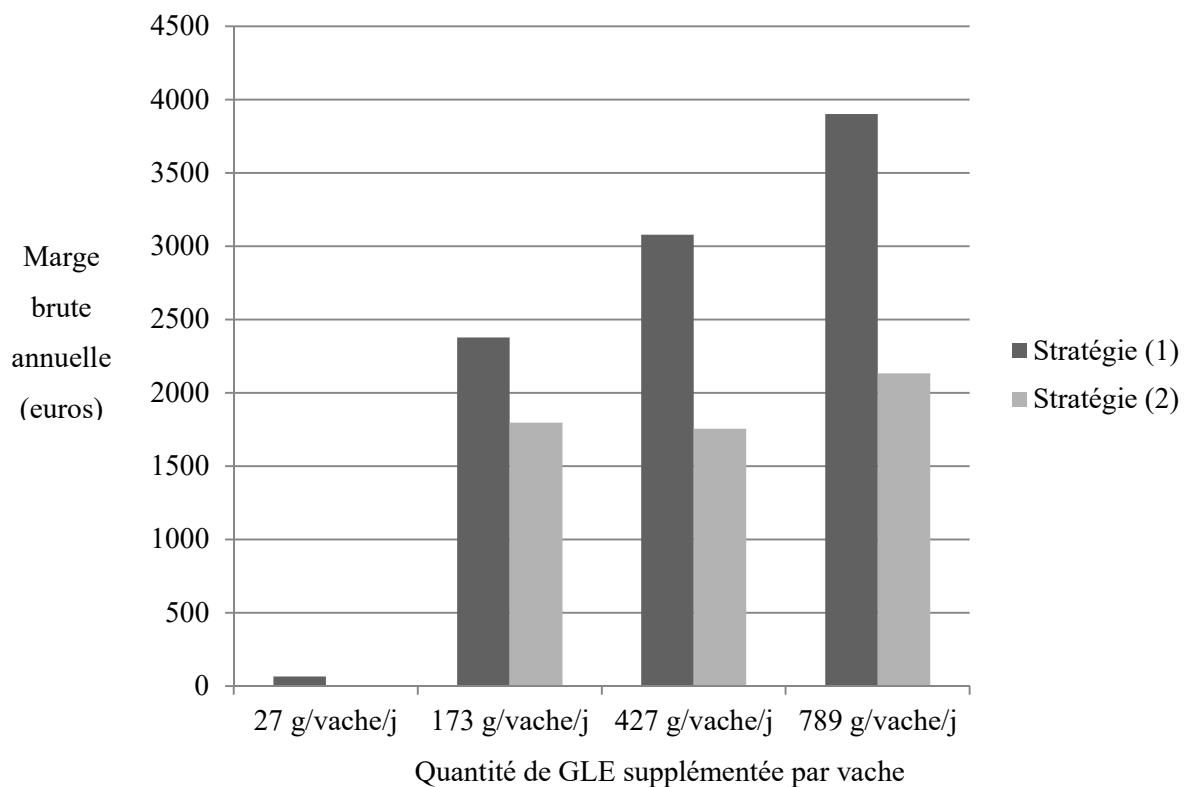


**Figure 4.6** Ecart d'intervalle-IA fécondante entre le scénario de référence et les quatre principaux scénarios de supplémentation en GLE (moyenne des moyennes années 6 à 8).

Les performances du troupeau avec la stratégie de supplémentation uniquement aux vaches dans les 180 jours après leur vêlage sont aussi cohérentes puisqu'intermédiaires entre le scénario de référence et le scénario avec la même quantité de GLE supplémentée mais pour toutes les vaches (Figure 4.2, Figure 4.3, Figure 4.4).

## 2. Effets sur les performances économiques de l'atelier

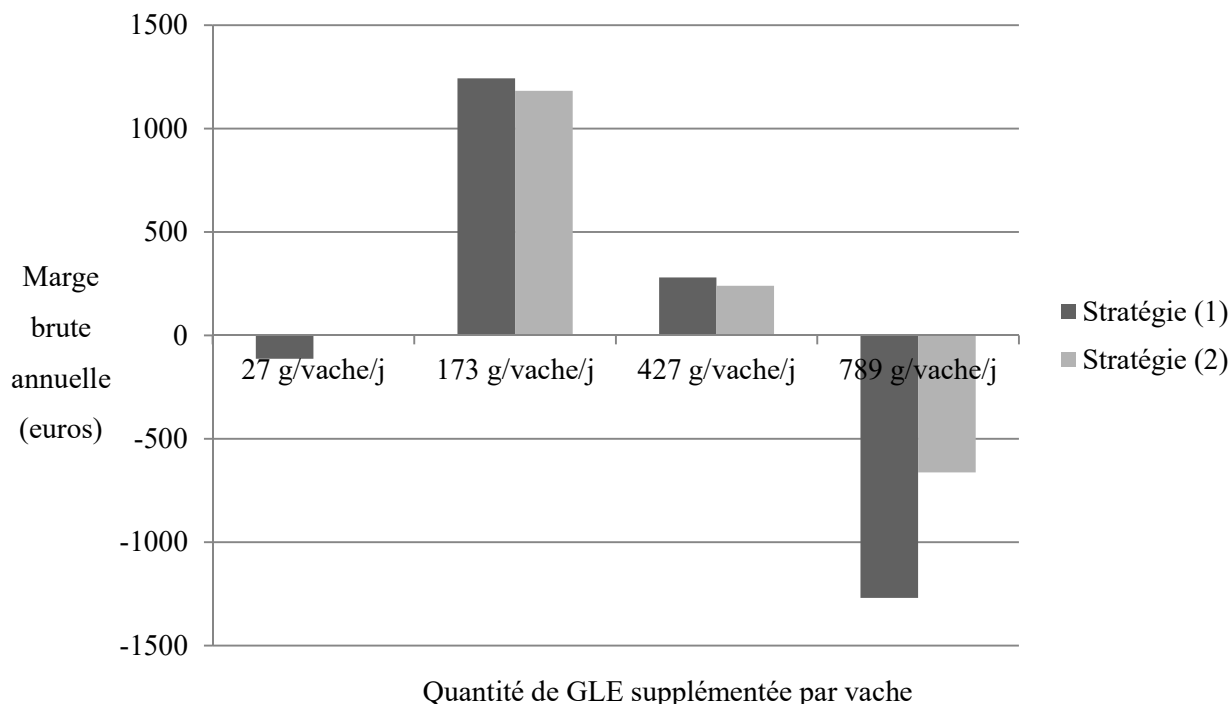
Avant l'intégration du surcoût alimentaire lié à l'introduction de la GLE dans la ration, toutes les stratégies de supplémentation en GLE dégagent une marge supérieure par rapport à une absence de supplémentation en GLE (Figure 4.7). L'augmentation de production laitière et l'amélioration de l'intervalle vêlage-IA première améliorent donc plus la marge que la baisse des taux de matières utiles ne la pénalise. L'effet du gain uniquement lié à l'amélioration de l'IVIA1 observé pour la supplémentation de 27 g/vache/j de GLE reste faible : +65euros/an et contribue de façon très secondaire à l'amélioration de la marge pour les niveaux plus élevés de supplémentation en GLE.



**Figure 4.7** Ecart de la marge brute annuelle (euros) entre le scénario de référence et les sept scénarios de supplémentation en GLE avant l'intégration du surcoût alimentaire lié à l'introduction de la GLE dans la ration (moyenne des moyennes années 6 à 8). Stratégie (1) : toutes les vaches sont

supplémentées. Stratégie (2) : seulement les vaches dans les 180 jours après vêlage sont supplémentées.

L'amélioration de la marge brute avec la stratégie de supplémentation uniquement aux vaches dans les 180 jours après leur vêlage (stratégie 2) progresse de façon modérée avec la dose. La différence de marge entre les trois supplémentations de la stratégie (1) est plus importante que la différence de marge entre ces mêmes supplémentations de la stratégie (2).



**Figure 4.8** Ecarts de la marge brute annuelle (euros) entre le scénario de référence et les sept scénarios de supplémentation en GLE après l'intégration du surcoût alimentaire lié à l'introduction de la GLE dans la ration (moyenne des moyennes années 6 à 8). Stratégie (1) : toutes les vaches sont supplémentées. Stratégie (2) : seulement les vaches dans les 180 jours après vêlage sont supplémentées.

Les conséquences économiques de l'utilisation de GLE varient d'un gain de marge brute de 1243 euros/an pour une supplémentation modeste en GLE (173 g/vache/j) à une perte de 1268 euros/an pour une supplémentation élevée en GLE (789 g/vache/j). Dans les exploitations utilisant les niveaux de supplémentation 27 g/vache/j et 427 g/vache/j, le surcoût de l'introduction de GLE dans la ration compense le gain économique lié à l'amélioration des performances animales.

Pour la supplémentation la plus élevée (789 g/vache/j), l'éleveur peut toutefois bénéficier d'une prime de 14 euros/1000L si le lait produit sur son exploitation est collecté en BBC, ce qui représenterait pour l'élevage du simulateur un produit supplémentaire de 6640 euros par an, et donc un gain final de marge brute finale de 5372 euros/an. La compensation financière nécessaire pour ne faire que maintenir le résultat économique initial de l'élevage simulé devrait être de 2,6 euros/1000L dans le contexte de la filière BBC alors que l'étude de Béguin et al. (2009) rapportait des compensations variant de 4,7 à 13,7 euros/1000L. La sévérité de leurs hypothèses techniques est à l'origine de cette différence.

Les conséquences économiques de l'utilisation de GLE sont probablement sous-estimées dans notre étude. En effet, nous n'avons pas pris en compte l'effet de la supplémentation en GLE sur la persistance des mammites subcliniques qui pourraient se traduire par un gain de production laitière, une baisse de pénalités pour une concentration en cellules somatiques du lait élevée et enfin une diminution des traitements antibiotiques. De plus, l'effet gain de travail induit par l'amélioration de la fécondité n'a pas non plus été pris en compte. Enfin, des externalités positives comme la réduction d'émission de méthane entérique induit par la supplémentation en GLE (Martin et al., 2008, 2016) n'ont pas été pris en compte.

Les conséquences économiques de l'utilisation de GLE issues de cette étude ont été estimées dans un système d'élevage particulier. De plus, seulement un seul facteur de variabilité, la quantité de GLE, a été pris en compte. Les interactions de la GLE avec les autres constituants de la ration n'ont pas été intégrées. L'extrapolation à d'autres systèmes d'élevage devrait donc se faire avec prudence. Enfin, une analyse de sensibilité au prix devrait être conduite notamment au prix des matières utiles dans le lait.

#### **D. Conclusion**

Les conséquences économiques de l'utilisation de GLE varient d'un gain de marge brute de 1243 euros/an pour une supplémentation modeste en GLE (173 g/vache/j) à une perte de 1268 euros/an pour une supplémentation élevée en GLE (789 g/vache/j) pour un système d'élevage type breton composé de 50 vaches laitières produisant 9000L de lait par an. Le gain économique lié à l'utilisation de GLE s'explique essentiellement par l'amélioration de la production laitière individuelle. Dans le cas de la filière BBC, la prime accordée sur la qualité nutritionnelle du lait permet de dégager une marge brute intéressante par rapport au scénario de référence : +5372 euros/an pour un quota de 450000L.



