

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*

Soutenu 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

Remerciements

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
D. Références	32
Chapitre II. Les effets de l'utilisation de la graine de lin extrudée sur les performances de production	42
A. Caractérisation de la variabilité des effets de l'utilisation de la graine de lin extrudée en conditions expérimentales par méta-analyse	42
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.	58
1. Abstract.....	59
2. Implications.....	60

3.	Introduction.....	60
4.	Material and methods.....	61
5.	Results.....	64
6.	Discussion.....	73
7.	Acknowledgments.....	76
8.	References.....	76

Chapitre III. Les effets de l'utilisation de la graine de lin extrudée sur les performances de reproduction et les mammites subcliniques 79

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
79

1.	Abstract.....	80
2.	Introduction.....	81
3.	Material and Methods	83
4.	Results.....	87
5.	Discussion.....	98
6.	Conclusions.....	101
7.	Acknowledgments.....	101
8.	References.....	101

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..... 108

1.	Introduction.....	108
2.	Matériel et méthodes.....	109
3.	Résultats.....	110
4.	Discussion.....	119
5.	Références.....	121

Chapitre IV. Evaluation de l'intérêt économique de l'utilisation de la graine de lin extrudée par simulations	124
A. Introduction	124
B. Matériel et méthodes	125
1. Schéma d'étude et scénarios de simulations	125
2. Description du modèle de simulation et paramétrages	127
3. Analyse des résultats	131
C. Résultats et discussion	133
1. Effets sur les performances zootechniques du troupeau	133
2. Effets sur les performances économiques de l'atelier.....	136
D. Conclusion	138
E. Références	138
Chapitre V. Discussion générale	140
A. Réponses aux besoins de recherche	140
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	145
C. Des nouvelles voies scientifiques à explorer par l'épidémiologie mais aussi par l'essai expérimental.....	146
D. Références	148
Chapitre VI. Conclusion générale	151

Liste des tableaux

Tableau 1.1 Dispositifs expérimentaux et performances dans les essais étudiant le lien entre graines de lin et reproduction.	25
Tableau 1.2 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
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).....	28
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).....	28
Table 2.1 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
Table 2.2 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
Table 2.3 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
Table 2.4 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
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).....	67
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).....	68

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)	69
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).....	70
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	71
Table 3.1 Return-to-service (RTS) rates, time from calving to first AI (DAI1) 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).	89
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).....	90
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).	91
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).....	92
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).	95
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).	113

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).	114
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).	115
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).	116
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).	117
Tableau 4.1 Statistiques résumées utilisées pour l'estimation des paramètres d'entrée du modèle (Se et CR ₂₁).....	129
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.	131

Liste des figures

Figure 1.1 Places respectives des processus de modélisation et de simulation scientifique mobilisées (Seegers et al., 1999; Dezetter, 2015).	30
Figure 1.2 Approches scientifique mobilisées durant le travail de thèse	31
Figure 2.1 Within study differences (Δ) 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 (Δ) of average proportions in milk of palmitic acid (16:0), sum of pairs 4:0 to 14:0, α -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).....	52
Figure 4.1 Schéma de l'organisation générale du simulateur ECOMAST (Dezetter, 2015). 127	
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.	133
Figure 4.3 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.	134
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.	134
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)...	135
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)...	135

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..... 136

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..... 137

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-insémination première

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

1 **Chapitre I. Introduction générale**

2 **A. Contexte et enjeux**

3 **1. Création d'une filière nutrition-santé afin d'améliorer le profil en** 4 **acides gras du lait via l'alimentation des animaux**

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

6 Les maladies cardiovasculaires représentent actuellement la première cause de
7 mortalité humaine en Europe comme aux Etats-Unis (Mozaffarian et al., 2016; Townsend et
8 al., 2016). Au cours des dernières décennies, le lien entre nutrition humaine et maladies
9 cardiovasculaires a été démontré. Ainsi, les acides gras polyinsaturés (AGPI) n-3 à longue
10 chaîne, l'acide eicosapentaénoïque (EPA ; cis5,cis8,cis11,cis14,cis17-20:5) et l'acide
11 docosahéxaénoïque (DHA ; cis4,cis7,cis10,cis13,cis16,cis19-22:6), ont été associés avec une
12 réduction du risque d'apparition des maladies cardiovasculaires (Albert, 1998, 2002;
13 Simopoulos, 2002). Ce sont des constituants essentiels de la rétine et du cerveau impliqués
14 notamment dans les fonctions de vision, de mémorisation, et d'apprentissage (Simopoulos,
15 1991; Connor, 2000). L'importance du ratio entre les deux familles d'AGPI, les AG n-6 et les
16 AG n-3, a été aussi démontrée dans l'apparition des maladies cardiovasculaires (Wijendran et
17 Hayes, 2004; Simopoulos, 2008). L'EPA et le DHA sont issus d'un précurseur que l'Homme
18 ne peut pas synthétiser, l'acide alpha-linolénique (ALA ; cis9,cis12,cis15-18:3), et qu'il doit
19 donc trouver dans son alimentation. Les recommandations faites dans les rapports de
20 l'expertise collective de l'agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de
21 l'environnement et du travail (ANSES) sur les apports en ALA (1% de l'apport énergétique
22 totale sans alcool) et le rapport n-6/n-3 (< 5), afin de limiter les risques sur la santé de
23 l'Homme, ne sont pas satisfaites aujourd'hui dans les pays développés chez les enfants
24 comme chez les adultes (ANSES, 2011, 2015). Par exemple, en France moins de 1% des
25 enfants comme des adultes satisfont la recommandation sur l'apport d'ALA (ANSES, 2015).
26 Ces recommandations pourraient encore évoluer étant donné le nombre croissant d'études
27 démontrant un effet propre de l'ALA (i.e., indépendamment de son rôle de précurseur de
28 l'EPA et du DHA) sur la prévention sanitaire (Stark et al., 2008; Barceló-Coblijn and
29 Murphy, 2009; Rajaram, 2014).

30 Le profil lipidique des produits animaux est important pour la santé humaine. En effet,
31 en France, les produits animaux représentent environ 60% des apports lipidiques totaux

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

47 *b) Amélioration du profil en acides gras du lait via l'alimentation* 48 *des vaches laitières*

49 Le profil en acides gras du lait des vaches laitières est facilement et rapidement
50 modulable par la voie alimentaire (Chilliard et al., 2007; Kliem and Shingfield, 2016)
51 contrairement à la voie génétique qui sur le long terme pourrait être plus intéressante (Lanier
52 and Corl, 2015). L'ensilage de maïs présente un profil en AG déséquilibré au niveau du
53 rapport n-6/n-3 avec en moyenne 5% d'ALA mais 45,8% de LA (% d'AG totaux). L'herbe est
54 le fourrage le plus intéressant par sa richesse en ALA (environ 50% des AG totaux) malgré
55 une teneur en lipides faible (entre 1 et 3%) (Doreau et al., 2012; Glasser et al., 2013).
56 Cependant, la disponibilité de l'herbe est variable dans le temps, et sa teneur en ALA est
57 dépendante du stade végétatif et du mode de récolte (Glasser et al., 2013). Afin de disposer
58 d'une ressource alimentaire riche en ALA toute l'année, l'apport de lipides sous forme de
59 graines oléagineuses, en particulier la graine de lin, est un levier intéressant. Elle est
60 constituée à 40% de lipides et l'ALA représente 54% des AG totaux (Brunschwig et al.,
61 2010).

62 L'amélioration du profil en AG du lait via l'apport de la graine de lin est complexifiée
63 par i) la présence de composés cyanogènes ii) la protection naturelle des AGPI par la coque
64 de la graine limitant la digestibilité des AG iii) le phénomène de BHR des AGPI si l'apport se

65 fait sous forme d'huile. En effet, Glasser et al. (2008) ont estimé dans leur méta-analyse que
66 86 (\pm 12) % de l'ALA ingéré issu de suppléments lipidiques était biohydrogéné dans le
67 rumen (n = 222). La protection de l'ALA vis-à-vis de la BHR apparaît donc nécessaire afin de
68 maximiser son passage du rumen vers le duodénum, mais cette protection doit rester limitée
69 afin de maintenir une bonne digestibilité (Sterk et al., 2012). Enfin, les AGPI sont toxiques
70 pour certaines bactéries fibrolytiques du rumen (Maia et al., 2010). Ainsi, minimiser le temps
71 de rétention dans le rumen des AGPI apparaît important afin de limiter la BHR mais aussi afin
72 de ne pas perturber l'écosystème microbien du rumen (Sterk et al., 2010).

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

84 *c) Valorisation de l'innovation technologique par une innovation* 85 *organisationnelle*

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

92 Parallèlement à Valorex, l'association Bleu-Blanc-Cœur (**BBC**) a été créée en 2000 et
93 réunit les acteurs de la filière alimentaire (producteur de lin, fabricant d'aliment, éleveur,
94 industriel laitier/industrie agro-alimentaire, consommateur). La filière BBC, dont la trajectoire
95 a été analysée en détail par Magrini et al. (2014) et Magrini et Duru (2014), vise à répondre
96 aux préoccupations sociétales en termes de nutrition-santé et de changement climatique. En
97 aval, le label privé BBC permet aux consommateurs d'identifier les produits BBC par rapport

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

117 **2. Création d'une filière nutrition-santé afin d'améliorer la** 118 **productivité des vaches laitières via l'alimentation animale**

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

127 Ainsi, ce développement commercial de la supplémentation en GLE s'est appuyé sur
128 un argumentaire marketing, non plus basé sur l'amélioration de la qualité nutritionnelle du
129 lait, mais basé sur une meilleure performance technico-économique de l'élevage via
130 notamment une amélioration de la reproduction et de la santé des vaches laitières (Magrini

131 and Duru, 2014). Ce développement commercial s'est donc appuyé sur des observations
132 empiriques, issues du terrain, à la différence de la filière BBC, qui s'est appuyée sur la
133 littérature scientifique.

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

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

142 **1. Des interactions entre la dose de graines de lin extrudées, les** 143 **caractéristiques de la ration et la digestion chez la vache laitière**

144 L'ajout de lipides dans la ration est une stratégie fréquemment utilisée en élevage
145 laitier nord-américain afin d'augmenter la densité énergétique de la ration, sans augmenter la
146 part d'amidon ni réduire la part de fibres dans la ration, ces stratégies étant responsables de
147 perturbations digestives. Cependant, l'ajout de lipides dans la ration des vaches laitières peut
148 aussi entraîner des perturbations dans les processus digestifs (Sauvant et Bas, 2001). Ainsi, il
149 est généralement recommandé de ne pas dépasser 5% de lipides dans la ration des vaches
150 laitières quelle que soit la nature des AG (Palmquist et Jenkins, 1980; Chilliard et al., 1993).
151 Jenkins (1997) titrait ainsi que le succès de la supplémentation en lipides pour augmenter la
152 production laitière dépendait de la quantité utilisée. Une baisse de la quantité de matière sèche
153 ingérée (**MSI**) a été observée avec des rations riches en lipides par une synthèse de la
154 littérature (Block et Evans, 2010), avec des rations supplémentées en graines oléagineuses (-
155 21 kg/j) par une méta-analyse (Rabiee et al., 2012), et aussi avec des rations supplémentées en
156 GLE (-0,66 kg/j, n = 13) par une synthèse de la littérature (Brunschwig et al., 2010).
157 Cependant dans ces trois études, la baisse de MSI présentait une très forte hétérogénéité non
158 explorée. De plus, une supplémentation importante en GLE (15% MSI) a diminué la
159 digestibilité des fibres de la ration (Martin et al., 2008). Cette réduction de la digestibilité des
160 fibres a été observée dans une relation dose-dépendante lorsque la GLE a été associée (de 5 à
161 15% MSI) à une ration à base d'ensilage de maïs (Martin et al., 2016), mais pas en étant
162 associée à une ration à base de foin, soulevant ainsi la question des interactions entre la GLE
163 et les autres composants de la ration.