## Chapitre V. Discussion générale

### A. Réponses aux besoins de recherche

Rappelons ici que l'objectif de la thèse était de produire des connaissances sur les effets de l'utilisation de la GLE sur les performances animales en élevage bovin laitier, puis d'en estimer les conséquences économiques au niveau de l'exploitation bovine laitière. Nous avons ainsi estimé les effets de la GLE sur les performances laitières (production laitière et taux de matières utiles), la composition en acides gras du lait, les performances de reproduction, l'incidence et la persistance des mammites subcliniques, par deux approches scientifiques mobilisant deux sources de données complémentaires : la méta-analyse mobilisant la littérature scientifique, et l'épidémiologie observationnelle mobilisant les données des élevages commerciaux. Les conséquences économiques de l'utilisation de la GLE ont été explorées à partir des connaissances produites sur les réponses animales selon quatre niveaux de supplémentation par simulations.

#### *a) Une objectivation des effets de la graine de lin extrudée sur les performances animales en conditions de terrain*

Le premier enjeu résidait dans l'estimation des réponses animales à une supplémentation en GLE dans ses conditions d'utilisation actuelles. Ainsi, nous avons constaté, par une méta-analyse de la littérature scientifique, une utilisation de la GLE dans des quantités très supérieures à celles que l'entreprise préconise et que l'on a par la suite estimées dans l'étude épidémiologique à partir des données de livraisons de produits commerciaux à base de GLE. De ce fait, les résultats observés dans ces essais expérimentaux apparaissaient difficilement transférables aux élevages commerciaux puisque la quantité de lipides supplémentés sous forme d'AGPI est un des facteurs les plus importants dans la réussite de cette pratique. Cette analyse de la littérature justifiait alors déjà la pertinence du cœur du travail de thèse : l'étude de la GLE sur les performances animales en élevages commerciaux. De plus, la littérature scientifique sur les performances de reproduction était rare (la finalité des expérimentations étant souvent l'étude des éléments de fonction de la reproduction plutôt que des performances de reproduction) et les essais souvent mal décrits/reportés/réalisés. Ces deux points étaient soulignés aussi par Rodney et al. (2015) à plusieurs reprises dans leur récente méta-analyse du lien entre supplémentation lipidique et performances de reproduction. Ainsi, notre étude épidémiologique exposé/non exposé rétrospective, basée sur les données de

plus de 1200 élevages commerciaux dans des conditions d'utilisation actuelles de la GLE était pleinement justifiée.

Bien que notre caractérisation de l'exposition à la GLE soit soumise aux biais de distribution et d'ingestion différenciées entre vaches, les quantités journalières de GLE estimées étaient 4 fois plus faibles que celles utilisées par les chercheurs dans les essais expérimentaux avec en moyenne environ 300 g de GLE par vache en lactation. L'exploration des relations entre quantité de GLE et amplitude des effets sur les performances de production laitière nous a confortés dans la validité de la méthode d'estimation des quantités journalières de GLE à partir des livraisons d'aliments commerciaux contenant de la GLE. A titre d'exemple, les effets estimés sur le TB étaient, d'une part, en cohérence avec les mécanismes biologiques connus que nous avons rappelés dans la discussion de la méta-analyse, et d'autre part, parfaitement proportionnels à la dose de GLE et à la parité des vaches alors qu'ils ont été estimés avec des modèles distincts par parité. Que retenir comme ordres de grandeur des effets sur la production laitière associés à la consommation de GLE par les vaches laitières ? A la dose la plus utilisée sur le terrain, entre 50g et 300g par vache et par jour, une vache laitière en deuxième lactation produit 0,7 kg/j de lait en plus, 0,4 g/kg de TB et 0,03 g/kg de TP en moins.

Notre étude a permis de quantifier les effets associés aux performances de reproduction : une vache supplémentée en GLE, même à petite dose, a été inséminée pour la première fois, puis fécondée, environ 3 à 4 jours plus tôt qu'une vache n'en recevant pas, sans que l'incidence de retours en IA sur l'intervalle 18-78 jours n'ait été modifié. Elle apporte enfin des connaissances réellement originales sur les effets associés à une maladie à composante infectieuse, les mammites, montrant un moindre risque de persistance de mammites subcliniques chez une vache supplémentée en GLE.

La quantification des effets de la GLE sur les performances animales en conditions de terrain pourrait être biaisée par un facteur de confusion lié au meilleur conseil et suivi des élevages utilisant des produits à base de GLE ainsi qu'à une amélioration de l'attention de l'éleveur lorsqu'il utilise un aliment coûteux. Magrini et Duru (2014) en se basant sur des entretiens avec des groupements de producteurs du label Bleu-Blanc-Cœur (**BBC**) évoquent qu'il « est parfois difficile de distinguer les effets positifs de cette complémentation en lin des effets directement liés à un meilleur suivi des élevages ». Ainsi, le suivi régulier de la ration pour veiller au respect du cahier des charges BBC s'accompagne d'un appui plus personnalisé pour la maîtrise du système d'élevage (Magrini et Duru, 2014). L'obligation de résultat dans cette filière BBC impose aux éleveurs d'utiliser des quantités assez élevées de GLE assez

difficiles à maîtriser au vu des interactions digestives expliquées dans le chapitre 1. Cependant, on peut supposer qu'étant donnée la linéarité des associations quantité-effet observées entre la GLE et les réponses des performances de production dans notre étude, l'effet de ce facteur de confusion reste faible. De plus, l'inclusion de performances obtenues avant ou après les supplémentations en GLE intra-élevage sur tout le territoire français a limité l'effet de ce facteur de confusion.

Nous avons souvent relié au cours des chapitres précédents l'effet de la GLE à celui de l'ALA, qui représente environ 22% de la GLE, même si nous avons étudié l'exposition à la GLE et non à l'ALA. Les éleveurs ont pu apporter de l'ALA aux animaux via d'autres sources que la GLE Tradi-Lin. Cependant, l'information sur les rations distribuées aux vaches dans les élevages de notre étude n'était pas disponible de façon rétrospective. Un biais de confusion lié à d'autres apports alimentaires d'ALA a pu exister mais nous l'avons considéré comme faible par analyse de 3 sources d'apports non tracés potentiels. Premièrement, il est peu probable que l'éleveur ait pu acheter d'autres formes de lin ou d'autres GLE auprès de fournisseurs non partenaires de l'étude étant donnée la position monopolistique de Valorex en France. Deuxièmement, une autre source d'ALA est le concentré protéique de luzerne. Cependant, sa teneur en ALA reste faible par rapport à celle de la GLE (environ 6 fois moins entre les deux produits commerciaux composés l'un d'1 kg de concentré protéique de luzerne et l'autre de 0,7 kg de GLE dans l'essai de Hurtaud et al. (2013)), son intérêt étant plutôt un apport de protéines. Enfin, troisièmement, la dernière source intéressante d'ALA est l'herbe. Sa teneur en ALA est fonction d'une part, de son stade végétatif avec une teneur la plus élevée au printemps d'après la méta-analyse de Glasser et al. (2013), et d'autre part, de l'espèce, variant de 49 g/100 g total AG en moyenne pour du trèfle violet à 61 g/100 g total AG pour du ryegrass. Cette méta-analyse apporte une autre information essentielle qui est finalement assez peu discutée et rarement évoquée : l'effet du mode de récolte, ensilage ou foin apparait peu important au regard de la variabilité liée au stade végétatif (Glasser et al., 2013), mis à part un foin récolté dans de mauvaises conditions pouvant diminuer par deux la teneur en ALA. Or, nous faisons souvent l'hypothèse d'un facteur de confusion lié à la saison par l'apport d'ALA au pâturage de printemps. Mais, finalement, les quantités d'herbe ingérées par le pâturage ne sont pas forcément plus importantes que celles ingérées par le foin et l'ensilage d'herbe en hiver, et donc d'ALA. Nous avons toutefois réalisé les modèles statistiques de l'étude épidémiologique sur les variables de production uniquement en période hivernale afin d'étudier cet effet saison. Cependant, aucune différence dans les effets estimés de l'exposition à la GLE n'a été observée. Une baisse du TB est observée sur les mois de mars

à septembre par rapport aux mois d'hiver (Tableau 2.9), pouvant correspondre à l'apport d'ALA via l'herbe pâturée. Cet effet est cependant plus difficile à objectiver sur les performances de reproduction étant donnée la durée importante d'exposition requise pour l'inclusion d'une IA dans nos modèles (du vêlage jusqu'à 17 jours après l'IA). De plus, un autre facteur de confusion entre en jeu puisque les chaleurs seraient mieux détectées au printemps par l'éleveur grâce à des signaux comportementaux comme le chevauchement plus exprimés au pâturage (Cutullic et al., 2009).

### ***b) Une variabilité de ces performances difficile à explorer***

L'étude épidémiologique ne nous a permis d'estimer qu'un effet moyen de la supplémentation en GLE à partir de 1200 élevages sur les performances animales, de la production à la santé. Or, la méta-analyse nous avait confirmé une information importante : l'effet d'interaction entre la supplémentation en GLE et la ration associée. Le nombre limité de données (n = 29) par rapport à l'hétérogénéité des rations rencontrées dans les essais ne nous a pas permis d'identifier finement les caractéristiques physico-chimiques de la ration modulant les effets de la GLE. Mais nous avons quand même mis en évidence l'effet de certains fourrages : un apport élevé d'ensilage de maïs agit négativement sur le TB tandis que l'apport de foin de luzerne semble exercer un pouvoir tampon dans le rumen qui neutralise cet effet. L'influence de la ration associée à la GLE n'a pas pu être analysée dans l'étude épidémiologique du fait du caractère rétrospectif de l'étude. On peut faire l'hypothèse que l'utilisation des données de rations des entreprises de conseil en élevage (une donnée par mois au niveau troupeau) aurait pu apporter des connaissances sur l'effet de la nature des fourrages avec des quantités de GLE modestes. Nous avons essayé de corriger des effets estimés de la supplémentation en GLE, les effets pédoclimatiques, et par extrapolation les effets fourrages, en incluant la variable décrivant la zone géographique dans chacun de nos modèles. Cependant, les effets ont été compliqués à analyser, encore plus lorsque des interactions ont été testées. Enfin, la variabilité des réponses aurait été intéressante à caractériser aussi en fonction de l'apport d'herbe de la ration afin de répondre à la question posée précédemment des facteurs de confusion d'apport d'ALA sous forme d'herbe.

Les hypothèses que nous avons dû prendre pour mesurer l'exposition (début de la distribution de la livraison des produits à base de GLE le lendemain de l'arrivée de la livraison sur la ferme, quantité identique distribuée à chaque vache en lactation quels que soient son stade de lactation et son niveau de production laitière) nous ont contraints à ne pas explorer l'influence du timing de supplémentation en GLE. En effet, pour sécuriser la

séquence temporelle d'exposition, nous avons inclus d'une part, des troupeaux avec des livraisons régulières de produits à base de GLE, et d'autre part, uniquement des IAs réalisées sur des vaches supplémentées du vêlage jusqu'à 17 jours après l'IA. Or, nous pouvons faire l'hypothèse que ce timing est important pour l'étude des performances de reproduction et que des périodes devraient être ciblées en priorité en fonction des effets biologiques des AG supplémentés (Silvestre et al., 2011; Dirandeh et al., 2013b). Nous ne pouvons pas nous attendre au même effet lorsque l'on supplémente de J0 à J40 après vêlage ou qu'à partir de J30 ou J50. Les expérimentations devraient être plus rigoureuses sur ce paramètre ; souvent le choix du début de la supplémentation en AGPI post-partum n'est ni discuté ni justifié. Nous avons essayé d'étudier les performances de reproduction en assouplissant la règle d'inclusion des IAs, par exemple inclure les IAs dont l'exposition a débuté seulement au moins 21 jours ou 42 jours avant, le nombre de données était faiblement réduit ce qui ne nous a pas permis d'observer de changement dans les résultats.

### *c) Une analyse économique simplifiée*

Les conséquences économiques de l'utilisation de GLE varient d'un gain de marge brute de 1243 euros/an pour une supplémentation modeste en GLE (173 g/vache/j) à une perte de 1268 euros/an pour une supplémentation élevée en GLE (789 g/vache/j). Cependant, pour l'exploitation simulée, l'utilisation de cette supplémentation élevée en GLE, si on applique la prime BBC de 14 euros/1000L, permet un gain de marge brute de 5372 euros/an.

Le manque d'analyse de la variabilité des effets de la supplémentation en GLE selon la ration à laquelle elle était associée, nous a contraints dans le choix de nos scénarios de simulation pour estimer les conséquences économiques de l'utilisation de la GLE. En effet, seulement la notion de quantité de GLE supplémentée a pu être étudiée. La notion de timing de la supplémentation en GLE (pris en compte grossièrement : toute la lactation ou seulement durant les 180 premiers jours de lactation) a été étudié, d'une part pour un intérêt zootechnique avec l'usage de la GLE pour améliorer la reproduction, et d'autre part, pour ne pas faire d'inférence par rapport à nos résultats de l'étude épidémiologique.

Les simulations économiques n'ont été réalisées qu'à partir du système d'élevage type breton. Pourtant, il aurait été intéressant d'explorer les conséquences économiques de l'utilisation de la GLE dans un deuxième système d'élevage, celui rencontré dans le département du Doubs où de nombreux éleveurs utilisent de GLE dans leur troupeau. En effet, le contexte de prix (valorisation du lait en AOP), de la ration (cahier des charges AOP, valorisation de l'herbe, interdiction ensilage de maïs) et le choix de la race sont différents.

Cependant, les analyses de l'effet de la supplémentation en GLE sur les performances de production et de reproduction chez la vache Montbéliarde n'ont été que partiellement réalisées faute de temps. De plus, le manque d'information pour prendre en compte la variabilité des effets de la GLE selon la ration associée en conditions de terrain ont rendu les simulations dans ce système herbager moins intéressantes.

### **B. Des résultats de la recherche au terrain : de nouveaux positionnements de l'utilisation de la graine de lin extrudée hors et dans la filière Bleu-Blanc-Cœur**

L'effet bénéfique associé à la supplémentation de faibles doses de GLE sur la reproduction des vaches laitières que nous avons mis en évidence permet d'envisager le développement de l'utilisation de la GLE par des éleveurs peu attirés par le discours d'intensification laitière à l'animal. Ainsi, beaucoup d'éleveurs pourraient intégrer de la GLE à moindre coût dans la ration de leurs animaux pour bénéficier des effets positifs sur la reproduction. De plus, le nouveau chapitre que l'on a ouvert sur le lien entre GLE et santé des vaches laitières pourrait aussi les intéresser. La supplémentation en GLE en petites quantités pourrait ainsi trouver sa place chez des éleveurs qui cherchent avant tout à bien valoriser leur herbe.

Au sein de la filière BBC, la valorisation du concept de « one health » pourrait être intéressante. Ainsi, Magrini et Duru (2014) ont axé la discussion de l'analyse de la filière BBC sur l'ouverture du label à des systèmes plus autonomes et herbagers via la dimension environnementale. Cependant l'obligation de résultats, sur le niveau d'AG n-3 à atteindre, reste une contrainte à l'entrée des éleveurs dans le label sous sa forme actuelle. Refaire le lien nutrition-santé mais cette fois via la santé des animaux à l'aide de ces nouvelles connaissances scientifiques permettrait de revenir à la base du label de BBC développé pour des raisons de santé humaine.

Les nouvelles connaissances apportées sur la reproduction et la santé animales permettent d'envisager un rapprochement de ces deux « voies » d'utilisation de la GLE (hors ou dans la filière BBC) par un intérêt économique qui va au-delà de la prime qualité du lait de BBC : l'objectif d'une triple performance santé-environnement-économie via la nutrition animale.

## **C. Des nouvelles voies scientifiques à explorer par l'épidémiologie mais aussi par l'essai expérimental**

Les connaissances scientifiques créées sur l'association entre la supplémentation en GLE et les performances de reproduction et de santé ouvrent la voie à de nouvelles recherches à conduire, par l'épidémiologie mais aussi par l'expérimentation.

### *a) Une étude prospective nécessaire pour étudier la santé des veaux*

Nous évoquons dans l'introduction des éléments sur lien entre supplémentation en GLE et santé des veaux. L'effet d'une supplémentation en GLE chez la mère au tarissement (ou en lactation avec l'hypothèse d'une lipomobilisation des AG n-3 en début de la lactation suivante) permet de modifier la composition en AG du colostrum vers un profil qui serait plus favorable à la santé des veaux (Santschi et al., 2009; Leiber et al., 2011; Lerch et al., 2015). Des travaux intéressants ont été menés avec cette idée de transfert très précoce au veau, mais avec des apports d'aliments riches en AGPI plutôt en acide linoléique (**LA**) (Garcia et al., 2014a; b, 2016b), ou bien avec des sources riches en AG n-3 (Moallem and Zachut, 2012). Ces derniers ne sont pas allés au bout de leur idée en se limitant seulement à l'étude du transfert placentaire par la composition en AG du plasma sanguin du veau nouveau-né. Les travaux de Garcia et al. ont montré que l'ingestion de ce colostrum issu de mères supplémentées en AGS ou en AGPI pourrait aussi favoriser l'absorption des immunoglobulines G (**IgG**) (Garcia et al., 2014a). Plusieurs hypothèses pourraient expliquer ce phénomène. La supplémentation en AG pourrait modifier l'activité du récepteur FcRn du tractus intestinal impliqué dans le passage des IgG du colostrum dans l'intestin des veaux par un changement dans la composition en AG des membranes cellulaires. De plus, une amélioration de la fluidité membranaire grâce aux AGPI permettrait d'améliorer aussi la circulation des IgG. Enfin, une hypothèse spécifique au rôle des AG n-3 pourrait être émise sur un taux de vidange gastrique plus rapide chez des veaux ayant reçu un colostrum plus riche en AG n-3, favorisant une absorption plus rapide des IgG dans l'intestin.

La supplémentation en AGPI des veaux sevrés contribue à améliorer leur santé et leurs performances. Ainsi, de nombreux essais expérimentaux ont montré une augmentation du gain moyen quotidien et de l'efficacité alimentaire, une réduction du nombre de jours avec diarrhée, ainsi qu'une modification des réponses immunitaires et inflammatoires après vaccination, lors d'enrichissement de leur aliment d'allaitement ou aliment de démarrage en ALA et en LA (Hill et al., 2007a; b; c, 2009, 2011, Garcia et al., 2015, 2016b).

Les éléments de connaissance sur la supplémentation des vaches en fin de gestation peuvent pourtant être considérés suffisamment probants pour quantifier les bénéfices pour la santé et la croissance des veaux en conditions de terrain, où l'exposition aux agents pathogènes pourrait permettre de mieux extérioriser les effets bénéfiques de l'alimentation reçue par les veaux. Cependant, les bases de données nationales ne peuvent renseigner que sur la mortalité des veaux, indicateur sanitaire qui ne permet pas de juger spécifiquement des capacités de défense immunitaire du veau. Ainsi, une étude épidémiologique prospective de type exposé/non exposé avec suivi de la survenue de troubles de santé des veaux, voire aussi de la qualité du colostrum et de l'efficacité transfert immunité passive chez le nouveau-né, pourrait venir compléter nos travaux.

### ***b) Une exploration complémentaire des effets trans-générationnels***

Garcia et al. (2016a) sont allés jusqu'au bout de leurs études sur le lien entre supplémentation en AGPI et santé des veaux puisqu'ils ont aussi étudié les performances des génisses en première lactation en fonction de leur exposition fœtale aux AG, afin d'explorer les effets dit trans-générationnels. Leurs résultats sont assez peu intéressants et souffrent d'une manque de puissance statistique mais leur expérimentation n'était pas forcément faite pour étudier spécifiquement ces effets.

Nous avons aussi commencé à étudier ces effets en comparant les performances de reproduction de vaches exposées ou non à la GLE au cours de la période fœtale dans une approche aussi exploratoire. Nos résultats provisoires indiquent que la fécondité des vaches exposées *in utero* sont meilleures que celles non exposées même si elles ne reçoivent pas de GLE elles-mêmes. Une sécurisation de la mesure de l'exposition et des facteurs d'ajustement introduits dans les modèles doit être réalisée avant publication de ce résultat.

En plus de l'exploration des effets que nous avons commencé à explorer avec les données à notre disposition, l'étude prospective envisagée ci-dessus à partir de vaches gestantes exposées ou non à la GLE pourraient permettre aussi d'estimer les effets de la GLE reçue *in utero* sur les performances laitières et de reproduction des génisses durant leur première lactation.



*c) Des mécanismes biologiques complexes, à élucider par l'expérimentation*

L'étude épidémiologique nous a permis de mettre en évidence supplémentation en GLE associée à une réduction de l'intervalle-vêlage-IA1. Nous avons notamment fait l'hypothèse que les chaleurs seraient mieux exprimées grâce à l'ALA mais aussi grâce aux lignanes, qui sont des polyphénols anti-oxydants mais aussi des phytoestrogènes. Cependant, la littérature scientifique est très rare sur ce sujet. On pourrait s'appuyer sur l'utilisation de capteurs comme les détecteurs de chaleurs afin de tester l'hypothèse émise dans notre travail. La principale difficulté pour comprendre les mécanismes biologiques des effets zootechniques de la GLE sur la reproduction et la santé sera d'identifier quels sont les agents biologiques en cause et quels effets biologiques associés sont à prendre en compte : stress oxydatif, inflammation, etc.. L'épidémiologie ne peut que quantifier les associations entre exposition et événement de santé ou de reproduction, l'expérimentation doit compléter cette approche pour prouver le lien de causalité.

## **Chapitre VI. Conclusion générale**

Cette collaboration entre entreprises du secteur de l'alimentation animale, Valorex et Terrena, et établissements d'enseignement supérieur et de recherche, Oniris-INRA et ESA, a permis de réaliser une étude épidémiologique exposé/non exposé très originale quant à la mesure de l'exposition. Les ressentis d'éleveurs sur des effets favorables de la graine de lin extrudée sur les performances et la santé des vaches laitières ont pu être objectivés. Ainsi, les effets de la supplémentation en graine de lin extrudée dans les conditions d'utilisation du terrain se traduisent par une amélioration de la production laitière individuelle, une modeste diminution des taux de matières utiles du lait et une amélioration de la fécondité, voire de la santé des animaux.