164 En effet, les perturbations digestives seraient liées à des interactions complexes entre
165 les AG n-3 (et donc leur quantité et leur disponibilité), les caractéristiques physico-chimiques
166 de la ration et l'écosystème microbien ruminal (Doreau et al., 2012). Huws et al. (2015) ont
167 observé une modification dans la composition du microbiote ruminal après introduction
168 d'huile de lin dans la ration. Cependant, Martin et al. (2016) n'ont pas observé d'effets sur la
169 concentration en bactéries fibrolytiques mais font l'hypothèse d'une diminution de leur
170 activité. Modifier l'écosystème microbien ruminal entraîne une modification des voies de
171 BHR des AG (Doreau et al., 2012; Ferlay et al., 2017). Ainsi, l'ajout de GLE dans la ration
172 conduit à la formation d'intermédiaires de BHR issus de l'hydrogénation de LA et de l'ALA
173 (Shingfield et al., 2010; Ferlay et al., 2017), notamment le *trans*10-18:1 et le *trans*11-18:1.
174 Ces deux AG *trans* représentent deux grandes voies de BHR dépendantes de l'écosystème
175 ruminal. On considère que lorsque la voie du *trans*11-18:1 est privilégiée, l'environnement
176 ruminal se porte bien. Cependant, l'ajout de GLE, en interaction avec des caractéristiques
177 physico-chimiques de la ration comme le pourcentage de concentrés ou le pourcentage
178 d'amidon, pourrait favoriser la voie dite du *trans*10 (Bauman et Griinari, 2001, 2003; Doreau
179 et al., 2012; Ferlay et al., 2017). Or, le *trans*10-18:1 et le *trans*10,cis12-CLA sont des
180 inhibiteurs de la synthèse mammaire d'AG (Shingfield et Griinari, 2007; Shingfield et al.,
181 2010), dont l'effet est connu sous le nom de syndrome de dépression de la matière grasse.
182 Curieusement, le *trans*10,cis12-CLA semblerait issu seulement de la BHR de LA (Zened et
183 al., 2011, 2013). Ainsi, cela soulève la question de l'intérêt d'associer la GLE avec une ration
184 riche en ensilage de maïs (i.e., riche en LA) au risque d'observer des effets négatifs sur la
185 synthèse de matières grasses du lait et donc sur le taux butyreux (**TB**). De plus, les
186 interactions de la GLE avec les caractéristiques physico-chimiques de la ration associée sont à
187 élucider.

188 **2. Des effets d'une supplémentation en graines de lin extrudées sur les** 189 **performances de production variables et difficiles à extrapoler sur le** 190 **terrain**

191 Rabiee et al. (2012) ont montré une forte hétérogénéité des réponses de production
192 laitière, de TB et de taux protéique (**TP**) suite à une supplémentation en graines oléagineuses
193 par méta-analyse. Cependant, prendre en compte autant de sources végétales différentes et de
194 formes d'apport ne permet évidemment pas d'étudier finement les facteurs de la variabilité
195 des réponses observées étant donné la complexité des interactions montrée dans la partie
196 I.B.1. Brunshwig et al. (2010) ont réalisé une synthèse bibliographique de 15 essais étudiant

197 la supplémentation en GLE sur les performances de production, l'essai étant défini ici par un
198 couple témoin-traitement. La moyenne de supplémentation était 363 g de lipides issus de la
199 GLE/vache/j, soit environ 908 g de GLE/vache/j. L'ajout de GLE dans la ration n'a pas eu
200 d'effet moyen significatif sur la production laitière et a entraîné une baisse significative du TB
201 et du TP respectivement de 3,2 g/kg et 0,5 g/kg. Comme l'objectif de l'étude était plutôt de
202 comparer les différentes formes d'apport de la graine de lin, la variabilité des réponses
203 spécifiques à la GLE n'a pas été étudiée. En plus d'essais issus de la littérature grise non pris
204 en compte (Egger et al., 2007; Mathieu et al., 2008; Hurtaud et al., 2012), de nombreux essais
205 ont été réalisés depuis cette synthèse (Lerch et al., 2012; Ferlay et al., 2013; Neveu et al.,
206 2013; Oeffner et al., 2013; Neveu et al., 2014; Livingstone et al., 2015). Une forte variabilité
207 des réponses en termes de production est observée lorsqu'on compile tous ces essais
208 expérimentaux (cf. Chapitre 2).

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

223 Pour résumer, la variabilité des effets sur les performances de production de la
224 supplémentation en GLE n'a pas été étudiée. Pourtant, les caractéristiques physico-chimiques
225 de la ration associée semblent être un élément clé de la réussite de cette supplémentation. De
226 plus, les effets observés en expérimentation sont difficilement extrapolables au terrain au
227 regard de la quantité de GLE utilisée et des caractéristiques des rations utilisées.

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

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

246 La supplémentation en GLE pourrait améliorer le retour à la cyclicité chez la vache
247 laitière via l'amélioration du bilan énergétique (**BE**), notamment en augmentant la densité
248 énergétique de la ration. Pour rappel, les vaches laitières présentent un **BE** négatif (**BEN**)
249 après vêlage qui se traduit par leur amaigrissement et donc une perte d'état corporel. Ce **BEN**
250 est accentué chez les vaches à haut niveau de production laitière. La fonction de production de
251 lait étant la voie prioritaire pour l'utilisation de l'énergie au détriment de la fonction de
252 reproduction, le **BEN** est associé négativement à la reprise de la cyclicité ovarienne après
253 vêlage (Butler, 2003; Leroy et al., 2008a). Toutefois, l'effet de la supplémentation en lipides
254 dans la ration des vaches laitières sur le **BE** était controversé il y a 20 ans (Staples et al., 1998)
255 et l'est encore aujourd'hui (Leroy et al., 2014). L'ingestion après l'ajout de lipides dans la
256 ration peut être réduite (Allen, 2000; Rabiee et al., 2012), l'énergie ingérée est alors
257 équivalente à celle issue d'une ration non supplémentée. La baisse du **TB** observée avec la
258 supplémentation en GLE par l'économie de précurseurs de synthèse de matières grasses
259 pourrait épargner de l'énergie (Leroy et al., 2014). La diminution de l'émission de méthane
260 entérique pourrait aussi contribuer à l'économie d'énergie (Martin et al., 2008, 2016). Ces

261 deux sources d'économie d'énergie, si elles ne se traduisent pas par une augmentation de la
262 production laitière, pourraient donc permettre d'améliorer le BE chez la vache laitière
263 notamment en début de lactation. Jahani-Moghadam et al. (2015) ont réalisé un essai avec
264 400 vaches laitières recevant deux rations isoazotées et isoénergétiques supplémentées soit en
265 huile de palme, soit en GLE (826 g/vache/j), du vêlage à 40 jours post-partum (Tableau 1.1).
266 Les concentrations plasmatiques en acides gras non estérifiés et β -hydroxybutyrate, molécules
267 marqueurs du BEN, n'ont pas différencié entre traitements. Pourtant, ils ont observé un retour à la
268 cyclicité plus rapide en faveur du traitement GLE : 60,3 vs. 66,8 jours d'intervalle vêlage-1^{ère}
269 insémination (**IV-IA1**) (Tableau 1.2). La concentration en glucose dans le sérum a été plus
270 élevée dans le groupe GLE qui a eu aussi un TB plus faible (35,5 vs. 41,7 g/kg). On peut
271 supposer qu'il y a eu une économie d'énergie. De plus, de Veth et al. (2009) ont estimé un
272 raccourcissement du délai de reprise de cyclicité après ingestion de *trans*10,*cis*12-CLA par
273 des méthodes d'analyse de survie à partir de plusieurs études. Or, nous avons vu
274 précédemment que cet AG est un inhibiteur de synthèse de matières grasses (Shingfield et al.,
275 2010), formé lors de la BHR de LA. On peut ainsi supposer que la baisse de TB a été
276 provoquée par cet AG et qu'il a pu contribuer à l'amélioration de la reprise de cyclicité (de
277 Veth et al., 2009). Enfin, une progestéronémie plus élevée a été observée dans les premiers
278 jours après vêlage dans le groupe GLE ainsi qu'une moindre incidence de kystes ovariens
279 (4,4 vs 5,6%). Une incidence réduite de kystes ovariens a aussi été retrouvée dans une
280 ampleur plus importante par Dirandeh et al. (2013) (5,2% vs. 25,6%). Fourichon et al., (2000)
281 ont estimé par méta-analyse un allongement de l'intervalle vêlage-1^{ère} chaleur de 5,6 jours
282 (3,8 ; 7,3) et un allongement de l'IV-IA1 de 11,3 jours (10 ; 12,6) chez les vaches laitières
283 atteintes de kystes ovariens. Ainsi, l'ingestion de GLE post-partum pourrait permettre un
284 retour plus rapide de la cyclicité ovarienne après vêlage.

285 La supplémentation en GLE pourrait améliorer le retour à la cyclicité chez la vache
286 laitière via l'implication de l'ALA et de ses dérivés EPA et DHA dans la synthèse endogène
287 des stéroïdes et des prostaglandines (PG). Brièvement, les AGPI n-3 pourraient inhiber la
288 production de PG de la série 2, d'une part par compétition avec les AG n-6 (notamment
289 l'acide arachidonique (**ARA** ; *cis*5,*cis*8,*cis*11,*cis*14-20:4)) pour la formation des PG de la
290 série 3, et d'autre part par inhibition des gènes impliqués dans leur synthèse (Wathes et al.,
291 2007; Friggens et al., 2010; Wathes et al., 2013), notamment la PGE₂ et la PGF_{2 α} . La
292 diminution de PGE₂ dans les follicules dominants, observée par (Zachut et al., 2011) avec une
293 supplémentation en huile de lin encapsulée par rapport à une supplémentation en savons de

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

308 La supplémentation en GLE pourrait améliorer la fertilité chez la vache laitière via
309 l'amélioration de l'environnement folliculaire et utérin, la qualité de l'oocyte et de l'embryon.
310 Le profil en AG du plasma sanguin et le profil en AG de l'environnement folliculaire évoluent
311 parallèlement à celui du régime alimentaire (Leroy et al., 2014). Ainsi, la supplémentation en
312 GLE ou en huile de lin encapsulée a notamment augmenté la concentration en ALA et le ratio
313 n-3/n-6, et diminué la concentration en ARA dans le plasma sanguin, dans le fluide
314 folliculaire et les cellules de la granulosa des follicules, ainsi que dans le cumulus oophorus
315 (Zachut et al., 2010, 2011; Moallem et al., 2013). Cet environnement serait plus favorable à
316 l'oocyte (Leroy et al., 2014) et pourrait être un facteur influant sur la fertilité (Zeron, 2001;
317 Bender et al., 2010). La supplémentation en GLE pourrait inhiber la synthèse de $\text{PGF}_{2\alpha}$ au
318 niveau de l'endomètre via l'apport d'ALA et l'amélioration du ratio n-3/n-6. Cela pourrait
319 favoriser la persistance du corps jaune en inhibant l'activité lutéolytique de l'endomètre (la
320 libération de $\text{PGF}_{2\alpha}$), et donc favoriser la quantité de progestérone favorable au maintien de
321 l'embryon (Leroy et al., 2014), même si cela a été montré avec les AG n-3 à longue chaîne.
322 De plus, la production de PG de série 3 (anti-inflammatoires) au détriment de série 2 (pro-
323 inflammatoires) permettrait de réduire la réaction inflammatoire contre l'embryon par
324 l'organisme, et ainsi améliorer sa survie. Une mortalité embryonnaire réduite a été observée
325 avec une supplémentation en graines de lin entières par rapport à une supplémentation en
326 AGS ou graines de soja micronisées (0% vs. 15,4% et 8,0 %) (Petit et Twagiramungu, 2006)

327 ou avec une supplémentation en graines de lin aplaties par rapport à une supplémentation en
328 graines de tournesol aplaties (9,8% vs. 27,3%) (Ambrose et al., 2006) (Tableau 1.1,
329 Tableau 1.2). Cependant, des performances de reproduction liées à la fertilité améliorées n'ont
330 jamais été observées (Ambrose et al., 2006; Petit et Twagiramungu, 2006; Fuentes et al.,
331 2008; Bork et al., 2010; Dirandeh et al., 2013b; Jahani-Moghadam et al., 2015) (Tableau 1.2).
332

333

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 nd 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) ¹	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 distillé (1.6 % MS)	5,0	AGS
					Graines de lin extrudées (4.5 % MS)	5,1	Graine de lin

334

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)	-	-	27.3 (9/33)	11.4 (4/35)	17.2 (5/29)	-
	-	-	48.4 (30/62)	37.5 (12/32)	67.7 (42/62)	-	-	9.8 (4/41)	4.8 (2/42)	5.1 (2/39)	-
Petit and Twagiramungu (2006)	-	-	55.9 (19/34)	46.7 (7/15)	64.7 (22/34)	21.1 (4/19)	0 (0/07)	15.4 (4/26)	-	-	61.8 (21/34)
	-	-	40.0 (16/40)	45.0 (9/20)	57.5 (23/40)	12.5 (2/16)	0 (0/9)	8.0 (2/25)	-	-	52.5 (21/40)
	-	-	44.4 (16/36)	43.8 (7/16)	63.9 (23/36)	0 (0/16)	0 (0/07)	0 (0/23)	-	-	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)	66,8	87	48.2	-	92.6	-	-	-	-	-	-
	60,3	87	47.3	-	89.0	-	-	-	-	-	-

335

En gras, les différences significatives intra-essai.