Le recours au simulateur d'exploitation bovine laitière de l'UMR Oniris-INRA BIOEPAR a permis d'explorer l'intérêt économique pour un éleveur à utiliser de la graine de lin extrudée. La supplémentation souvent utilisée dans la filière BBC permet de maximiser le gain de marge brute lorsque l'éleveur bénéficie de la prime basée sur la qualité de la matière grasse du lait. Mais ce travail a aussi montré que d'autres niveaux de supplémentation en graine de lin extrudée sont rémunérateurs pour l'éleveur sans intégrer les externalités positives pour la société.

De nouvelles pistes de recherche ont pu être dégagées sur l'implication de la graine de lin extrudée et de ses composants sur les fonctions de reproduction et sur les phénomènes inflammatoires. Ainsi, une réduction du risque de la persistance de mammites subcliniques a été observée dans les élevages commerciaux. Ce résultat avant-gardiste au regard de la littérature scientifique permet d'envisager de nouvelles voies thérapeutiques via la nutrition animale.

Enfin, ce travail de thèse est le premier, à notre connaissance, à explorer le lien entre nutrition animale et performances animales par une étude épidémiologique d'une telle ampleur. Ce travail montre qu'il peut être très intéressant de sortir du cadre de recherche stéréotypé de l'essai en conditions contrôlées pour étudier les effets de la nutrition animale.

## Références

- Ailhaud, G., F. Massiera, P. Weill, P. Legrand, J. Alessandri, and P. Guesnet. 2006. Temporal changes in dietary fats: Role of n-6 polyunsaturated fatty acids in excessive adipose tissue development and relationship to obesity. *Prog. Lipid Res.* 45:203–236. doi:10.1016/j.plipres.2006.01.003.
- Akram, F., M.-C. Nicot, P. Weill, and F. Enjalbert. 2006. Effects of preconditioning and extrusion of linseed on the ruminal biohydrogenation of fatty acids. 2. In vitro and in situ studies. *Anim. Res.* 55:261–271. doi:10.1051/animres:2006023.
- Albert, C.M. 1998. Fish Consumption and Risk of Sudden Cardiac Death. *JAMA.* 279:23. doi:10.1001/jama.279.1.23.
- Albert, C.M., H. Campos, M.J. Stampfer, P.M. Ridker, J.E. Manson, W.C. Willett, and J. Ma. 2002. Blood Levels of Long-Chain n-3 Fatty Acids and the Risk of Sudden Death. *N. Engl. J. Med.* 346:1113–1118.
- Allen, M.S. 2000. Effects of diet on short-term regulation of feed intake by lactating dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 83:1598–1624. doi:10.3168/jds.S0022-0302(00)75030-2.
- Ambrose, D.J., J.P. Kastelic, R. Corbett, P.A. Pitney, H.V. Petit, J.A. Small, and P. Zalkovic. 2006. Lower Pregnancy Losses in Lactating Dairy Cows Fed a Diet Enriched in  $\alpha$ -Linolenic Acid. *J. Dairy Sci.* 89:3066–3074. doi:10.3168/jds.S0022-0302(06)72581-4.
- ANSES. 2011. Actualisation des apports nutritionnels conseillés pour les acides gras 2006-SA-0359. 323 pp.
- ANSES. 2015. Apports en acides gras de la population vivant en France et comparaison aux apports nutritionnels conseillés définis en 2010 2014-SA-0117. 192 pp.
- Barceló-Coblijn, G., and E.J. Murphy. 2009. Alpha-linolenic acid and its conversion to longer chain n-3 fatty acids: Benefits for human health and a role in maintaining tissue n-3 fatty acid levels. *Prog. Lipid Res.* 48:355–374. doi:10.1016/j.plipres.2009.07.002.
- Basiricò, L., P. Morera, D. Dipasquale, A. Tröscher, and U. Bernabucci. 2017. Comparison between conjugated linoleic acid and essential fatty acids in preventing oxidative stress in bovine mammary epithelial cells. *J. Dairy Sci.* 100:2299–2309. doi:10.3168/jds.2016-11729.
- Bauman, D., and J. Griinari. 2001. Regulation and nutritional manipulation of milk fat: low-fat milk syndrome. *Livest. Prod. Sci.* 70:15–29. doi:10.1016/S0301-6226(01)00195-6.
- Bauman, D.E., and J.M. Griinari. 2003. Nutritional regulation of milk fat synthesis. *Annu. Rev. Nutr.* 23:203–227. doi:10.1146/annurev.nutr.23.011702.073408.

- Beaudeau, F., and C. Fourichon. 1998. Estimating relative risk of disease from outputs of logistic regression when the disease is not rare. *Prev. Vet. Med.* 36:243–256. doi:10.1016/S0167-5877(98)00095-6.
- Bedere, N., C. Disenhaus, V. Ducrocq, S. Leurent-Colette, and L. Delaby. 2017a. Ability of dairy cows to ensure pregnancy according to breed and genetic merit for production traits under contrasted pasture-based systems. *J. Dairy Sci.* 100:2812–2827. doi:10.3168/jds.2016-11588.
- Bedere, N., C. Disenhaus, V. Ducrocq, S. Leurent-Colette, and L. Delaby. 2017b. Ability of dairy cows to be inseminated according to breed and genetic merit for production traits under contrasting pasture-based feeding systems. *animal.* 11:826–835. doi:10.1017/S1751731116002111.
- Béguin, E., P. Brunschwig, G. Heumez, C. Garnier, and B. Gilles. 2009. Enrichir le lait en oméga 3 avec la graine de lin - Impact technico-économique d'un concentré à base de graine de lin extrudée dans 2 systèmes fourragers. Institut de l'Élevage, Paris. 1-12 pp.
- Bender, K., S. Walsh, A.C.O. Evans, T. Fair, and L. Brennan. 2010. Metabolite concentrations in follicular fluid may explain differences in fertility between heifers and lactating cows. *Reproduction.* 139:1047–1055. doi:10.1530/REP-10-0068.
- Block, E., and E. Evans. 2010. A model to compare effects of supplemental fat sources on performance and dry matter intake in dairy cows: Effects of fat inclusion level. *J. Dairy Sci.* 93(E-suppl:440).
- Bodoh, G.W., W.J. Battista, L.H. Schultz, and R.P. Johnston. 1976. Variation in Somatic Cell Counts in Dairy Herd Improvement Milk Samples. *J. Dairy Sci.* 59:1119–1123. doi:10.3168/jds.S0022-0302(76)84331-7.
- Bork, N.R., J.W. Schroeder, G.P. Lardy, K.A. Vonnahme, M.L. Bauer, D.S. Buchanan, R.D. Shaver, and P.M. Fricke. 2010. Effect of feeding rolled flaxseed on milk fatty acid profiles and reproductive performance of dairy cows. *J. Anim. Sci.* 88:3739–3748. doi:10.2527/jas.2010-2841.
- Brunschwig, P., P. Augeard, P. Weill, and Y. Chilliard. 1995. Effets de l'apport d'un concentré enrichi en matières grasses sur les performances des vaches laitières à l'ensilage de maïs. *Rencontres autour des Rech. sur les ruminants.* 2:215–218.
- Brunschwig, P., C. Hurtaud, Y. Chilliard, and F. Glasser. 2010. L'apport de lin dans la ration des vaches laitières: Effets sur la production, la composition. *INRA Prod. Anim.* 23:307–318.
- Brunschwig, P., P. Kernen, and P. Weill. 1997. Effets de l'apport d'un concentré enrichi en

- acides gras polyinsaturés sur les performances de vaches laitières à l'ensilage de maïs. *Rencontres autour des Rech. sur les ruminants*. 4:361.
- Brunschwig, P., P. Kernen, and P. Weill. 1998. Effets d'une supplémentation en acides gras polyinsaturés sur les performances de vaches laitières en milieu de lactation. *Rencontres autour des Rech. sur les ruminants*. 5:262.
- Burdge, G.C., and P.C. Calder. 2005. Conversion of  $\alpha$ -linolenic acid to longer-chain polyunsaturated fatty acids in human adults. *Reprod. Nutr. Dev.* 45:581–597. doi:10.1051/rnd:2005047.
- Butler, W.R. 2003. Energy balance relationships with follicular development ovulation and fertility in postpartum dairy cows. *Livest. Prod. Sci.* 83:211–218. doi:10.1016/S0301-6226(03)00112-X.
- Calder, P.C. 2013. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: nutrition or pharmacology? *Br. J. Clin. Pharmacol.* 75:645–662. doi:10.1111/j.1365-2125.2012.04374.x.
- Cardozo, L.L., A. Thaler Neto, G.N. Souza, L.C.A. Picinin, N.C. Felipus, N.L.M. Reche, F.A. Schmidt, D. Werncke, and E.E. Simon. 2015. Risk factors for the occurrence of new and chronic cases of subclinical mastitis in dairy herds in southern Brazil. *J. Dairy Sci.* 98:7675–7685. doi:10.3168/jds.2014-8913.
- Chilliard, Y., M. Doreau, G. Gagliostro, Y. Elmeddah, and others. 1993. Addition de lipides protégés (encapsulés ou savons de calcium) à la ration de vaches laitières. Effets sur les performances et la composition du lait. *INRA Prod. Anim.* 6:139–150.
- Chilliard, Y., and A. Ferlay. 2004. Dietary lipids and forages interactions on cow and goat milk fatty acid composition and sensory properties. *Reprod. Nutr. Dev.* 44:467–492. doi:10.1051/rnd:2004052.
- Chilliard, Y., F. Glasser, A. Ferlay, L. Bernard, J. Rouel, and M. Doreau. 2007. Diet, rumen biohydrogenation and nutritional quality of cow and goat milk fat. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 109:828–855. doi:10.1002/ejlt.200700080.
- Chilliard, Y., C. Martin, J. Rouel, and M. Doreau. 2009. Milk fatty acids in dairy cows fed whole crude linseed, extruded linseed, or linseed oil, and their relationship with methane output. *J. Dairy Sci.* 92:5199–5211. doi:10.3168/jds.2009-2375.
- Connor, W.E. 2000. Importance of n-3 fatty acids in health and disease. *Am. J. Clin. Nutr.* 71:171S–5S.
- Contreras, G.A., S.A. Mattmiller, W. Raphael, J.C. Gandy, and L.M. Sordillo. 2012. Enhanced n-3 phospholipid content reduces inflammatory responses in bovine

- endothelial cells. *J. Dairy Sci.* 95:7137–7150. doi:10.3168/jds.2012-5729.
- Coulon, J.B., F. Dauver, and J.P. Garel. 1996. Facteurs de variation de la numération cellulaire du lait chez des vaches laitières indemnes de mammites cliniques. *INRA Prod. Anim.* 9:133–139.
- Cutullic, E., L. Delaby, D. Causeur, G. Michel, and C. Disenhaus. 2009. Hierarchy of factors affecting behavioural signs used for oestrus detection of Holstein and Normande dairy cows in a seasonal calving system. *Anim. Reprod. Sci.* 113:22–37. doi:10.1016/j.anireprosci.2008.07.001.
- Dezetter, C. 2015. Evaluation de l'intérêt du croisement entre races bovines laitières. Oniris. 225 pp.
- Dezetter, C., N. Bareille, D. Billon, C. Côrtes, C. Lechartier, and H. Seegers. 2017. Changes in animal performance and profitability of Holstein dairy operations after introduction of crossbreeding with Montbéliarde, Normande, and Scandinavian Red. *J. Dairy Sci.* 100:8239–8264. doi:10.3168/jds.2016-11436.
- Dirandeh, E., A. Towhidi, Z. Ansari Pirsaraei, F. Adib Hashemi, M. Ganjkanlou, S. Zeinoaldini, A. Rezaei Roodbari, T. Saberifar, and H.V. Petit. 2013a. Plasma concentrations of PGFM and uterine and ovarian responses in early lactation dairy cows fed omega-3 and omega-6 fatty acids. *Theriogenology.* 80:131–137. doi:10.1016/j.theriogenology.2013.03.012.
- Dirandeh, E., A. Towhidi, S. Zeinoaldini, M. Ganjkanlou, Z. Ansari Pirsaraei, and A. Fouladi-Nashta. 2013b. Effects of different polyunsaturated fatty acid supplementations during the postpartum periods of early lactating dairy cows on milk yield, metabolic responses, and reproductive performances. *J. Anim. Sci.* 91:713–721. doi:10.2527/jas.2012-5359.
- Djabri, B. 2002. Valeur informative de la concentration en cellules somatiques du lait de quartier pour identifier l'infection intramammaire des vaches laitières Valeur informative de la concentration en cellules somatiques du lait de quartier pour identifier l'infection i. Université Rennes I. 222 pp.
- Dobson, H., R. Smith, M. Royal, C. Knight, and I. Sheldon. 2007. The High-producing Dairy Cow and its Reproductive Performance. *Reprod. Domest. Anim.* 42:17–23. doi:10.1111/j.1439-0531.2007.00906.x.
- Dohoo, I.R., and K.E. Leslie. 1991. Evaluation of changes in somatic cell counts as indicators of new intramammary infections. *Prev. Vet. Med.* 10:225–237. doi:10.1016/0167-5877(91)90006-N.

- Doreau, M., and A. Ferlay. 2015. Linseed: a valuable feedstuff for ruminants. *OCL*. 22:D611. doi:10.1051/ocl/2015042.
- Doreau, M., V. Fievez, A. Troegeler-Meynadier, and F. Glasser. 2012. Métabolisme ruminal et digestion des acides gras longs chez le ruminant: le point des connaissances récentes. *INRA Prod. Anim.* 25:361–374.
- Doreau, M., S. Laverroux, J. Normand, G. Chesneau, and F. Glasser. 2009. Effect of Linseed Fed as Rolled Seeds, Extruded Seeds or Oil on Fatty Acid Rumen Metabolism and Intestinal Digestibility in Cows. *Lipids*. 44:53–62. doi:10.1007/s11745-008-3250-x.
- Ducrocq, V., and G. Casella. 1996. A Bayesian analysis of mixed survival models. *Genet. Sel. Evol.* 28:505–529. doi:10.1186/1297-9686-28-6-505.
- Dulin, A.M., M.J. Paape, and B.T. Weinland. 1982. Cytospin Centrifuge in Differential Counts of Milk Somatic Cells. *J. Dairy Sci.* 65:1247–1251. doi:10.3168/jds.S0022-0302(82)82337-0.
- Egger, P., G. Holzer, S. Segato, E. Werth, F. Schwienbacher, G. Peratoner, I. Andrighetto, and A. Kasal. 2007. Effects of oilseed supplements on milk production and quality in dairy cows fed a hay-based diet. *Ital. J. Anim. Sci.* 6:395–405. doi:10.4081/ijas.2007.395.
- Eilander, A., R.K. Harika, and P.L. Zock. 2015. Intake and sources of dietary fatty acids in Europe: Are current population intakes of fats aligned with dietary recommendations? *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 117:1370–1377. doi:10.1002/ejlt.201400513.
- Ferlay, A., L. Bernard, A. Meynadier, and C. Malpuech-Brugère. 2017. Production of trans and conjugated fatty acids in dairy ruminants and their putative effects on human health: A review. *Biochimie*. 141:107–120. doi:10.1016/j.biochi.2017.08.006.
- Ferlay, A., M. Doreau, C. Martin, and Y. Chilliard. 2013. Effects of incremental amounts of extruded linseed on the milk fatty acid composition of dairy cows receiving hay or corn silage. *J. Dairy Sci.* 96:6577–6595. doi:10.3168/jds.2013-6562.
- Ferrand-Calmels, M., I. Palhière, M. Brochard, O. Leray, J.M. Astruc, M.R. Aurel, S. Barbey, F. Bouvier, P. Brunschwig, H. Caillat, M. Douguet, F. Faucon-Lahalle, M. Gelé, G. Thomas, J.M. Trommenschlager, and H. Larroque. 2014. Prediction of fatty acid profiles in cow, ewe, and goat milk by mid-infrared spectrometry. *J. Dairy Sci.* 97:17–35. doi:10.3168/jds.2013-6648.
- Fourichon, C., H. Seegers, and X. Malher. 2000. Effect of disease on reproduction in the dairy cow: a meta-analysis. *Theriogenology*. 53:1729–1759. doi:10.1016/S0093-691X(00)00311-3.
- Friggens, N.C., C. Disenhaus, and H. V Petit. 2010. Nutritional sub-fertility in the dairy cow:

- towards improved reproductive management through a better biological understanding. *Animal*. 4:1197–1213. doi:10.1017/S1751731109991601.
- Frössling, J., A. Ohlson, and C. Hallén-Sandgren. 2017. Incidence and duration of increased somatic cell count in Swedish dairy cows and associations with milking system type. *J. Dairy Sci.* 100:7368–7378. doi:10.3168/jds.2016-12333.
- Fuentes, M.C., S. Calsamiglia, C. Sánchez, A. González, J.R. Newbold, J.E.P. Santos, L.M. Rodríguez-Alcalá, and J. Fontecha. 2008. Effect of extruded linseed on productive and reproductive performance of lactating dairy cows. *Livest. Sci.* 113:144–154. doi:10.1016/j.livsci.2007.03.005.
- Garcia, M., L.F. Greco, E. Block, J.E.P. Santos, W.W. Thatcher, and C.R. Staples. 2016a. Programming effect of dietary fatty acids on performance of Holstein heifers from birth through first lactation. *Anim. Feed Sci. Technol.* 222:64–74. doi:10.1016/j.anifeedsci.2016.10.003.
- Garcia, M., L.F. Greco, M.G. Favoreto, R.S. Marsola, L.T. Martins, R.S. Bisinotto, J.H. Shin, A.L. Lock, E. Block, W.W. Thatcher, J.E.P. Santos, and C.R. Staples. 2014a. Effect of supplementing fat to pregnant nonlactating cows on colostrum fatty acid profile and passive immunity of the newborn calf. *J. Dairy Sci.* 97:392–405. doi:10.3168/jds.2013-7086.
- Garcia, M., L.F. Greco, M.G. Favoreto, R.S. Marsola, D. Wang, J.H. Shin, E. Block, W.W. Thatcher, J.E.P. Santos, and C.R. Staples. 2014b. Effect of supplementing essential fatty acids to pregnant nonlactating Holstein cows and their preweaned calves on calf performance, immune response, and health. *J. Dairy Sci.* 97:5045–5064. doi:10.3168/jds.2013-7473.
- Garcia, M., L.F. Greco, A.L. Lock, E. Block, J.E.P. Santos, W.W. Thatcher, and C.R. Staples. 2016b. Supplementation of essential fatty acids to Holstein calves during late uterine life and first month of life alters hepatic fatty acid profile and gene expression. *J. Dairy Sci.* 99:7085–7101. doi:10.3168/jds.2015-10472.
- Garcia, M., J.H. Shin, A. Schlaefli, L.F. Greco, F.P. Maunsell, J.E.P. Santos, C.R. Staples, and W.W. Thatcher. 2015. Increasing intake of essential fatty acids from milk replacer benefits performance, immune responses, and health of preweaned Holstein calves. *J. Dairy Sci.* 98:458–477. doi:10.3168/jds.2014-8384.
- Giordano, E., and F. Visioli. 2014. Long-chain omega 3 fatty acids: Molecular bases of potential antioxidant actions. *Prostaglandins, Leukot. Essent. Fat. Acids.* 90:1–4. doi:10.1016/j.plefa.2013.11.002.



- Glasser, F., M. Doreau, G. Maxin, and R. Baumont. 2013. Fat and fatty acid content and composition of forages: A meta-analysis. *Anim. Feed Sci. Technol.* 185:19–34. doi:10.1016/j.anifeedsci.2013.06.010.
- Glasser, F., P. Schmidely, D. Sauvant, and M. Doreau. 2008. Digestion of fatty acids in ruminants: a meta-analysis of flows and variation factors: 2. C18 fatty acids. *Animal.* 2:691–704. doi:10.1017/S1751731108002036.
- Greco, L.F., J.T.N. Neto, A. Pedrico, R.A. Ferrazza, F.S. Lima, R.S. Bisinotto, N. Martinez, M. Garcia, E.S. Ribeiro, G.C. Gomes, J.H. Shin, M.A. Ballou, W.W. Thatcher, C.R. Staples, and J.E.P. Santos. 2015. Effects of altering the ratio of dietary n-6 to n-3 fatty acids on performance and inflammatory responses to a lipopolysaccharide challenge in lactating Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 98:602–617. doi:10.3168/jds.2014-8805.
- Gröhn, Y.T., J.J. McDermott, Y.H. Schukken, J.A. Hertl, and S.W. Eicker. 1999. Analysis of correlated continuous repeated observations: modelling the effect of ketosis on milk yield in dairy cows. *Prev. Vet. Med.* 39:137–153. doi:10.1016/S0167-5877(98)00145-7.
- Gröhn, Y.T., and P.J. Rajala-Schultz. 2000. Epidemiology of reproductive performance in dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.* 60–61:605–614. doi:10.1016/S0378-4320(00)00085-3.
- Gulliver, C.E., M. a. Friend, B.J. King, and E.H. Clayton. 2012. The role of omega-3 polyunsaturated fatty acids in reproduction of sheep and cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 131:9–22. doi:10.1016/j.anireprosci.2012.02.002.
- Harvatine, K.J., Y.R. Boisclair, and D.E. Bauman. 2009. Recent advances in the regulation of milk fat synthesis. *Animal.* 3:40. doi:10.1017/S1751731108003133.
- Hill, T.M., J.M. Aldrich, R.L. Schlotterbeck, and H.G.B. Ii. 2007a. Effects of changing the fat and fatty acid composition of milk replacers fed to neonatal calves. *Prof. Anim. Sci.* 23:135–143.
- Hill, T.M., J.M. Aldrich, R.L. Schlotterbeck, and H.G.B. Ii. 2007b. Amino Acids , Fatty Acids , and Fat Sources for Calf Milk Replacers. *Prof. Anim. Sci.* 23:401–408.
- Hill, T.M., J.M. Aldrich, R.L. Schlotterbeck, and H.G.B. Ii. 2007c. Effects of Changing the Fatty Acid Composition of Calf Starters. *Prof. Anim. Sci.* 23:665–671.
- Hill, T.M., H.G. Bateman, J.M. Aldrich, and R.L. Schlotterbeck. 2009. Effects of changing the essential and functional fatty acid intake of dairy calves. *J. Dairy Sci.* 92:670–676. doi:10.3168/jds.2008-1368.
- Hill, T.M., M.J. VandeHaar, L.M. Sordillo, D.R. Catherman, H.G. Bateman, and R.L. Schlotterbeck. 2011. Fatty acid intake alters growth and immunity in milk-fed calves. *J. Dairy Sci.* 94:3936–3948. doi:10.3168/jds.2010-3935.