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

349 **4. Des effets de la GLE sur la santé de la vache laitière très peu** 350 **étudiés**

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

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

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

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

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

389 **5. Une seule étude des effets de la GLE sur le bilan économique d'une** 390 **exploitation agricole réalisée à partir d'hypothèses peu documentées**

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

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

402 limitées aux effets sur les performances de production : production laitière par vache et les
 403 taux de matières utiles (Tableau 1.3). Ces hypothèses sont issues d'un travail similaire réalisé
 404 par l'Institut de l'Élevage en 2006 à partir d'un cas-type d'élevage breton, ce dernier s'étant
 405 vraisemblablement appuyé sur des essais réalisés en station expérimentale dans les années
 406 1990 (Brunschwig et al., 1995, 1997, 1998). Les simulations intègrent les modifications
 407 induites dans le système fourrager et le troupeau nécessaires à la réalisation du volume de lait
 408 à livrer (quota basé sur le quota matière grasse).

409 **Tableau 1.3** Effets simulés de la supplémentation d'un kilogramme d'un aliment composé de 70% de
 410 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

411
 412 Quel que soit le système fourrager, l'utilisation de la GLE entraîne une baisse de l'Excédent
 413 Brut d'Exploitation (EBE) (Tableau 1.4). Ce résultat apparaît logique étant donné les
 414 hypothèses retenues pour la réalisation des simulations.

415 **Tableau 1.4** Compensation financière nécessaire sur le prix du lait en €/1000L pour maintenir l'EBE
 416 initial suite à l'introduction de GLE dans la ration des vaches laitières soit i) pas de substitution du
 417 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

418
 419 Ces simulations sont intéressantes car elles répercutent le changement de stratégie d'apports
 420 d'aliments concentrés sur le système fourrager et le nombre de vaches laitières en gardant
 421 comme objectif la production du volume de lait prévu. De plus, les simulations intègrent aussi
 422 le pâturage permettant d'atteindre l'objectif de teneur en AGPI dans le lait en
 423 substitution/complément de la GLE selon les saisons. Cependant, la portée de leurs résultats
 424 est limitée par la prise en compte uniquement des effets induits par l'ingestion de GLE sur les
 425 performances de production. De plus, le choix des hypothèses sur les effets de la GLE
 426 semblent assez sévères même si elles sont en accord avec la synthèse réalisée par Brunschwig

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

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

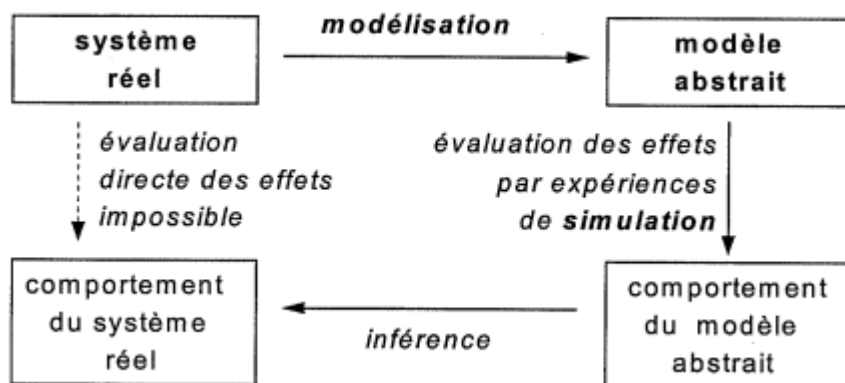
432 **C. Objectifs scientifiques et démarche de recherche**

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

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

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

459 Enfin, une approche par modélisation-simulation, bien que reposant sur une
 460 représentation partielle de la réalité, permettrait de comparer plus facilement et rapidement les
 461 performances technico-économiques sur le moyen terme d'un même atelier laitier introduisant
 462 ou non la GLE dans la ration des vaches laitières. En effet, compte tenu des adaptations
 463 constantes des exploitations agricoles au cours du temps, il est impossible de quantifier
 464 spécifiquement les coûts-bénéfices par étude observationnelle. Ainsi, le recours à la
 465 modélisation du système réel puis l'évaluation des effets techniques et économiques d'une
 466 stratégie par simulation sont classiquement retenus (Figure 1.1) (Seegers et al., 1999), les
 467 autres paramètres décrivant le système modélisé demeurant inchangés entre scénarios et dans
 468 le temps. Le modèle de fonctionnement d'atelier bovin laitier disponible au sein de l'UMR
 469 BIOEPAR (simulateur ECOMAST), modèle individu centré, dynamique et mécaniste
 470 (Dezetter et al., 2017), se révèle pertinent pour tester différentes stratégies d'apport de la GLE
 471 par un rapport à un scénario de référence (i.e., sans utilisation de la GLE). Ainsi, les réponses
 472 animales et leur variabilité observées dans les études précédentes seront utilisées comme
 473 paramètres différenciant les scénarios d'apport de GLE.



474
 475 **Figure 1.1** Places respectives des processus de modélisation et de simulation scientifique mobilisées
 476 (Seegers et al., 1999; Dezetter, 2015).

477
 478 Au final, cette thèse se compose de 3 chapitres (hors introduction générale et
 479 discussion générale) qui mobilisent ces trois approches scientifiques (Figure 1.2).

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

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

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

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

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

Méta-analyse

Etude épidémiologique exposés/non exposés

Simulations

480

481 **Figure 1.2** Approches scientifique mobilisées durant le travail de thèse

482

483
484
485
486
487
488
489
490
491
492
493
494
495
496
497
498
499
500
501
502
503
504
505
506
507
508
509
510
511
512
513
514
515

D. Références

- 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.
- 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 α -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.
- 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.
- 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).
- 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.

- 516 Brunshwig, P., P. Augéard, P. Weill, and Y. Chilliard. 1995. Effets de l'apport d'un
517 concentré enrichi en matières grasses sur les performances des vaches laitières à
518 l'ensilage de maïs. *Rencontres autour des Rech. sur les ruminants*. 2:215–218.
- 519 Brunshwig, P., C. Hurtaud, Y. Chilliard, and F. Glasser. 2010. L'apport de lin dans la ration
520 des vaches laitières: Effets sur la production, la composition. *INRA Prod. Anim.* 23:307–
521 318.
- 522 Brunshwig, P., P. Kernen, and P. Weill. 1997. Effets de l'apport d'un concentré enrichi en
523 acides gras polyinsaturés sur les performances de vaches laitières à l'ensilage de maïs.
524 *Rencontres autour des Rech. sur les ruminants*. 4:361.
- 525 Brunshwig, P., P. Kernen, and P. Weill. 1998. Effets d'une supplémentation en acides gras
526 polyinsaturés sur les performances de vaches laitières en milieu de lactation. *Rencontres*
527 *autour des Rech. sur les ruminants*. 5:262.
- 528 Butler, W.R. 2003. Energy balance relationships with follicular development ovulation and
529 fertility in postpartum dairy cows. *Livest. Prod. Sci.* 83:211–218. doi:10.1016/S0301-
530 6226(03)00112-X.
- 531 Calder, P.C. 2013. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes:
532 nutrition or pharmacology? *Br. J. Clin. Pharmacol.* 75:645–662. doi:10.1111/j.1365-
533 2125.2012.04374.x.
- 534 Chilliard, Y., M. Doreau, G. Gagliostro, Y. Elmeddah, and others. 1993. Addition de lipides
535 protégés (encapsulés ou savons de calcium) à la ration de vaches laitières. Effets sur les
536 performances et la composition du lait. *INRA Prod. Anim.* 6:139–150.
- 537 Chilliard, Y., F. Glasser, A. Ferlay, L. Bernard, J. Rouel, and M. Doreau. 2007. Diet, rumen
538 biohydrogenation and nutritional quality of cow and goat milk fat. *Eur. J. Lipid Sci.*
539 *Technol.* 109:828–855. doi:10.1002/ejlt.200700080.
- 540 Dezetter, C. 2015. Evaluation de l'intérêt du croisement entre races bovines laitières. Oniris.
541 225 pp.
- 542 Dezetter, C., N. Bareille, D. Billon, C. Côrtes, C. Lechartier, and H. Seegers. 2017. Changes
543 in animal performance and profitability of Holstein dairy operations after introduction of
544 crossbreeding with Montbéliarde, Normande, and Scandinavian Red. *J. Dairy Sci.*
545 100:8239–8264. doi:10.3168/jds.2016-11436.
- 546 Dirandeh, E., A. Towhidi, Z. Ansari Pirsaraei, F. Adib Hashemi, M. Ganjkanlou, S.
547 Zeinoaldini, A. Rezaei Roodbari, T. Saberifar, and H.V. Petit. 2013a. Plasma
548 concentrations of PGFM and uterine and ovarian responses in early lactation dairy cows
549 fed omega-3 and omega-6 fatty acids. *Theriogenology*. 80:131–137.

550 doi:10.1016/j.theriogenology.2013.03.012.

551 Dirandeh, E., A. Towhidi, S. Zeinoaldini, M. Ganjkanlou, Z. Ansari Pirsaraei, and A.
552 Fouladi-Nashta. 2013b. Effects of different polyunsaturated fatty acid supplementations
553 during the postpartum periods of early lactating dairy cows on milk yield, metabolic
554 responses, and reproductive performances. *J. Anim. Sci.* 91:713–721.
555 doi:10.2527/jas.2012-5359.

556 Dohoo, I.R., and K.E. Leslie. 1991. Evaluation of changes in somatic cell counts as indicators
557 of new intramammary infections. *Prev. Vet. Med.* 10:225–237. doi:10.1016/0167-
558 5877(91)90006-N.

559 Doreau, M., V. Fievez, A. Troegeler-Meynadier, and F. Glasser. 2012. Métabolisme ruminal
560 et digestion des acides gras longs chez le ruminant: le point des connaissances récentes.
561 *INRA Prod. Anim.* 25:361–374.

562 Doreau, M., S. Laverroux, J. Normand, G. Chesneau, and F. Glasser. 2009. Effect of Linseed
563 Fed as Rolled Seeds, Extruded Seeds or Oil on Fatty Acid Rumen Metabolism and
564 Intestinal Digestibility in Cows. *Lipids.* 44:53–62. doi:10.1007/s11745-008-3250-x.

565 Egger, P., G. Holzer, S. Segato, E. Werth, F. Schwienbacher, G. Peratoner, I. Andrighetto,
566 and A. Kasal. 2007. Effects of oilseed supplements on milk production and quality in
567 dairy cows fed a hay-based diet. *Ital. J. Anim. Sci.* 6:395–405. doi:10.4081/ijas.2007.395.

568 Eilander, A., R.K. Harika, and P.L. Zock. 2015. Intake and sources of dietary fatty acids in
569 Europe: Are current population intakes of fats aligned with dietary recommendations?
570 *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 117:1370–1377. doi:10.1002/ejlt.201400513.

571 Ferlay, A., L. Bernard, A. Meynadier, and C. Malpuech-Brugère. 2017. Production of trans
572 and conjugated fatty acids in dairy ruminants and their putative effects on human health:
573 A review. *Biochimie.* 141:107–120. doi:10.1016/j.biochi.2017.08.006.