- Hofmann, M. 2005. On the Complexity of Parameter Calibration in Simulation Models. *J. Def. Model. Simul. Appl. Methodol. Technol.* 2:217–226. doi:10.1177/154851290500200405.
- Hurtaud, C., S. Buchin, F. Berodier, G. Duboz, and E. Beuvier. 2012. Effet de combinaisons d'aliments riches en acides gras oméga 3 sur le profil en acides gras du lait et les caractéristiques physico-chimiques et sensorielles d'un fromage de type pâte pressée cuite. Effect of mixtures of food rich in omega 3 fatty acids o. *Rencontres autour des Rech. sur les ruminants.* 19:418.
- Hurtaud, C., G. Chesneau, D. Coulmier, and J.L. Peyraud. 2013. Effects of extruded linseed or alfalfa protein concentrate in interaction with two levels of concentrates on milk production and composition in dairy cows. *Livest. Sci.* 158:64–73. doi:10.1016/j.livsci.2013.10.002.
- Huws, S.A., E.J. Kim, S.J.S. Cameron, S.E. Girdwood, L. Davies, J. Tweed, H. Vallin, and N.D. Scollan. 2015. Characterization of the rumen lipidome and microbiome of steers fed a diet supplemented with flax and echium oil. *Microb. Biotechnol.* 8:331–341. doi:10.1111/1751-7915.12164.
- Inchaisri, C., R. Jorritsma, P.L.A.M. Vos, G.C. van der Weijden, and H. Hogeveen. 2010. Economic consequences of reproductive performance in dairy cattle. *Theriogenology.* 74:835–846. doi:10.1016/j.theriogenology.2010.04.008.
- Jahani-Moghadam, M., E. Mahjoubi, and E. Dirandeh. 2015. Effect of linseed feeding on blood metabolites, incidence of cystic follicles, and productive and reproductive performance in fresh Holstein dairy cows. *J. Dairy Sci.* 98:1828–1835. doi:10.3168/jds.2014-8789.
- Jenkins, T.C. 1997. Success of fat in dairy rations depends on the amount. *Feedstuffs.* 69:11–12.
- Kalantari, A.S., and V.E. Cabrera. 2012. The effect of reproductive performance on the dairy cattle herd value assessed by integrating a daily dynamic programming model with a daily Markov chain model. *J. Dairy Sci.* 95:6160–6170. doi:10.3168/jds.2012-5587.
- Kiyama, R. 2016. Biological effects induced by estrogenic activity of lignans. *Trends Food Sci. Technol.* 54:186–196. doi:10.1016/j.tifs.2016.06.007.
- Kliem, K.E., D.J. Humphries, C.K. Reynolds, R. Morgan, and D.I. Givens. 2017. Effect of oilseed type on milk fatty acid composition of individual cows, and also bulk tank milk fatty acid composition from commercial farms. *animal.* 11:354–364. doi:10.1017/S1751731116001403.

- Kliem, K.E., and K.J. Shingfield. 2016. Manipulation of milk fatty acid composition in lactating cows: Opportunities and challenges. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 118:1661–1683. doi:10.1002/ejlt.201400543.
- Landete, J.M. 2012. Plant and mammalian lignans: A review of source, intake, metabolism, intestinal bacteria and health. *Food Res. Int.* 46:410–424. doi:10.1016/j.foodres.2011.12.023.
- Lanier, J.S., and B.A. Corl. 2015. Challenges in enriching milk fat with polyunsaturated fatty acids. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 6:26. doi:10.1186/s40104-015-0025-0.
- LeBlanc, S. 2010. Monitoring metabolic health of dairy cattle in the transition period. *J. Reprod. Dev.* 56 Suppl:S29-35. doi:10.1262/jrd.1056S29.
- Leiber, F., R. Hochstrasser, H.-R. Wettstein, and M. Kreuzer. 2011. Feeding transition cows with oilseeds: Effects on fatty acid composition of adipose tissue, colostrum and milk. *Livest. Sci.* 138:1–12. doi:10.1016/j.livsci.2010.11.016.
- Lerch, S., A. Ferlay, D. Pomiès, B. Martin, J.A.A. Pires, and Y. Chilliard. 2012. Rapeseed or linseed supplements in grass-based diets: Effects on dairy performance of Holstein cows over 2 consecutive lactations. *J. Dairy Sci.* 95:1956–1970. doi:10.3168/jds.2011-4575.
- Lerch, S., J.A.A. Pires, C. Delavaud, K.J. Shingfield, D. Pomiès, B. Martin, Y. Chilliard, and A. Ferlay. 2015. Rapeseed or linseed in dairy cow diets over 2 consecutive lactations: Effects on adipose fatty acid profile and carry-over effects on milk fat composition in subsequent early lactation. *J. Dairy Sci.* 98:1005–1018. doi:10.3168/jds.2014-8578.
- Leroy, J., G. Opsomer, A. Van Soom, I. Goovaerts, and P. Bols. 2008a. Reduced Fertility in High-yielding Dairy Cows: Are the Oocyte and Embryo in Danger? Part I: The Importance of Negative Energy Balance and Altered Corpus Luteum Function to the Reduction of Oocyte and Embryo Quality in High-yielding Dairy Cows. *Reprod. Domest. Anim.* 43:612–622. doi:10.1111/j.1439-0531.2007.00960.x.
- Leroy, J., A. Van Soom, G. Opsomer, I. Goovaerts, and P. Bols. 2008b. Reduced Fertility in High-yielding Dairy Cows: Are the Oocyte and Embryo in Danger? Part II Mechanisms Linking Nutrition and Reduced Oocyte and Embryo Quality in High-yielding Dairy Cows. *Reprod. Domest. Anim.* 43:623–632. doi:10.1111/j.1439-0531.2007.00961.x.
- Leroy, J., R. Sturmeijer, V. Van Hoeck, J. De Bie, P. McKeegan, and P. Bols. 2014. Dietary Fat Supplementation and the Consequences for Oocyte and Embryo Quality: Hype or Significant Benefit for Dairy Cow Reproduction? *Reprod. Domest. Anim.* 49:353–361. doi:10.1111/rda.12308.
- Livingstone, K.M., D.J. Humphries, P. Kirton, K.E. Kliem, D.I. Givens, and C.K. Reynolds.

2015. Effects of forage type and extruded linseed supplementation on methane production and milk fatty acid composition of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 98:4000–4011. doi:10.3168/jds.2014-8987.
- Lopez, H., L. Satter, and M. Wiltbank. 2004. Relationship between level of milk production and estrous behavior of lactating dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.* 81:209–223. doi:10.1016/j.anireprosci.2003.10.009.
- Magrini, M.-B., F. Charrier, and M. Duru. 2014. Transition agroécologique et synergies entre filières du végétal et de l'animal. Une analyse de la niche d'innovation Bleu-Blanc-Coeur. *Innov. Agron.* 39:139–161.
- Magrini, M., and M. Duru. 2014. Dynamiques d'innovation dans l'alimentation des bovins - lait : une analyse du processus de diffusion de la démarche « Bleu-Blanc-Cœur » et de ses répercussions. *Fourrages.* 217:79–90.
- Maia, M.R., L.C. Chaudhary, C.S. Bestwick, A.J. Richardson, N. McKain, T.R. Larson, I.A. Graham, and R.J. Wallace. 2010. Toxicity of unsaturated fatty acids to the biohydrogenating ruminal bacterium, *Butyrivibrio fibrisolvens*. *BMC Microbiol.* 10:52. doi:10.1186/1471-2180-10-52.
- Malher, X., F. Beaudeau, and J.M. Philipot. 2006. Effects of sire and dam genotype for complex vertebral malformation (CVM) on risk of return-to-service in Holstein dairy cows and heifers. *Theriogenology.* 65:1215–1225. doi:10.1016/j.theriogenology.2005.08.003.
- Marcé, C., F. Beaudeau, N. Bareille, H. Seegers, and C. Fourichon. 2009. Higher non-return rate associated with *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis infection at early stage in Holstein dairy cows. *Theriogenology.* 71:807–816. doi:10.1016/j.theriogenology.2008.10.017.
- Marceau, A., A. Madouasse, A. Lehébel, G. van Schaik, A. Veldhuis, Y. Van der Stede, and C. Fourichon. 2014. Can routinely recorded reproductive events be used as indicators of disease emergence in dairy cattle? An evaluation of 5 indicators during the emergence of bluetongue virus in France in 2007 and 2008. *J. Dairy Sci.* 97:6135–6150. doi:10.3168/jds.2013-7346.
- Martin, C., A. Ferlay, P. Mosoni, Y. Rochette, Y. Chilliard, and M. Doreau. 2016. Increasing linseed supply in dairy cow diets based on hay or corn silage: Effect on enteric methane emission, rumen microbial fermentation, and digestion. *J. Dairy Sci.* 99:3445–3456. doi:10.3168/jds.2015-10110.
- Martin, C., J. Rouel, J.P. Jouany, M. Doreau, and Y. Chilliard. 2008. Methane output and diet

- digestibility in response to feeding dairy cows crude linseed, extruded linseed, or linseed oil. *J. Anim. Sci.* 86:2642–2650. doi:10.2527/jas.2007-0774.
- Mathieu, Y., M. Fougere, Y. Bergot, P. Dermerle, P. Brunschwig, and V. Chatellier. 2008. Effect of extruded linseed concentrate on the milk content and production of dairy cows. *In Proc. 15th Rencontres autour des Recherches sur les Ruminants* rr. Institut de l'élevage, editor. Paris, France. 117.
- Mavangira, V., J.C. Gandy, C. Zhang, V.E. Ryman, A. Daniel Jones, and L.M. Sordillo. 2015. Polyunsaturated fatty acids influence differential biosynthesis of oxylipids and other lipid mediators during bovine coliform mastitis. *J. Dairy Sci.* 98:6202–6215. doi:10.3168/jds.2015-9570.
- Mavangira, V., and L.M. Sordillo. 2017. Role of lipid mediators in the regulation of oxidative stress and inflammatory responses in dairy cattle. *Res. Vet. Sci.* 0–1. doi:10.1016/j.rvsc.2017.08.002.
- Meignan, T., C. Lechartier, G. Chesneau, and N. Bareille. 2017. Effects of feeding extruded linseed on production performance and milk fatty acid profile in dairy cows: A meta-analysis. *J. Dairy Sci.* 100:4394–4408. doi:10.3168/jds.2016-11850.
- Miller, R.H., M.J. Paape, and J.C. Acton. 1986. Comparison of Milk Somatic Cell Counts by Coulter and Fossomatic Counters. *J. Dairy Sci.* 69:1942–1946. doi:10.3168/jds.S0022-0302(86)80621-X.
- Moallem, U., A. Shafran, M. Zachut, I. Dekel, Y. Portnick, and A. Arieli. 2013. Dietary -linolenic acid from flaxseed oil improved folliculogenesis and IVF performance in dairy cows, similar to eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids from fish oil. *Reproduction.* 146:603–614. doi:10.1530/REP-13-0244.
- Moallem, U., and M. Zachut. 2012. Short communication: The effects of supplementation of various n-3 fatty acids to late-pregnant dairy cows on plasma fatty acid composition of the newborn calves. *J. Dairy Sci.* 95:4055–4058. doi:10.3168/jds.2012-5457.
- Mozaffarian, D., E.J. Benjamin, A.S. Go, D.K. Arnett, M.J. Blaha, M. Cushman, S.R. Das, S. De Ferranti, J.P. Després, H.J. Fullerton, V.J. Howard, M.D. Huffman, C.R. Isasi, M.C. Jiménez, S.E. Judd, B.M. Kissela, J.H. Lichtman, L.D. Lisabeth, S. Liu, R.H. MacKey, D.J. Magid, D.K. McGuire, E.R. Mohler, C.S. Moy, P. Muntner, M.E. Mussolino, K. Nasir, R.W. Neumar, G. Nichol, L. Palaniappan, D.K. Pandey, M.J. Reeves, C.J. Rodriguez, W. Rosamond, P.D. Sorlie, J. Stein, A. Towfighi, T.N. Turan, S.S. Virani, D. Woo, R.W. Yeh, and M.B. Turner. 2016. Heart disease and stroke statistics-2016 update a report from the American Heart Association. 133. 38-48 pp.

- Naska, A., A. Lagiou, and P. Lagiou. 2017. Dietary assessment methods in epidemiological research: current state of the art and future prospects. *F1000Research*. 6:926. doi:10.12688/f1000research.10703.1.
- Neveu, C., B. Baurhoo, and A. Mustafa. 2013. Effect of feeding extruded flaxseed with different forage:concentrate ratios on the performance of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 96:3886–3894. doi:10.3168/jds.2012-6189.
- Neveu, C., B. Baurhoo, and A. Mustafa. 2014. Effect of feeding extruded flaxseed with different grains on the performance of dairy cows and milk fatty acid profile. *J. Dairy Sci.* 97:1543–1551. doi:10.3168/jds.2013-6728.
- Nusinovici, S., H. Seegers, A. Joly, F. Beaudeau, and C. Fourichon. 2012. Quantification and at-risk period of decreased fertility associated with exposure to bluetongue virus serotype 8 in naïve dairy herds. *J. Dairy Sci.* 95:3008–3020. doi:10.3168/jds.2011-4799.
- Nusinovici, S., C. Souty, H. Seegers, F. Beaudeau, and C. Fourichon. 2013. Decrease in milk yield associated with exposure to bluetongue virus serotype 8 in cattle herds. *J. Dairy Sci.* 96:877–888. doi:10.3168/jds.2012-5800.
- Oeffner, S.P., Y. Qu, J. Just, N. Quezada, E. Ramsing, M. Keller, G. Cherian, L. Goddick, and G. Bobe. 2013. Effect of flaxseed supplementation rate and processing on the production, fatty acid profile, and texture of milk, butter, and cheese. *J. Dairy Sci.* 96:1177–1188. doi:10.3168/jds.2012-5941.
- Onetti, S.G., and R.R. Grummer. 2004. Response of lactating cows to three supplemental fat sources as affected by forage in the diet and stage of lactation: A meta-analysis of literature. *Anim. Feed Sci. Technol.* 115:65–82. doi:10.1016/j.anifeedsci.2004.02.009.
- Or-Rashid, M.M., R. Fisher, N. Karrow, O. AlZahal, and B.W. McBride. 2010. Fatty acid profile of colostrum and milk of ewes supplemented with fish meal and the subsequent plasma fatty acid status of their lambs. *J. Anim. Sci.* 88:2092–2102. doi:10.2527/jas.2009-1895.
- Palmquist, D.L., and T.C. Jenkins. 1980. Fat in Lactation Rations: Review. *J. Dairy Sci.* 63:1–14. doi:10.3168/jds.S0022-0302(80)82881-5.
- Perry, G.A., O.L. Swanson, E.L. Larimore, B.L. Perry, G.D. Djira, and R.A. Cushman. 2014. Relationship of follicle size and concentrations of estradiol among cows exhibiting or not exhibiting estrus during a fixed-time AI protocol. *Domest. Anim. Endocrinol.* 48:15–20. doi:10.1016/j.domaniend.2014.02.001.
- Petit, H. V. 2009. Antioxidants and dairy production: the example of flax. *Rev. Bras. Zootec.* 38:352–361. doi:10.1590/S1516-35982009001300035.

- Petit, H. V. 2010. Review: Feed intake, milk production and milk composition of dairy cows fed flaxseed. *Can. J. Anim. Sci.* 90:115–127. doi:10.4141/CJAS09040.
- Petit, H. V., and N. Gagnon. 2009. Concentration of the mammalian lignans enterolactone and enterodiol in milk of cows fed diets containing different concentrations of whole flaxseed. *Animal*. 3. doi:10.1017/S1751731109990346.
- Petit, H.V., F.B. Cavalieri, G.T.D. Santos, J. Morgan, and P. Sharpe. 2008. Quality of Embryos Produced From Dairy Cows Fed Whole Flaxseed and the Success of Embryo Transfer. *J. Dairy Sci.* 91:1786–1790. doi:10.3168/jds.2007-0782.
- Petit, H.V., and H. Twagiramungu. 2006. Conception rate and reproductive function of dairy cows fed different fat sources. *Theriogenology*. 66:1316–1324. doi:10.1016/j.theriogenology.2006.04.029.
- Pierson, L.M., and M.H. Ferkin. 2015. The impact of phytoestrogens on sexual behavior and cognition in rodents. *Mamm. Biol.* 80:148–154. doi:10.1016/j.mambio.2014.11.006.
- Poncet, C., D. Rémond, E. Lepage, and M. Doreau. 2003. Comment mieux valoriser les protéagineux et oléagineux en alimentation des ruminants. *Fourrages*. 174:205–229.
- Rabiee, A.R., K. Breinhild, W. Scott, H.M. Golder, E. Block, and I.J. Lean. 2012. Effect of fat additions to diets of dairy cattle on milk production and components: A meta-analysis and meta-regression. *J. Dairy Sci.* 95:3225–3247. doi:10.3168/jds.2011-4895.
- R Core Team. 2016. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Rajaram, S. 2014. Health benefits of plant-derived  $\alpha$ -linolenic acid. *Am. J. Clin. Nutr.* 100:443S–448S. doi:10.3945/ajcn.113.071514.
- Ramírez, N.F., G. Keefe, I. Dohoo, J. Sánchez, O. Arroyave, J. Cerón, M. Jaramillo, and L.G. Palacio. 2014. Herd- and cow-level risk factors associated with subclinical mastitis in dairy farms from the High Plains of the northern Antioquia, Colombia. *J. Dairy Sci.* 97:4141–4150. doi:10.3168/jds.2013-6815.
- Raphael, W., L. Halbert, G.A. Contreras, and L.M. Sordillo. 2014. Association between polyunsaturated fatty acid-derived oxylipid biosynthesis and leukocyte inflammatory marker expression in periparturient dairy cows. *J. Dairy Sci.* 97:3615–3625. doi:10.3168/jds.2013-7656.
- Raphael, W., and L. Sordillo. 2013. Dietary Polyunsaturated Fatty Acids and Inflammation: The Role of Phospholipid Biosynthesis. *Int. J. Mol. Sci.* 14:21167–21188. doi:10.3390/ijms141021167.
- Robert, A., F. Beaudreau, H. Seegers, A. Joly, and J. Philipot. 2004. Large scale assessment of

- the effect associated with bovine viral diarrhoea virus infection on fertility of dairy cows in 6149 dairy herds in Brittany (Western France). *Theriogenology*. 61:117–127. doi:10.1016/S0093-691X(03)00182-1.
- Rodney, R.M., P. Celi, W. Scott, K. Breinhild, and I.J. Lean. 2015. Effects of dietary fat on fertility of dairy cattle: A meta-analysis and meta-regression. *J. Dairy Sci.* 98:5601–5620. doi:10.3168/jds.2015-9528.
- Rupp, R., D. Boichard, C. Bertrand, and S. Bazin. 2000. Bilan national des numérations cellulaires dans le lait des différentes races bovines laitières Françaises. *INRA Prod. Anim.* 13:257–267.
- Ryman, V.E., N. Packiriswamy, B. Norby, S.E. Schmidt, A.L. Lock, and L.M. Sordillo. 2017. Supplementation of linoleic acid (C18:2n-6) or  $\alpha$ -linolenic acid (C18:3n-3) changes microbial agonist-induced oxylipid biosynthesis. *J. Dairy Sci.* 100:1870–1887. doi:10.3168/jds.2016-11599.
- Santos, J., T. Bilby, W. Thatcher, C. Staples, and F. Silvestre. 2008. Long Chain Fatty Acids of Diet as Factors Influencing Reproduction in Cattle. *Reprod. Domest. Anim.* 43:23–30. doi:10.1111/j.1439-0531.2008.01139.x.
- Santos, J., R. Bisinotto, E. Ribeiro, F. Lima, L. Greco, C. Staples, and W. Thatcher. 2010. Applying nutrition and physiology to improve reproduction in dairy cattle. *Reprod. Domest. Ruminants*. 7:385–401. doi:10.5661/RDR-VII-387.
- Santschi, D.E., H.-R. Wettstein, F. Leiber, a.-K.M. Witschi, and M. Kreuzer. 2009. Colostrum and milk fatty acids of dairy cows as influenced by extruded linseed supplementation during the transition period. *Can. J. Anim. Sci.* 89:383–392. doi:10.4141/CJAS08115.
- Sauvant, D., and P. Bas. 2001. La digestion des lipides chez le ruminant. *INRA Prod. Anim.* 14:303–310.
- Schalm, O.W., and J. Lasmanis. 1968. The leukocytes: origin and function in mastitis. *J Am Vet Med Assoc.* 153:1688–1694.
- Seegers, H., R. Coulon, F. Beaudeau, M. Fouchet, and J.M. Quillet. 2001. Factors associated with variation in occurrence of different types of return-inseminations in dairy herds. *In Rencontres autour des recherches sur les ruminants*. Paris. 357–360.
- Seegers, H., C. Fourichon, and F. Beaudeau. 2003. Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds. *Vet. Res.* 34:475–491. doi:10.1051/vetres:2003027.
- Seegers, H., C. Fourichon, P. Hottet, J. Sørensen, D. Billon, N. Bareille, and F. Beaudeau.