574 Ferlay, A., M. Doreau, C. Martin, and Y. Chilliard. 2013. Effects of incremental amounts of
575 extruded linseed on the milk fatty acid composition of dairy cows receiving hay or corn
576 silage. *J. Dairy Sci.* 96:6577–6595. doi:10.3168/jds.2013-6562.

577 Fourichon, C., H. Seegers, and X. Malher. 2000. Effect of disease on reproduction in the dairy
578 cow: a meta-analysis. *Theriogenology.* 53:1729–1759. doi:10.1016/S0093-
579 691X(00)00311-3.

580 Friggens, N.C., C. Disenhaus, and H. V Petit. 2010. Nutritional sub-fertility in the dairy cow:
581 towards improved reproductive management through a better biological understanding.
582 *Animal.* 4:1197–1213. doi:10.1017/S1751731109991601.

583 Fuentes, M.C., S. Calsamiglia, C. Sánchez, A. González, J.R. Newbold, J.E.P. Santos, L.M.

- 584 Rodríguez-Alcalá, and J. Fontecha. 2008. Effect of extruded linseed on productive and
585 reproductive performance of lactating dairy cows. *Livest. Sci.* 113:144–154.
586 doi:10.1016/j.livsci.2007.03.005.
- 587 Garcia, M., L.F. Greco, M.G. Favoreto, R.S. Marsola, L.T. Martins, R.S. Bisinotto, J.H. Shin,
588 A.L. Lock, E. Block, W.W. Thatcher, J.E.P. Santos, and C.R. Staples. 2014. Effect of
589 supplementing fat to pregnant nonlactating cows on colostrum fatty acid profile and
590 passive immunity of the newborn calf. *J. Dairy Sci.* 97:392–405. doi:10.3168/jds.2013-
591 7086.
- 592 Glasser, F., M. Doreau, G. Maxin, and R. Baumont. 2013. Fat and fatty acid content and
593 composition of forages: A meta-analysis. *Anim. Feed Sci. Technol.* 185:19–34.
594 doi:10.1016/j.anifeedsci.2013.06.010.
- 595 Glasser, F., P. Schmidely, D. Sauvant, and M. Doreau. 2008. Digestion of fatty acids in
596 ruminants: a meta-analysis of flows and variation factors: 2. C18 fatty acids. *Animal.*
597 2:691–704. doi:10.1017/S1751731108002036.
- 598 Gulliver, C.E., M. a. Friend, B.J. King, and E.H. Clayton. 2012. The role of omega-3
599 polyunsaturated fatty acids in reproduction of sheep and cattle. *Anim. Reprod. Sci.*
600 131:9–22. doi:10.1016/j.anireprosci.2012.02.002.
- 601 Hurtaud, C., S. Buchin, F. Berodier, G. Duboz, and E. Beuquier. 2012. Effet de combinaisons
602 d'aliments riches en acides gras oméga 3 sur le profil en acides gras du lait et les
603 caractéristiques physico-chimiques et sensorielles d'un fromage de type pâte pressée
604 cuite. Effect of mixtures of food rich in omega 3 fatty acids o. *Rencontres autour des*
605 *Rech. sur les ruminants.* 19:418.
- 606 Huws, S.A., E.J. Kim, S.J.S. Cameron, S.E. Girdwood, L. Davies, J. Tweed, H. Vallin, and
607 N.D. Scollan. 2015. Characterization of the rumen lipidome and microbiome of steers
608 fed a diet supplemented with flax and echium oil. *Microb. Biotechnol.* 8:331–341.
609 doi:10.1111/1751-7915.12164.
- 610 Jahani-Moghadam, M., E. Mahjoubi, and E. Dirandeh. 2015. Effect of linseed feeding on
611 blood metabolites, incidence of cystic follicles, and productive and reproductive
612 performance in fresh Holstein dairy cows. *J. Dairy Sci.* 98:1828–1835.
613 doi:10.3168/jds.2014-8789.
- 614 Jenkins, T.C. 1997. Success of fat in dairy rations depends on the amount. *Feedstuffs.* 69:11–
615 12.
- 616 Kliem, K.E., and K.J. Shingfield. 2016. Manipulation of milk fatty acid composition in
617 lactating cows: Opportunities and challenges. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 118:1661–1683.

618 doi:10.1002/ejlt.201400543.

619 Lanier, J.S., and B.A. Corl. 2015. Challenges in enriching milk fat with polyunsaturated fatty
620 acids. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 6:26. doi:10.1186/s40104-015-0025-0.

621 LeBlanc, S. 2010. Monitoring metabolic health of dairy cattle in the transition period. *J.*
622 *Reprod. Dev.* 56 Suppl:S29-35. doi:10.1262/jrd.1056S29.

623 Lerch, S., A. Ferlay, D. Pomiès, B. Martin, J.A.A. Pires, and Y. Chilliard. 2012. Rapeseed or
624 linseed supplements in grass-based diets: Effects on dairy performance of Holstein cows
625 over 2 consecutive lactations. *J. Dairy Sci.* 95:1956–1970. doi:10.3168/jds.2011-4575.

626 Lerch, S., J.A.A. Pires, C. Delavaud, K.J. Shingfield, D. Pomiès, B. Martin, Y. Chilliard, and
627 A. Ferlay. 2015. Rapeseed or linseed in dairy cow diets over 2 consecutive lactations:
628 Effects on adipose fatty acid profile and carry-over effects on milk fat composition in
629 subsequent early lactation. *J. Dairy Sci.* 98:1005–1018. doi:10.3168/jds.2014-8578.

630 Leroy, J., G. Opsomer, A. Van Soom, I. Goovaerts, and P. Bols. 2008a. Reduced Fertility in
631 High-yielding Dairy Cows: Are the Oocyte and Embryo in Danger? Part I: The
632 Importance of Negative Energy Balance and Altered Corpus Luteum Function to the
633 Reduction of Oocyte and Embryo Quality in High-yielding Dairy Cows. *Reprod.*
634 *Domest. Anim.* 43:612–622. doi:10.1111/j.1439-0531.2007.00960.x.

635 Leroy, J., A. Van Soom, G. Opsomer, I. Goovaerts, and P. Bols. 2008b. Reduced Fertility in
636 High-yielding Dairy Cows: Are the Oocyte and Embryo in Danger? Part II Mechanisms
637 Linking Nutrition and Reduced Oocyte and Embryo Quality in High-yielding Dairy
638 Cows. *Reprod. Domest. Anim.* 43:623–632. doi:10.1111/j.1439-0531.2007.00961.x.

639 Leroy, J., R. Sturmey, V. Van Hoeck, J. De Bie, P. McKeegan, and P. Bols. 2014. Dietary Fat
640 Supplementation and the Consequences for Oocyte and Embryo Quality: Hype or
641 Significant Benefit for Dairy Cow Reproduction? *Reprod. Domest. Anim.* 49:353–361.
642 doi:10.1111/rda.12308.

643 Livingstone, K.M., D.J. Humphries, P. Kirton, K.E. Kliem, D.I. Givens, and C.K. Reynolds.
644 2015. Effects of forage type and extruded linseed supplementation on methane
645 production and milk fatty acid composition of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.*
646 98:4000–4011. doi:10.3168/jds.2014-8987.

647 Magrini, M.-B., F. Charrier, and M. Duru. 2014. Transition agroécologique et synergies entre
648 filières du végétal et de l’animal. Une analyse de la niche d’innovation Bleu-Blanc-
649 Cœur. *Innov. Agron.* 39:139–161.

650 Magrini, M., and M. Duru. 2014. Dynamiques d’innovation dans l’alimentation des bovins
651 - lait : une analyse du processus de diffusion de la démarche « Bleu-Blanc-Cœur » et de

652 ses répercussions. *Fourrages*. 217:79–90.

653 Maia, M.R., L.C. Chaudhary, C.S. Bestwick, A.J. Richardson, N. McKain, T.R. Larson, I.A.
654 Graham, and R.J. Wallace. 2010. Toxicity of unsaturated fatty acids to the
655 biohydrogenating ruminal bacterium, *Butyrivibrio fibrisolvens*. *BMC Microbiol.* 10:52.
656 doi:10.1186/1471-2180-10-52.

657 Martin, C., A. Ferlay, P. Mosoni, Y. Rochette, Y. Chilliard, and M. Doreau. 2016. Increasing
658 linseed supply in dairy cow diets based on hay or corn silage: Effect on enteric methane
659 emission, rumen microbial fermentation, and digestion. *J. Dairy Sci.* 99:3445–3456.
660 doi:10.3168/jds.2015-10110.

661 Martin, C., J. Rouel, J.P. Jouany, M. Doreau, and Y. Chilliard. 2008. Methane output and diet
662 digestibility in response to feeding dairy cows crude linseed, extruded linseed, or linseed
663 oil. *J. Anim. Sci.* 86:2642–2650. doi:10.2527/jas.2007-0774.

664 Mathieu, Y., M. Fougere, Y. Bergot, P. Dermerle, P. Brunschwig, and V. Chatellier. 2008.
665 Effect of extruded linseed concentrate on the milk content and production of dairy cows.
666 *In Proc. 15th Rencontres autour des Recherches sur les Ruminants* rr. Institut de
667 l'élevage, editor. Paris, France. 117.

668 Mavangira, V., J.C. Gandy, C. Zhang, V.E. Ryman, A. Daniel Jones, and L.M. Sordillo. 2015.
669 Polyunsaturated fatty acids influence differential biosynthesis of oxylipids and other
670 lipid mediators during bovine coliform mastitis. *J. Dairy Sci.* 98:6202–6215.
671 doi:10.3168/jds.2015-9570.

672 Mavangira, V., and L.M. Sordillo. 2017. Role of lipid mediators in the regulation of oxidative
673 stress and inflammatory responses in dairy cattle. *Res. Vet. Sci.* 0–1.
674 doi:10.1016/j.rvsc.2017.08.002.

675 Moallem, U., A. Shafran, M. Zachut, I. Dekel, Y. Portnick, and A. Arieli. 2013. Dietary -
676 linolenic acid from flaxseed oil improved folliculogenesis and IVF performance in dairy
677 cows, similar to eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids from fish oil.
678 *Reproduction*. 146:603–614. doi:10.1530/REP-13-0244.

679 Moallem, U., and M. Zachut. 2012. Short communication: The effects of supplementation of
680 various n-3 fatty acids to late-pregnant dairy cows on plasma fatty acid composition of
681 the newborn calves. *J. Dairy Sci.* 95:4055–4058. doi:10.3168/jds.2012-5457.

682 Mozaffarian, D., E.J. Benjamin, A.S. Go, D.K. Arnett, M.J. Blaha, M. Cushman, S.R. Das, S.
683 De Ferranti, J.P. Després, H.J. Fullerton, V.J. Howard, M.D. Huffman, C.R. Isasi, M.C.
684 Jiménez, S.E. Judd, B.M. Kissela, J.H. Lichtman, L.D. Lisabeth, S. Liu, R.H. MacKey,
685 D.J. Magid, D.K. McGuire, E.R. Mohler, C.S. Moy, P. Muntner, M.E. Mussolino, K.

686 Nasir, R.W. Neumar, G. Nichol, L. Palaniappan, D.K. Pandey, M.J. Reeves, C.J.
687 Rodriguez, W. Rosamond, P.D. Sorlie, J. Stein, A. Towfighi, T.N. Turan, S.S. Virani, D.
688 Woo, R.W. Yeh, and M.B. Turner. 2016. Heart disease and stroke statistics-2016 update
689 a report from the American Heart Association. 133. 38-48 pp.

690 Neveu, C., B. Baurhoo, and A. Mustafa. 2013. Effect of feeding extruded flaxseed with
691 different forage:concentrate ratios on the performance of dairy cows. *J. Dairy Sci.*
692 96:3886–3894. doi:10.3168/jds.2012-6189.

693 Neveu, C., B. Baurhoo, and A. Mustafa. 2014. Effect of feeding extruded flaxseed with
694 different grains on the performance of dairy cows and milk fatty acid profile. *J. Dairy*
695 *Sci.* 97:1543–1551. doi:10.3168/jds.2013-6728.

696 Oeffner, S.P., Y. Qu, J. Just, N. Quezada, E. Ramsing, M. Keller, G. Cherian, L. Goddick, and
697 G. Bobe. 2013. Effect of flaxseed supplementation rate and processing on the
698 production, fatty acid profile, and texture of milk, butter, and cheese. *J. Dairy Sci.*
699 96:1177–1188. doi:10.3168/jds.2012-5941.