1999. Evaluation des conséquences économiques des stratégies de maîtrise de la concentration en cellules somatiques du lait produit par un troupeau de vaches laitières. *In J Natl GTV*. 26–28.
- Shim, J.-S., K. Oh, and H.C. Kim. 2014. Dietary assessment methods in epidemiologic studies. *Epidemiol. Health*. 36:e2014009. doi:10.4178/epih/e2014009.
- Shingfield, K.J., L. Bernard, C. Leroux, and Y. Chilliard. 2010. Role of trans fatty acids in the nutritional regulation of mammary lipogenesis in ruminants. *Animal*. 4:1140–1166. doi:10.1017/S1751731110000510.
- Shingfield, K.J., and J.M. Griinari. 2007. Role of biohydrogenation intermediates in milk fat depression. *Eur. J. Lipid Sci. Technol*. 109:799–816. doi:10.1002/ejlt.200700026.
- Silvestre, F.T., T.S.M. Carvalho, N. Francisco, J.E.P. Santos, C.R. Staples, T.C. Jenkins, and W.W. Thatcher. 2011. Effects of differential supplementation of fatty acids during the peripartum and breeding periods of Holstein cows: I. Uterine and metabolic responses, reproduction, and lactation. *J. Dairy Sci*. 94:189–204. doi:10.3168/jds.2010-3370.
- Simopoulos, A.P. 2002a. Omega-3 fatty acids in inflammation and autoimmune diseases. *J. Am. Coll. Nutr*. 21:495–505. doi:10.1080/07315724.2002.10719248.
- Simopoulos, A.P. 2008. The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. *Exp. Biol. Med*. 233:674–688. doi:10.3181/0711-MR-311.
- Simopoulos, a. P. 2002b. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomed. Pharmacother*. 56:365–379. doi:10.1016/S0753-3322(02)00253-6.
- Simopoulos, a P. 1991. Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development. *Am. J. Clin. Nutr*. 54:438–463.
- Sinedino, L.D.P., P.M. Honda, L.R.L. Souza, A.L. Lock, M.P. Boland, C.R. Staples, W.W. Thatcher, and J.E.P. Santos. 2017. Effects of supplementation with docosahexaenoic acid on reproduction of dairy cows. *Reproduction*. 153:707–723. doi:10.1530/REP-16-0642.
- Sordillo, L.M. 2016. Nutritional strategies to optimize dairy cattle immunity. *J. Dairy Sci*. 99:4967–4982. doi:10.3168/jds.2015-10354.
- Soyeurt, H., F. Dehareng, N. Gengler, S. McParland, E. Wall, D.P. Berry, M. Coffey, and P. Dardenne. 2011. Mid-infrared prediction of bovine milk fatty acids across multiple breeds, production systems, and countries. *J. Dairy Sci*. 94:1657–1667. doi:10.3168/jds.2010-3408.
- Staples, C.R., J.M. Burke, and W.W. Thatcher. 1998. Influence of Supplemental Fats on Reproductive Tissues and Performance of Lactating Cows. *J. Dairy Sci*. 81:856–871.

doi:10.3168/jds.S0022-0302(98)75644-9.

- Stark, A.H., M.A. Crawford, and R. Reifen. 2008. Update on alpha-linolenic acid. *Nutr. Rev.* 66:326–332. doi:10.1111/j.1753-4887.2008.00040.x.
- Sterk, A., R. Hovenier, B. Vlaeminck, A.M. van Vuuren, W.H. Hendriks, and J. Dijkstra. 2010. Effects of chemically or technologically treated linseed products and docosahexaenoic acid addition to linseed oil on biohydrogenation of C18:3n-3 in vitro. *J. Dairy Sci.* 93:5286–5299. doi:10.3168/jds.2010-3144.
- Sterk, A., B. Vlaeminck, A.M. van Vuuren, W.H. Hendriks, and J. Dijkstra. 2012. Effects of feeding different linseed sources on omasal fatty acid flows and fatty acid profiles of plasma and milk fat in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 95:3149–3165. doi:10.3168/jds.2011-4474.
- Sunnåker, M., A.G. Busetto, E. Numminen, J. Corander, M. Foll, and C. Dessimoz. 2013. Approximate Bayesian Computation. *PLoS Comput. Biol.* 9:e1002803. doi:10.1371/journal.pcbi.1002803.
- Tam, V.C. 2013. Lipidomic profiling of bioactive lipids by mass spectrometry during microbial infections. *Semin. Immunol.* 25:240–248. doi:10.1016/j.smim.2013.08.006.
- Thangavelu, G., M.G. Colazo, D.J. Ambrose, M. Oba, E.K. Okine, and M.K. Dyck. 2007. Diets enriched in unsaturated fatty acids enhance early embryonic development in lactating Holstein cows. *Theriogenology.* 68:949–957. doi:10.1016/j.theriogenology.2007.07.002.
- Thatcher, W., J.E.P. Santos, and C.R. Staples. 2011. Dietary manipulations to improve embryonic survival in cattle. *Theriogenology.* 76:1619–1631. doi:10.1016/j.theriogenology.2011.06.005.
- Toni, T., D. Welch, N. Strelkowa, A. Ipsen, and M.P. Stumpf. 2009. Approximate Bayesian computation scheme for parameter inference and model selection in dynamical systems. *J. R. Soc. Interface.* 6:187–202. doi:10.1098/rsif.2008.0172.
- Townsend, N., L. Wilson, P. Bhatnagar, K. Wickramasinghe, M. Rayner, and M. Nichols. 2016. Cardiovascular disease in Europe: epidemiological update 2016. *Eur. Heart J.* 37:3232–3245. doi:10.1093/eurheartj/ehw334.
- Tressou, J., P. Moulin, B. Vergès, C. Le Guillou, N. Simon, and S. Pasteau. 2016. Fatty acid dietary intake in the general French population: are the French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety (ANSES) national recommendations met? *Br. J. Nutr.* 116:1966–1973. doi:10.1017/S000711451600413X.
- de Veth, M.J., D.E. Bauman, W. Koch, G.E. Mann, A.M. Pfeiffer, and W.R. Butler. 2009.

- Efficacy of conjugated linoleic acid for improving reproduction: A multi-study analysis in early-lactation dairy cows. *J. Dairy Sci.* 92:2662–2669. doi:10.3168/jds.2008-1845.
- De Vries, A. 2006. Economic Value of Pregnancy in Dairy Cattle. *J. Dairy Sci.* 89:3876–3885. doi:10.3168/jds.S0022-0302(06)72430-4.
- Walsh, S.W., E.J. Williams, and A.C.O. Evans. 2011. A review of the causes of poor fertility in high milk producing dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.* 123:127–138. doi:10.1016/j.anireprosci.2010.12.001.
- Wathes, D., Z. Cheng, W. Marei, and A. Fouladi-Nashta. 2013. Polyunsaturated fatty acids and fertility in female mammals: an update. *CAB Rev. Perspect. Agric. Vet. Sci. Nutr. Nat. Resour.* 8:1–14. doi:10.1079/PAVSNNR20138041.
- Wathes, D.C., D.R.E. Abayasekara, and R.J. Aitken. 2007. Polyunsaturated fatty acids in male and female reproduction. *Biol. Reprod.* 77:190–201. doi:10.1095/biolreprod.107.060558.
- Weill, P., B. Schmitt, G. Chesneau, N. Daniel, F. Safraou, and P. Legrand. 2002. Effects of Introducing Linseed in Livestock Diet on Blood Fatty Acid Composition of Consumers of Animal Products. *Ann. Nutr. Metab.* 46:182–191. doi:10.1159/000065405.
- Wijendran, V., and K.C. Hayes. 2004. Dietary n-6 and n-3 fatty acid balance and cardiovascular health. *Annu. Rev. Nutr.* 24:597–615. doi:10.1146/annurev.nutr.24.012003.132106.
- Zachut, M. 2015. Short communication: Concentrations of the mammalian lignan enterolactone in preovulatory follicles and the correlation with intrafollicular estradiol in dairy cows fed extruded flaxseed. *J. Dairy Sci.* 98:8814–8817. doi:10.3168/jds.2015-9699.
- Zachut, M., A. Arieli, and U. Moallem. 2011. Incorporation of dietary n-3 fatty acids into ovarian compartments in dairy cows and the effects on hormonal and behavioral patterns around estrus. *Reproduction.* 141:833–840. doi:10.1530/REP-10-0518.
- Zachut, M., I. Dekel, H. Lehrer, A. Arieli, A. Arav, L. Livshitz, S. Yakoby, and U. Moallem. 2010. Effects of dietary fats differing in n-6:n-3 ratio fed to high-yielding dairy cows on fatty acid composition of ovarian compartments, follicular status, and oocyte quality. *J. Dairy Sci.* 93:529–545. doi:10.3168/jds.2009-2167.
- Zened, A., F. Enjalbert, M.C. Nicot, and A. Troegeler-Meynadier. 2013. Starch plus sunflower oil addition to the diet of dry dairy cows results in a trans-11 to trans-10 shift of biohydrogenation. *J. Dairy Sci.* 96:451–459. doi:10.3168/jds.2012-5690.
- Zened, A., A. Troegeler-Meynadier, M.C. Nicot, S. Combes, L. Cauquil, Y. Farizon, and F.

Enjalbert. 2011. Starch and oil in the donor cow diet and starch in substrate differently affect the in vitro ruminal biohydrogenation of linoleic and linolenic acids. *J. Dairy Sci.* 94:5634–5645. doi:10.3168/jds.2011-4491.

Zeron, Y. 2001. Seasonal changes in bovine fertility: relation to developmental competence of oocytes, membrane properties and fatty acid composition of follicles. *Reproduction.* 121:447–454. doi:10.1530/reprod/121.3.447.

## Thèse de Doctorat

Thomas MEIGNAN

### Evaluation des effets de l'utilisation de la graine de lin extrudée en élevages bovins laitiers

Assessment of the effects of extruded linseed supplementation in dairy cattle herds

#### Résumé

La graine de lin extrudée (GLE), riche en acide  $\alpha$ -linoléique, est un aliment utilisé en élevage bovin laitier pour modifier la composition en acides gras du lait vers un profil nutritionnel favorable à la santé humaine. Cependant, l'effet de la graine de lin sur les animaux est peu documenté. L'objectif était d'évaluer les effets de l'utilisation de la GLE sur les performances animales en élevage bovin laitier, puis d'en estimer les conséquences économiques au niveau de l'exploitation bovine laitière. Une méta-analyse (21 essais expérimentaux) a permis de caractériser la variabilité des performances laitières en conditions expérimentales selon la quantité de GLE et la ration associée. Une étude épidémiologique exposé/non exposé menée dans 1204 élevages sur 194056 vaches a montré une association entre la quantité de GLE et la production laitière (+ 0,4 à +1,3 kg/j) et les taux de matières utiles (-0,03 à -0,20 g/kg de TP et -0,1 à -0,9 g/kg de TB). D'autres associations ont été mises en évidence : amélioration de la fécondité et de la guérison des infections intra-mammaires. Enfin, par simulation, nous avons montré qu'un éleveur produisant un lait de meilleure qualité nutritionnelle via l'utilisation de la GLE dans les conditions d'utilisation de terrain était récompensé par un gain de marge de son atelier laitier via des effets zootechniques positifs malgré le surcoût alimentaire engendré.

**Mots clés :** vache laitière, graine de lin extrudée, performances animales, épidémiologie, méta-analyse.

#### Abstract

Extruded linseed (EL), rich in  $\alpha$ -linolenic acid, is a feed used in dairy cattle nutrition in order to modify milk fatty acid profile in a way to potentially improve human health. However, effects of EL on dairy cow performance are little documented. The objective was to assess the effects of EL supplementation on animal performance, then to estimate the economic consequences at a farm level. A meta-analysis (21 experimental trials) allowed us to characterize the variability of animal responses related to the quantity of EL and the basal diet composition. A cohort study performed on 1204 herds and 194056 cows displayed an association between quantity of EL and milk yield (+ 0.4 to +1.3 kg/d), and milk contents (-0.03 to -0.20 g/kg MPC and -0.1 to -0.9 g/kg MFC). Other beneficial associations were highlighted: a decrease in number of days open and a better probability to cure of intra-mammary infections. Finally, we demonstrated that a farmer willing to modify the fatty acid composition of the milk to improve human health face higher feed costs but can be rewarded by better animal performance that increase profitability of the farm.

**Key Words:** dairy cow, extruded linseed, animal performance, epidemiology, meta-analysis.