700 Or-Rashid, M.M., R. Fisher, N. Karrow, O. AlZahal, and B.W. McBride. 2010. Fatty acid
701 profile of colostrum and milk of ewes supplemented with fish meal and the subsequent
702 plasma fatty acid status of their lambs. *J. Anim. Sci.* 88:2092–2102.
703 doi:10.2527/jas.2009-1895.

704 Palmquist, D.L., and T.C. Jenkins. 1980. Fat in Lactation Rations: Review. *J. Dairy Sci.*
705 63:1–14. doi:10.3168/jds.S0022-0302(80)82881-5.

706 Petit, H.V., and H. Twagiramungu. 2006. Conception rate and reproductive function of dairy
707 cows fed different fat sources. *Theriogenology.* 66:1316–1324.
708 doi:10.1016/j.theriogenology.2006.04.029.

709 Poncet, C., D. Rémond, E. Lepage, and M. Doreau. 2003. Comment mieux valoriser les
710 protéagineux et oléagineux en alimentation des ruminants. *Fourrages.* 174:205–229.

711 Rabiee, A.R., K. Breinhild, W. Scott, H.M. Golder, E. Block, and I.J. Lean. 2012. Effect of fat
712 additions to diets of dairy cattle on milk production and components: A meta-analysis
713 and meta-regression. *J. Dairy Sci.* 95:3225–3247. doi:10.3168/jds.2011-4895.

714 Rajaram, S. 2014. Health benefits of plant-derived -linolenic acid. *Am. J. Clin. Nutr.*
715 100:443S–448S. doi:10.3945/ajcn.113.071514.

716 Raphael, W., L. Halbert, G.A. Contreras, and L.M. Sordillo. 2014. Association between
717 polyunsaturated fatty acid-derived oxylipid biosynthesis and leukocyte inflammatory
718 marker expression in periparturient dairy cows. *J. Dairy Sci.* 97:3615–3625.
719 doi:10.3168/jds.2013-7656.

720 Raphael, W., and L. Sordillo. 2013. Dietary Polyunsaturated Fatty Acids and Inflammation:
721 The Role of Phospholipid Biosynthesis. *Int. J. Mol. Sci.* 14:21167–21188.
722 doi:10.3390/ijms141021167.

723 Ryman, V.E., N. Packiriswamy, B. Norby, S.E. Schmidt, A.L. Lock, and L.M. Sordillo. 2017.
724 Supplementation of linoleic acid (C18:2n-6) or α -linolenic acid (C18:3n-3) changes
725 microbial agonist-induced oxylipid biosynthesis. *J. Dairy Sci.* 100:1870–1887.
726 doi:10.3168/jds.2016-11599.

727 Santos, J., T. Bilby, W. Thatcher, C. Staples, and F. Silvestre. 2008. Long Chain Fatty Acids
728 of Diet as Factors Influencing Reproduction in Cattle. *Reprod. Domest. Anim.* 43:23–30.
729 doi:10.1111/j.1439-0531.2008.01139.x.

730 Santos, J., R. Bisinotto, E. Ribeiro, F. Lima, L. Greco, C. Staples, and W. Thatcher. 2010.
731 Applying nutrition and physiology to improve reproduction in dairy cattle. *Reprod.*
732 *Domest. Ruminants.* 7:385–401. doi:10.5661/RDR-VII-387.

733 Santschi, D.E., H.-R. Wettstein, F. Leiber, a.-K.M. Witschi, and M. Kreuzer. 2009.
734 Colostrum and milk fatty acids of dairy cows as influenced by extruded linseed
735 supplementation during the transition period. *Can. J. Anim. Sci.* 89:383–392.
736 doi:10.4141/CJAS08115.

737 Sauvant, D., and P. Bas. 2001. La digestion des lipides chez le ruminant. *INRA Prod. Anim.*
738 14:303–310.

739 Seegers, H., C. Fourichon, P. Hottet, J. Sørensen, D. Billon, N. Bareille, and F. Beaudeau.
740 1999. Evaluation des conséquences économiques des stratégies de maîtrise de la
741 concentration en cellules somatiques du lait produit par un troupeau de vaches laitières.
742 *In J Natl GTV.* 26–28.

743 Shingfield, K.J., L. Bernard, C. Leroux, and Y. Chilliard. 2010. Role of trans fatty acids in the
744 nutritional regulation of mammary lipogenesis in ruminants. *Animal.* 4:1140–1166.
745 doi:10.1017/S1751731110000510.

746 Shingfield, K.J., and J.M. Griinari. 2007. Role of biohydrogenation intermediates in milk fat
747 depression. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 109:799–816. doi:10.1002/ejlt.200700026.

748 Staples, C.R., J.M. Burke, and W.W. Thatcher. 1998. Influence of Supplemental Fats on
749 Reproductive Tissues and Performance of Lactating Cows. *J. Dairy Sci.* 81:856–871.
750 doi:10.3168/jds.S0022-0302(98)75644-9.

751 Stark, A.H., M.A. Crawford, and R. Reifen. 2008. Update on alpha-linolenic acid. *Nutr. Rev.*
752 66:326–332. doi:10.1111/j.1753-4887.2008.00040.x.

753 Sterk, A., R. Hovenier, B. Vlaeminck, A.M. van Vuuren, W.H. Hendriks, and J. Dijkstra.

754 2010. Effects of chemically or technologically treated linseed products and
755 docosahexaenoic acid addition to linseed oil on biohydrogenation of C18:3n-3 in vitro. *J.*
756 *Dairy Sci.* 93:5286–5299. doi:10.3168/jds.2010-3144.

757 Sterk, A., B. Vlaeminck, A.M. van Vuuren, W.H. Hendriks, and J. Dijkstra. 2012. Effects of
758 feeding different linseed sources on omasal fatty acid flows and fatty acid profiles of
759 plasma and milk fat in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 95:3149–3165.
760 doi:10.3168/jds.2011-4474.

761 Tam, V.C. 2013. Lipidomic profiling of bioactive lipids by mass spectrometry during
762 microbial infections. *Semin. Immunol.* 25:240–248. doi:10.1016/j.smim.2013.08.006.

763 Thatcher, W., J.E.P. Santos, and C.R. Staples. 2011. Dietary manipulations to improve
764 embryonic survival in cattle. *Theriogenology.* 76:1619–1631.
765 doi:10.1016/j.theriogenology.2011.06.005.

766 Townsend, N., L. Wilson, P. Bhatnagar, K. Wickramasinghe, M. Rayner, and M. Nichols.
767 2016. Cardiovascular disease in Europe: epidemiological update 2016. *Eur. Heart J.*
768 37:3232–3245. doi:10.1093/eurheartj/ehw334.

769 Tressou, J., P. Moulin, B. Vergès, C. Le Guillou, N. Simon, and S. Pasteau. 2016. Fatty acid
770 dietary intake in the general French population: are the French Agency for Food,
771 Environmental and Occupational Health & Safety (ANSES) national
772 recommendations met? *Br. J. Nutr.* 116:1966–1973. doi:10.1017/S000711451600413X.

773 de Veth, M.J., D.E. Bauman, W. Koch, G.E. Mann, A.M. Pfeiffer, and W.R. Butler. 2009.
774 Efficacy of conjugated linoleic acid for improving reproduction: A multi-study analysis
775 in early-lactation dairy cows. *J. Dairy Sci.* 92:2662–2669. doi:10.3168/jds.2008-1845.

776 Wathes, D., Z. Cheng, W. Marei, and A. Fouladi-Nashta. 2013. Polyunsaturated fatty acids
777 and fertility in female mammals: an update. *CAB Rev. Perspect. Agric. Vet. Sci. Nutr.*
778 *Nat. Resour.* 8:1–14. doi:10.1079/PAVSNNR20138041.

779 Wathes, D.C., D.R.E. Abayasekara, and R.J. Aitken. 2007. Polyunsaturated fatty acids in
780 male and female reproduction. *Biol. Reprod.* 77:190–201.
781 doi:10.1095/biolreprod.107.060558.

782 Weill, P., B. Schmitt, G. Chesneau, N. Daniel, F. Safraou, and P. Legrand. 2002. Effects of
783 Introducing Linseed in Livestock Diet on Blood Fatty Acid Composition of Consumers
784 of Animal Products. *Ann. Nutr. Metab.* 46:182–191. doi:10.1159/000065405.

785 Zachut, M., A. Arieli, and U. Moallem. 2011. Incorporation of dietary n-3 fatty acids into
786 ovarian compartments in dairy cows and the effects on hormonal and behavioral patterns
787 around estrus. *Reproduction.* 141:833–840. doi:10.1530/REP-10-0518.

788 Zachut, M., I. Dekel, H. Lehrer, A. Arieli, A. Arav, L. Livshitz, S. Yakoby, and U. Moallem.
789 2010. Effects of dietary fats differing in n-6:n-3 ratio fed to high-yielding dairy cows on
790 fatty acid composition of ovarian compartments, follicular status, and oocyte quality. *J.*
791 *Dairy Sci.* 93:529–545. doi:10.3168/jds.2009-2167.

792 Zened, A., F. Enjalbert, M.C. Nicot, and A. Troegeler-Meynadier. 2013. Starch plus
793 sunflower oil addition to the diet of dry dairy cows results in a trans-11 to trans-10 shift
794 of biohydrogenation. *J. Dairy Sci.* 96:451–459. doi:10.3168/jds.2012-5690.

795 Zened, A., A. Troegeler-Meynadier, M.C. Nicot, S. Combes, L. Cauquil, Y. Farizon, and F.
796 Enjalbert. 2011. Starch and oil in the donor cow diet and starch in substrate differently
797 affect the in vitro ruminal biohydrogenation of linoleic and linolenic acids. *J. Dairy Sci.*
798 94:5634–5645. doi:10.3168/jds.2011-4491.

799 Zeron, Y. 2001. Seasonal changes in bovine fertility: relation to developmental competence of
800 oocytes, membrane properties and fatty acid composition of follicles. *Reproduction.*
801 121:447–454. doi:10.1530/reprod/121.3.447.
802

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

805 **A. Caractérisation de la variabilité des effets de l'utilisation de la graine**
806 **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,*†¹ 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 α -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, α -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, α -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.

¹Corresponding author: 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 α -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 postruminal 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), ruminic 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 ΔMFC = MFC response to EL supplementation, MFC_{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 (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 (ΔCP , ΔNDF , ΔADF , Δstarch), energy level (ΔNE_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, β_0 = intercept, β_1 and β_2 = regression coefficients, and ε_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, β_0 = intercept, β_1 , β_2 , β_3 , β_4 , and β_5 = regression coefficients, and ε_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 ²	Main forage ³	Corn silage ⁴	%C _{control} ⁵	%fat _{EL} ⁶	FEL ⁷ (g/cow per day)	Performance for control; Δ(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	39.6 ; -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	24.8 ; 1.4	40.4; - 3.9	33.5 ; -2.0
Chilliard et al., 2009 ¹	LS8	CS	HCS	34	7.0	980	19.8 ; - 3.1	23.0; -2.2	41.1; - 5.8	34.0; -0.7
Egger et al., 2007	LS12	H ³	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 ¹	CB24	CS	HCS	28	8.4	944	21.4; -2.1	27.3; 1.9	42.2 ; -4.9	33.8 ; -1.9
Ferlay et al., 2013 (1) ¹	LS4	H	LCS	50	3.6	366	20.9; -2.1	26.1; -0.3	35.9 ; -0.9	30.5; -1.4
					5.2	784	20.9; -1.1	26.1; 2.2	35.9 ; -0.9	30.5; -1.7
					6.4	1,194	20.9; -0.7	26.1; 1.9	35.9 ; -6.8	30.5; -0.5
Ferlay et al., 2013 (2) ¹	LS4	CS	HCS	40	4.5	363	18.7; -0.5	25.3; -0.1	33.8 ; -3.1	30.4; -1.5
					6.2	698	18.7; -1.0	25.3; -1.7	33.8 ; -6.7	30.4; -0.5
					7.8	981	18.7; -2.0	25.3; -0.2	33.8 ; -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 ¹	CB12	CS	HCS	32	4.2	185	22.6; -0.5	30.8 ; 1.7	43.3 ; -5.1	34.0 ; -1.4
					5.0	383	22.6; -0.4	30.8 ; 2.8	43.3 ; -11.7	34.0 ; -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) ¹	CB12	GS	LCS	29	6.6	548	20.2; -1.5	27.8; -0.5	35.8; 1.0	29.9 ; -1.3
Lerch et al., 2012 (2) ¹	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) ¹	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) ¹	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	30.9 ; 2.9	42.7 ; -4.2	33.5 ; -1.0
Neveu et al., 2013 ¹	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) ¹	LS16	A	LCS	41	2.7	343	22.3 ; 0.9	30.9; 0.7	36.9; 0.5	31.5; -0.4
Neveu et al., 2014 (2) ¹	LS16	A	LCS	37	2.3	343	22.1 ; 1.1	31.6; 0.8	36.5; 0.8	31.2; 0.1
Oeffner et al., 2013 ¹	LS10	A	LCS	41	4.6	260	20.5 ; 0.9	30.0; 0.4	42.0; 1.1	31.1; -0.4
					5.6	523	20.5 ; 1.3	30.0; 0.3	42.0; 0.8	31.1; -0.1
					6.5	783	20.5 ; 2.5	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

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

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

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

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

⁵C_{control} = proportion of concentrate in control diet (%).

⁶fat_{EL} = 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).

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

⁸MY = 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 (± 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% (± 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 (± 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% (± 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 (± 2.16) and 20.2 (± 2.47) kg/d and 29.9 (± 5.07) and 30.1 (± 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/cow per day 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-

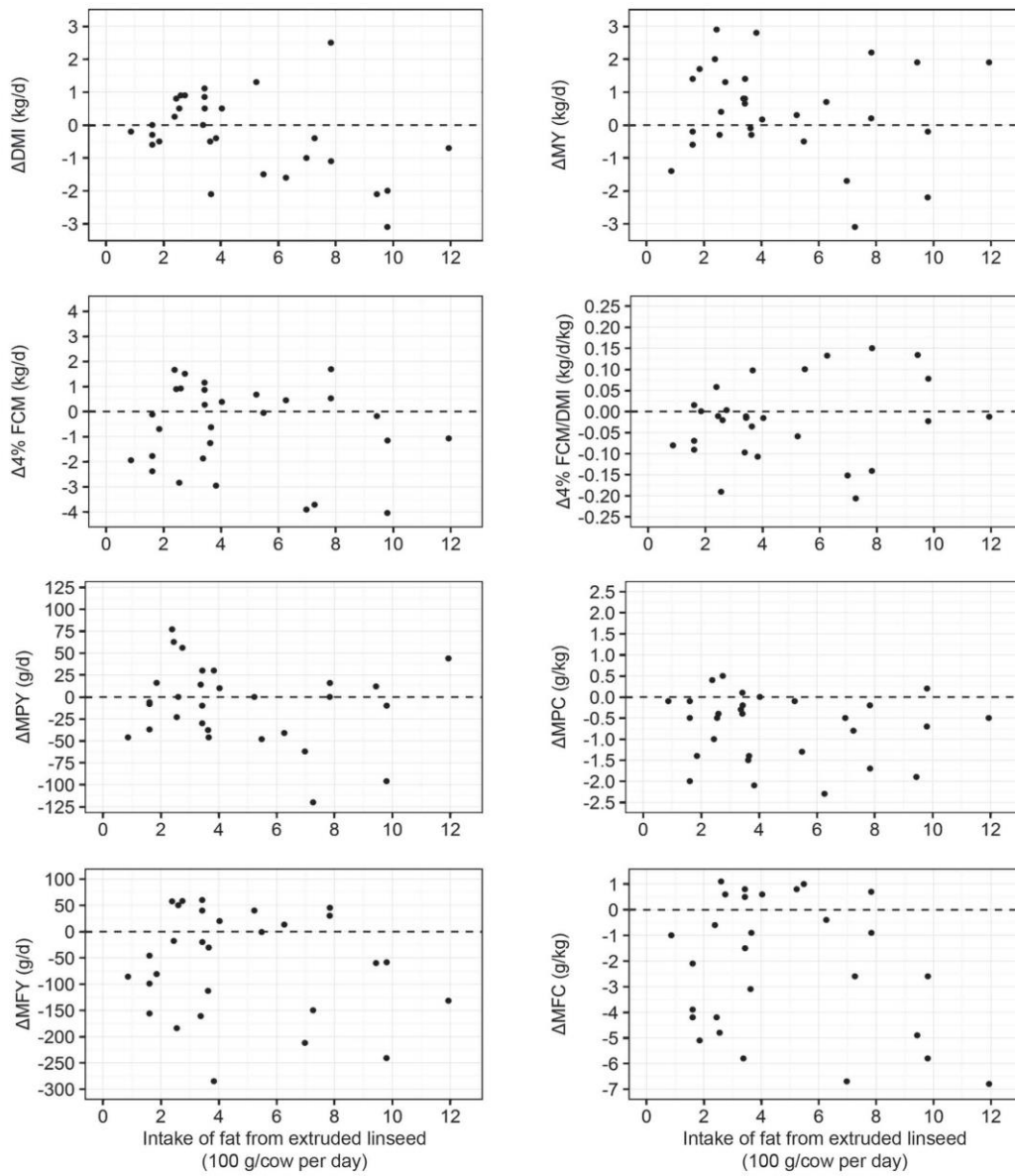


Figure 1. Within-study differences (Δ) of average DMI (kg/cow per day), milk yield (MY; kg/cow per day), 4% FCM:DMI (kg of milk/kg of DM per cow per day), milk protein yield (MPY; g/cow per day), milk protein content (MPC; g/kg), milk fat yield (MFY; g/cow per day), and milk fat content (MFC; g/kg) plotted 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 _p ¹	n _c ²	Control				n _{EL} ³	Δ (= FA _{EL} - FA _{control})			
			Mean	SD	Minimum	Maximum		Mean	SD	Minimum	Maximum
FA ⁴ (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

¹n_p = number of publications.

²n_c = number of control groups (i.e., number of trials).

³n_{EL} = number of extruded linseed supplemented groups.

⁴4:0 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 (ΔY) ¹	n _{EL} ²	Parameter ³	Estimate	SE	P-value	Model statistics ⁴		
						RMSE	R ² _{adj}	P-value
Δ 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			
Δ PA (16:0)	20	Intercept	-0.068	1.3179	NS	2.7137	0.69	<0.001
		FEL	-1.376	0.2093	<0.001			
Δ MUFA	20	Intercept	-1.505	1.2859	NS	2.6479	0.79	<0.001
		FEL	1.730	0.2042	<0.001			
Δ 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			
Δ <i>trans</i> -10 18:1 ⁵	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			
Δ 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			
Δ 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			
Δ PUFA	20	Intercept	-0.173	0.2870	NS	0.5910	0.80	<0.001
		FEL	0.396	0.0456	<0.001			
Δ 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			
Δ PA:ALA ratio	16	Intercept	8.114	6.9266	NS	6.0408	0.93	<0.001
		FEL	1.183	1.4110	NS			
		PA:ALA _{control}	-0.476	0.1014	<0.001			
		FEL \times PA:ALA _{control}	-0.075	0.0266	0.013			
Δ LA:ALA ratio	17	Intercept	0.583	0.3488	NS	0.2716	0.96	<0.001
		FEL	0.055	0.0540	NS			
		LA:ALA _{control}	-0.459	0.0736	<0.001			
		FEL \times LA:ALA _{control}	-0.059	0.0134	<0.001			

¹A 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 = α -linolenic acid.

²n_{EL} = number of extruded linseed-supplemented groups.

³FEL = 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).

⁴RMSE = root mean squared error, R²_{adj} = adjusted R-squared.

⁵Subgroups analyses: LCS Δ *trans*-10 18:1 = -0.908 + 0.277 \times FEL; HCS Δ *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 (± 3.55) and 35.6 (± 4.21) g/kg and 1,129 (± 190.5) and 1,066 (± 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

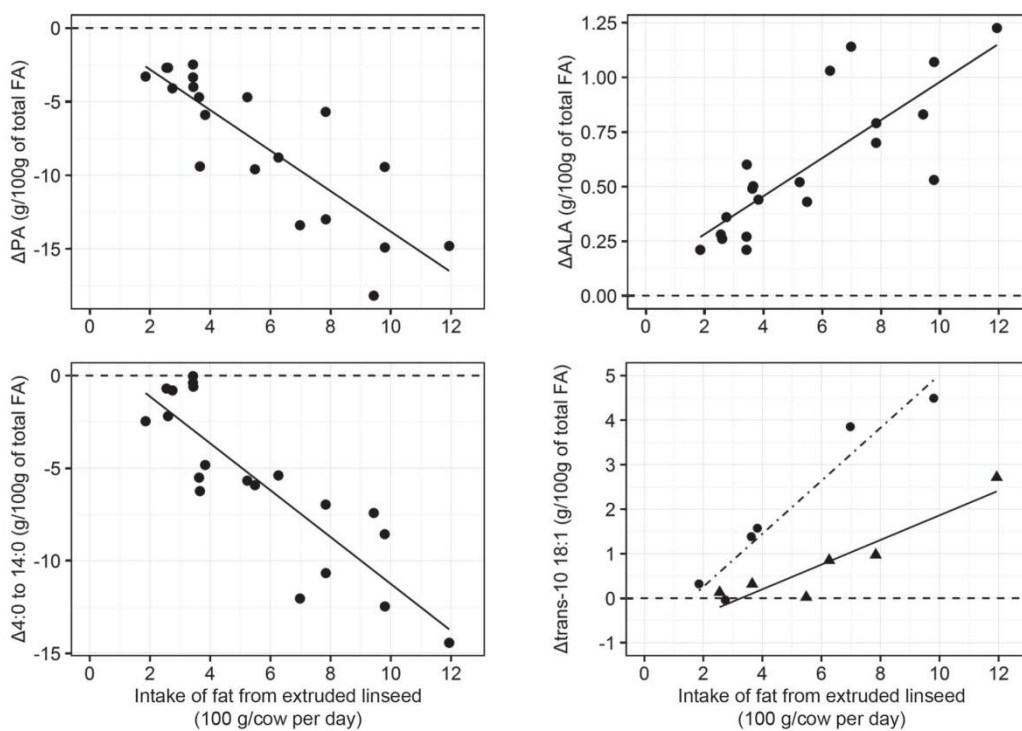


Figure 2. Within-study differences (Δ) of average proportions in milk of palmitic acid (PA; 16:0), sum of pairs 4:0 to 14:0, α -linolenic acid (ALA; *cis*-9, *cis*-12, *cis*-15 18:3), and *trans*-10 18:1 plotted with daily intake of fat from extruded linseed supplementation. For all responses, $\Delta = 0$: 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 (ΔY) ¹	n_{EL} ²	Parameter ³	Estimate	SE	P-value	Model statistics ⁴		
						RMSE	R ² _{adj}	P-value
ΔMFC	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			
	28	Intercept	-3.03	0.482	<0.001	2.208	0.28	0.002
		Alfalfa (presence)	3.29	0.964	0.002			
		<i>18</i> Intercept	-0.44	0.652	NS			
	<i>18</i>	HCS	-2.76	0.922	0.009	1.955	0.32	0.009
		Intercept	-2.83	0.555	<0.001			
		Alfalfa (presence)	3.01	0.961	0.006			
ΔMFY	29	Intercept	-90	17.8	<0.001	83.4	0.29	0.002
		Alfalfa (presence)	127	36.2	0.002			
	<i>19</i>	Intercept	4	28.5	NS	85.6	0.24	0.019
		HCS	-102	39.3	0.019			
	<i>18</i>	Intercept	-75	18.4	0.001	63.8	0.40	0.003
		Alfalfa (presence)	113	31.9	0.003			

¹A 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.

² 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.

³FEL = 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).

⁴RMSE = root mean squared error, R²_{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-

timize 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

- Allan, 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. Grünari. 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. Grünari. 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. Budylowski, H. Schönemann, 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\(04\)73372-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73372-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/NEJMra054035>.
- 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. Paulconnier, 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-Töber, D., M. Barański, C. J. Seal, R. Sanderson, C. Benbrook, H. Steinshamm, J. Gromadzka-Ostrowska, E. Rembialkowska, K. Skwarło-Sońta, M. Eyre, G. Cozzi, M. K. Larsen, T. Jordan, U. Niggl, 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, α -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>.

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

825
826
827
828
829
830
831
832
833
834
835
836
837
838
839
840
841
842
843
844
845
846
847
848
849
850
851
852
853
854

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

T. Meignan ^{1,2}, A. Madouasse ¹, F. Beaudou ¹, C. Lechartier ³ and N. Bareille ¹

¹ *BIOEPAR, INRA, Oniris, La Chantrerie, F-44307 Nantes, France*

² *Valorex, La Messayais, F-35210 Combourtille, France*

³ *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

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 α -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.

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

856 **2. Implications**

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

862 **3. Introduction**

863 For human health, there is a need to improve milk fatty acid (FA) profile by increasing
864 polyunsaturated fatty acids (PUFA) at the expense of saturated fatty acids (SFA) or by
865 rebalancing the ratio n-6/n-3 (Simopoulos, 2002, 2008; Rajaram, 2014) as milk and milk-
866 derived products represent a major part of FA supply and especially SFA (Kliem *et al.*, 2017).
867 Extruded linseed (EL) is a source of fat of which 54% of total FA is α -linolenic acid (ALA,
868 18:3 n-3) (Petit, 2010). Its incorporation into dairy cow diets can modify the milk FA profile
869 in a way that could improve human health (Meignan *et al.*, 2017). There has been a growing
870 use of EL in French farms in the last decade, primarily to modify the milk FA profile (Doreau
871 and Ferlay, 2015), but also now to improve cow performance.

872 Feeding dairy cows with high-fat feeds could enhance their energy balance status by
873 increasing the dietary energy density without increasing the dietary starch content.
874 Consequently, supplemental fat in the diet could improve milk yield (MY) in particular in
875 early lactation when energy supply does not meet the requirements for maintenance and
876 production (Onetti and Grummer, 2004). However, selecting the proper dietary fat content is
877 an important management decision that may affect the success of this supplementation
878 (Jenkins, 1997). Considering amounts of fat may be even more relevant when supplementing
879 PUFA because of the formation of ruminal biohydrogenation intermediates that exert anti-
880 lipogenic effects leading to a decrease in milk fat content (MFC) (Shingfield and Grinari,
881 2007; Shingfield *et al.*, 2010). Meignan *et al.* (2017), in a meta-analysis of experimental trials,
882 observed a mean increase in MY of +0.72 kg/d solely when supplementing EL inside a
883 practical range (i.e., < 60 g of fat per kg of DM and < 600 g of fat from EL in the diet)
884 whereas no effect was observed when considering high-fat diets. Besides, supplementing EL
885 to dairy cows decreased MFC at high inclusion level or when associated with high corn
886 silage-based diets (Meignan *et al.*, 2017).

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

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

895 **4. Material and methods**

896 *a) General study design and available data*

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

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

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

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

931 Exposure status was determined within a herd at the cow-TD level. In order to limit
932 classification bias as a cow in late lactation had a smaller probability to be supplemented with
933 EL, all TDs occurring after 180 days in milk were excluded from the study. A cow-TD was
934 considered exposed only if the cow was supplemented with EL continuously since the
935 previous TD (or since its calving in the case of the first TD within a lactation). For each cow-
936 TD, an average daily EL exposure during the interval between TD and previous TD (or TD
937 and calving) was calculated by adding each daily exposure (from each day of this interval),
938 estimated as described above, divided by the number of days of this interval. The exposure
939 variable was categorized into several levels of EL daily intake: 0 (i.e., unexposed),]0, 50],
940]50, 300],]300, 600] and]600, 1 500] g/cow/d based on EL use on the field. We considered
941 that estimated EL daily intakes higher than 1 500 g/cow/d (0.13 % of cow-TD) were
942 inaccurate and related lactations were removed. This upper limit was chosen based on our
943 previous work (Meignan et al., 2017) defined as the upper limit of the practical range of EL
944 supplementation to dairy cows (i.e., 600 g of fat from EL considering 40% of fat in EL). In
945 order to increase the reliability of the results by increasing precision of exposure temporal
946 sequence and to limit classification bias, two additional modalities of the exposure variable
947 were considered : (i) transition (TR) for the first TD after beginning EL supplementation (ii)
948 carry-over (CO) for the first TD after stopping EL supplementation. The quantity of EL intake
949 was not defined for these modalities because the exposure duration was too variable between
950 cow-TDs. Our hypothesis was that effects associated with TR and CO modalities were low

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

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

958 *c) Data selection*

959 Herds with unusual management (i.e., < 10 calvings per year and with
960 < 15 or > 65 percent of primiparous cows) were excluded. Only data from Holstein cows were
961 included because of the strong effect of breed on MY and milk contents. Only lactations that
962 lasted at least 180 days were included. Only lactations beginning after 1 January 2008 and
963 before 6 July 2015 were selected, respectively to limit classification bias by knowing the
964 exposure status since calving and to allow studying lactation during 180 days. In addition,
965 cows and/or lactations with missing, implausible or unusual data were excluded: age at first
966 calving < 22 months or >40 months, calving to first TD < 7 days, interval between TD
967 < 22 days or > 73 days, milk contents equal to zero at TD. This data selection reduced sample
968 size to 1,204 herds.

969 *d) Statistical models*

970 The statistical unit was the cow-TD. Previous studies have found that studying
971 association between MY and disease exposure by a repeated measure approach (i.e., TD
972 records) was more relevant than by a single measure (i.e., cumulated MY over a lactation)
973 (Gröhn et al., 1999; Nusinovici et al., 2013). Besides, considering the EL daily exposure
974 estimation and the hypothesis of EL short term effect, studying the association between EL
975 exposure and milk performance with repeated measures seemed more informative and more
976 accurate. The effect of EL exposure on MY, MFC and MPC was assessed using linear mixed
977 models. The analysis was stratified by parity (1, 2, 3, 4 and 5+) to avoid potential
978 confounding because the shape of the lactation curve and MY vary according to parity
979 (Nusinovici et al., 2013). To account for factors likely to influence milk performance, the
980 model was adjusted for several independent variables (Gröhn et al., 1999; Nusinovici et al.,
981 2013): age at first calving (for primiparous only), days in milk, month of TD, year of TD,
982 geographic area. In addition, an autoregressive covariance structure of order 1 was

983 implemented to model the association among repeated TDs within lactation (Madouasse et al.,
984 2016):

$$\begin{aligned} 985 \quad \varepsilon_t &= \Phi \times \varepsilon_{t-1} + \eta_t \\ \eta_t &\sim \text{Normal}(0, \sigma^2) \end{aligned}$$

986 where ε_t = residual from TD_t, Φ = correlation parameter between error terms on consecutive
987 measurements from a cow during a lactation, ε_{t-1} = residual from TD_{t-1}, η_t = residual error
988 from TD_t.

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

$$\begin{aligned} 992 \quad Y_{ijt} &= \alpha + \text{EXP}_{ijt} + \text{DIM}_{ijt} + \text{MO}_{ijt} + \text{YR}_{ijt} + \text{PA}_{ijt} + \nu_j + \varepsilon_t \\ \nu_j &\sim \text{Normal}(0, \sigma^2) \end{aligned}$$

993 where Y_{ijt} = daily milk performance (MY, MFC or MPC) record of a cow i in herd j at time t,
994 α = overall mean, EXP_{ijt} = exposure (7 levels), DIM_{ijt} = days in milk (26 levels,
995 corresponding to 5 days-periods in early lactation and 10 days-periods in mid lactation),
996 MO_{ijt} = month of TD (12 levels), YR_{ijt} = year of TD (8 levels), PA_{ijt} = geographic area (7
997 levels), ν_j = herd j random effect, ε_t = residual from TD at time t described above.

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

1000 **5. Results**

1001 **a) Distribution of data and unadjusted milk performance**

1002 The final sample was composed of 1 204 herds, 194 056 cows, 400 522 lactations, and
1003 1 997 763 TDs or statistical units (Table 2.5). Almost half of the TDs selected were
1004 unexposed. Nearly 78% of the exposed TDs were at levels]50, 300] or]300, 600] g/cow/d.
1005 Mean daily EL intake in exposed population was 297 (\pm 236.5) g/cow/d. Means of MY, MFC
1006 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
1007 the reference population, and respectively 33.1 (\pm 7.76) kg/d, 37.9 (\pm 6.35) g/kg and
1008 30.5 (\pm 2.76) g/kg in the whole exposed population (cow-TDs at TR and CO excluded). The
1009 number of TDs decreased with increasing parity with more than 35% of TDs related to
1010 primiparous cows (Table 2.6). Within all levels of exposure, MY increased by parity until

1011 parity 4, as MFC from parity 1 to parity 5+ (Table 2.5), whereas MPC reached a maximum at
1012 parity 2 and then decreased.

1013 ***b) Dose-dependent increase of milk yield associated with***
1014 ***exposure to extruded linseed***

1015 Exposure to EL was associated with an increase in MY in a dose-response manner,
1016 except for the low exposure level]0, 50] g/cow/d (Table 2.6). Based on means of MY within
1017 parity within EL exposure level presented in Table 2.5, MY increased from 1.4% for the low-
1018 moderate exposure level]50, 300] g/cow/d to 2.6% for the high exposure level]600,
1019 1 500] g/cow/d within parity 1, while within parity 4 MY increased from 2.1% to 3.4%. Milk
1020 yield associated with TR and CO modalities was intermediate compared to other significant
1021 exposure levels ($P < 0.001$; Table 2.6).

1022 ***c) Dose-dependent decrease of milk fat content associated with***
1023 ***exposure to extruded linseed***

1024 Exposure to EL was associated with a decrease in MFC in a dose-response manner,
1025 except for the low exposure level]0, 50] g/cow/d (Table 2.7). Within parity 1, MFC decreased
1026 from 0.3% for the low-moderate exposure level]50, 300] g/cow/d to 0.9% for the high
1027 exposure level]600,1 500] g/cow/d, while within parity 4, MFC decreased from 1.1% to
1028 2.4%. Milk fat content associated with TR and CO modalities was slightly decreased ($P <$
1029 0.001 ; Table 2.7), and mostly lower than other significant exposure levels.

1030 ***d) Dose-dependent decrease of milk protein content associated***
1031 ***with exposure to extruded linseed***

1032 Exposure to EL was associated with a slight decrease in MPC in a dose-response
1033 relationship (Table 2.8), except within parity 1. Within parity 2, MPC decreased from 0.1%
1034 for the low-moderate exposure level]50, 300] g/cow/d to 0.3% for the high exposure level
1035]600,1 500] g/cow/d while within parity 4 MPC decreased from 0.3% to 0.4%. Exposure
1036 modalities TR and CO were seldom significant (Table 2.8).

1037 ***e) Adjustment variables associated with milk performance***

1038 All adjustment variables were significantly associated with MY, MFC and MPC
1039 (Table 2.9). Days in milk and month of TD were closely related to MY, MFC and MPC.
1040 Effect of days in milk on MY, MFC, MPC respectively had a range of variation of 7.5 kg/d
1041 with a minimum and a maximum respectively reached at]35,40] and]170,180] days, 8.3 g/kg
1042 with a minimum and a maximum respectively reached at]90,100] and [7,10] days, 5.5 g/kg

1043 with a minimum and a maximum respectively reached at]35,40] and [7,10] days. Milk yield
1044 was increased during months of spring compared to months of autumn and winter while MFC
1045 and MPC were decreased during months of spring and summer compared to months of winter.
1046

1047 **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
 1048 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 ¹					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 ² (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

1049 ¹ 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
 1050 levels were considered : (i) transition (TR) corresponding to the first TD after beginning EL supplementation (ii) carry-over (CO) corresponding to the first
 1051 TD after stopping EL supplementation.

1052 ² Average EL intake for TR and CO levels was not shown because of too many differences in time exposure within these levels.

1053 **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
 1054 study period 2008-2015 (n = 1 997 763 cow test-day records)

EL exposure status ¹	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> ²	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

1055 Estimation of the parameter Φ 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+.

1056 ¹ 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
 1057 levels were considered : (i) transition (TR) corresponding to the first TD after beginning EL supplementation (ii) carry-over (CO) corresponding to the first
 1058 TD after stopping EL supplementation.

1059 ² P-value.

1060 **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
 1061 the study period 2008-2015 (n = 1 997 763 cow test-day records)

EL exposure status ¹	Parity														
	1 (n = 719 098)			2 (n = 548 676)			3 (n = 359 330)			4 (n = 205 559)			5+ (n = 165 100)		
	Estimate	SE	P ²	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

1062 Estimation of the parameter Φ 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+.

1063 ¹ 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
 1064 levels were considered : (i) transition (TR) corresponding to the first TD after beginning EL supplementation (ii) carry-over (CO) corresponding to the first
 1065 TD after stopping EL supplementation.

1066 ² P-value.

1067 **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
 1068 during the study period 2008-2015 (n = 1 997 763 cow test-day records)

EL exposure status ¹	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> ²	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

1069 Estimation of the parameter Φ 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+.

1070 ¹ 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
 1071 levels were considered : (i) transition (TR) corresponding to the first TD after beginning EL supplementation (ii) carry-over (CO) corresponding to the first
 1072 TD after stopping EL supplementation.

1073 ² P-value

1074 **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
 1075 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> ¹	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

1076

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

1077

¹P-value.

1078

6. Discussion

1079

1080

1081

1082

1083

1084

1085

1086

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.

1087

a) Direction and magnitude of the association between extruded

1088

linseed exposure and milk performance

1089

1090

1091

1092

1093

1094

1095

1096

1097

1098

1099

1100

1101

1102

1103

1104

1105

1106

1107

1108

1109

1110

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

1111 250 g of EL estimated by Meignan *et al.* (2017). However, the nature of the forage in the diet
1112 could not be studied while this factor plays a major role in modulating milk fat responses in
1113 interaction with fat supplement (Chilliard and Ferlay, 2004; Ferlay *et al.*, 2013). For example,
1114 EL supplementation in high corn silage-based diet decreased MFC by 2.8 g/kg compared to
1115 EL supplementation in low corn silage-based diet (Meignan *et al.*, 2017). The slight decrease
1116 in MPC could result from a dilutive effect as milk protein synthesis was not affected by
1117 supplementing any source of fat including oilseeds in a meta-analysis (Rabiee *et al.*, 2012).

1118 ***b) Strength and reliability of the study***

1119 This study estimated an average daily intake of EL in the field of 297 g/cow/d. Cost of
1120 EL, as well as well-known negative effects of feeding high-fat diets, may restrict the quantity
1121 of EL supplemented in a commercial dairy herd diet. To our knowledge, very few
1122 experimental trials investigated effects of such low intake of EL on milk performance. The
1123 average estimated daily intake in our study was four times lower than in experimental trials
1124 (1 180 g/cow/d) (Meignan *et al.*, 2017). High quantities of EL were supplemented in these
1125 experimental trials because they were mainly designed to study the evolution of milk FA
1126 profile after EL supplementation. The effect of EL on milk performance was seldom
1127 discussed in these trials. Finally, the present study was carried out on a large dataset designed
1128 to detect even small effects of a practical range of EL supplementation on milk performance if
1129 they exist. Indeed, we detected significant effects on milk performance of EL supplementation
1130 in low quantity to dairy cows.

1131 The reference population was composed of cow-TDs recorded in herds that have been
1132 supplemented with EL, but during periods of EL non-supplementation, in order to limit
1133 potential confounding factors due to different herd managements between herds.
1134 Nevertheless, we recognized that the within-herd management may have evolved during this
1135 long study period. A random herd effect was added to account for possible disparities between
1136 herds. Another option could have consisted in selecting cow-TDs from herds that were never
1137 fed EL as the reference population. However, it would have presented many difficulties such
1138 as finding relevant matching criteria to study milk yield. The reference herds would have been
1139 selected based only on geographical area and so probably subjected to high selection bias.

1140 Misclassification bias regarding EL exposure between the reference and exposed cow-
1141 TD within a herd could have occurred as we hypothesized that all lactating cows within a herd
1142 were supplemented with the same quantity of EL whatever their days in milk. Cows in late
1143 lactation were less likely to be fed EL than cows in early and mid lactation. Indeed, a cow-TD

1144 occurring in late lactation could have been classified as exposed whereas the cow was not fed
1145 EL. Consequently, all TDs occurring after 180 days in milk were excluded to limit this bias. A
1146 misclassification bias regarding EL exposure could also have occurred within the exposed
1147 cow-TD in relation to the same hypothesis (i.e., all lactating cows within a herd were
1148 supplemented with the same quantity of EL whatever their MY and days in milk). The true
1149 intake of EL for each cow could have been under or overestimated. Consequently, exposure
1150 levels were defined with broad ranges, based on several farmer's distribution strategies in
1151 field conditions, in order to smooth the effect of this misclassification bias. Finally, clear
1152 dose-dependent associations between EL exposure and milk performance, observed within all
1153 parities, confirmed that very little misclassification bias occurred between EL exposure levels.
1154 A prospective cohort study with a specific design to record diet composition for each group of
1155 cows could increase precision on EL exposure to reduce any intake-related bias. However,
1156 there is still a measurement error between distribution of diet and true intakes by each cow
1157 due to cow variability in feed intake and the competition for access to feeds. Another option
1158 could be the use of biomarkers of specific intake which has growing interest in human
1159 nutritional epidemiological studies (Shim *et al.*, 2014; Naska *et al.*, 2017). The milk ALA
1160 content would be the target biomarker in the present study. Indeed, mid-infrared spectroscopy
1161 is available in routine and at an affordable price to estimate milk FA profile. However, milk
1162 ALA content i) is still not well estimated by mid-infrared spectroscopy (Soyeurt *et al.*, 2011;
1163 Ferrand-Calmels *et al.*, 2014) and ii) is closely dependent on ruminal biohydrogenation and
1164 modulated by other dietary components as grass or alfalfa (Glasser *et al.*, 2013). Whatever the
1165 option chosen to increase the reliability of EL exposure, such cohort studies would be difficult
1166 to carry out because of their cost and lack of practical feasibility.

1167 In conclusion, under field conditions, supplementing EL to dairy cows was associated
1168 with an increase in MY and a moderate decrease in milk fat content. We clearly demonstrated
1169 that large scale epidemiological studies in commercial herds are complementary to
1170 experimental trials in order to quantify the associations between cow nutrition and cow
1171 performance, despite lack of precise data on cow diets. To our knowledge, this is the first time
1172 an association between cow nutrition and milk performance was assessed by this way. Further
1173 study under field conditions exploring the association between EL exposure and other cow
1174 performance such as reproduction is needed to evaluate the profitability of this feeding
1175 practice for dairy farmers.

1176 **7. Acknowledgments**

1177 The authors gratefully acknowledge Chambres d'Agriculture, INRA, organismes de
1178 contrôle de performances et d'insémination artificielle, and organismes de sélection aux
1179 Systèmes Nationaux d'Information Génétique for providing the performance data. The authors
1180 also acknowledge P. Gontier (BIOEPAR, Oniris, Nantes, France) for aggregating deliveries
1181 data. The authors acknowledge Valorex (Combourtillé, France), Terrena (Ancenis, France)
1182 and Association Nationale de la Recherche et de la Technologie (ANRT, Paris, France) for
1183 financial support of T.M. PhD studentship. T.M. is affiliated with Valorex for the sake of
1184 transparency as Valorex is the official PhD employer in the official financing arrangement
1185 Conventions Industrielles de Formation par la Recherche (CIFRE). Two employees of
1186 Valorex, Guillaume Chesneau and Vincent Chatellier, were observers during the study. Data
1187 collection of feed deliveries of feeds containing extruded linseed was performed by Valorex
1188 and 21 companies selling TRADILIN® products. The funders had no role in study design,
1189 data analysis, decision to publish and preparation of the manuscript. The funding agreement
1190 allowed us to independently publish our findings whatever the nature of the results.

1191 T.M., A.M., F.B., and N.B. designed the study. T.M. and A.M. analyzed the data.
1192 T.M., A.M., F.B., C.L., and N.B interpreted results. T.M. and N.B. drafted the manuscript. All
1193 authors revised critically the manuscript for important intellectual content and approved the
1194 final version to be published.

1195 **8. References**

- 1196 Bauman, D.E., and J.M. Griinari. 2003. Nutritional regulation of milk fat synthesis. *Annu.*
1197 *Rev. Nutr.* 23:203–227. doi:10.1146/annurev.nutr.23.011702.073408.
- 1198 Chilliard, Y., and A. Ferlay. 2004. Dietary lipids and forages interactions on cow and goat
1199 milk fatty acid composition and sensory properties. *Reprod. Nutr. Dev.* 44:467–492.
1200 doi:10.1051/rnd:2004052.
- 1201 Chilliard, Y., C. Martin, J. Rouel, and M. Doreau. 2009. Milk fatty acids in dairy cows fed
1202 whole crude linseed, extruded linseed, or linseed oil, and their relationship with methane
1203 output. *J. Dairy Sci.* 92:5199–5211. doi:10.3168/jds.2009-2375.
- 1204 Doreau, M., and A. Ferlay. 2015. Linseed: a valuable feedstuff for ruminants. *OCL.* 22:D611.
1205 doi:10.1051/ocl/2015042.
- 1206 Ferlay, A., M. Doreau, C. Martin, and Y. Chilliard. 2013. Effects of incremental amounts of
1207 extruded linseed on the milk fatty acid composition of dairy cows receiving hay or corn
1208 silage. *J. Dairy Sci.* 96:6577–6595. doi:10.3168/jds.2013-6562.

- 1209 Ferrand-Calmels, M., I. Palhière, M. Brochard, O. Leray, J.M. Astruc, M.R. Aurel, S. Barbey,
1210 F. Bouvier, P. Brunschwig, H. Caillat, M. Douguet, F. Faucon-Lahalle, M. Gelé, G.
1211 Thomas, J.M. Trommenschlager, and H. Larroque. 2014. Prediction of fatty acid profiles
1212 in cow, ewe, and goat milk by mid-infrared spectrometry. *J. Dairy Sci.* 97:17–35.
1213 doi:10.3168/jds.2013-6648.
- 1214 Glasser, F., M. Doreau, G. Maxin, and R. Baumont. 2013. Fat and fatty acid content and
1215 composition of forages: A meta-analysis. *Anim. Feed Sci. Technol.* 185:19–34.
1216 doi:10.1016/j.anifeedsci.2013.06.010.
- 1217 Harvatine, K.J., Y.R. Boisclair, and D.E. Bauman. 2009. Recent advances in the regulation of
1218 milk fat synthesis. *Animal.* 3:40. doi:10.1017/S1751731108003133.
- 1219 Jenkins, T.C. 1997. Success of fat in dairy rations depends on the amount. *Feedstuffs.* 69:11–
1220 12.
- 1221 Kliem, K.E., D.J. Humphries, C.K. Reynolds, R. Morgan, and D.I. Givens. 2017. Effect of
1222 oilseed type on milk fatty acid composition of individual cows, and also bulk tank milk
1223 fatty acid composition from commercial farms. *animal.* 11:354–364.
1224 doi:10.1017/S1751731116001403.
- 1225 Meignan, T., C. Lechartier, G. Chesneau, and N. Bareille. 2017. Effects of feeding extruded
1226 linseed on production performance and milk fatty acid profile in dairy cows: A meta-
1227 analysis. *J. Dairy Sci.* 100:4394–4408. doi:10.3168/jds.2016-11850.
- 1228 Naska, A., A. Lagiou, and P. Lagiou. 2017. Dietary assessment methods in epidemiological
1229 research: current state of the art and future prospects. *F1000Research.* 6:926.
1230 doi:10.12688/f1000research.10703.1.
- 1231 Onetti, S.G., and R.R. Grummer. 2004. Response of lactating cows to three supplemental fat
1232 sources as affected by forage in the diet and stage of lactation: A meta-analysis of
1233 literature. *Anim. Feed Sci. Technol.* 115:65–82. doi:10.1016/j.anifeedsci.2004.02.009.
- 1234 Petit, H. V. 2010. Review: Feed intake, milk production and milk composition of dairy cows
1235 fed flaxseed. *Can. J. Anim. Sci.* 90:115–127. doi:10.4141/CJAS09040.
- 1236 Rabiee, A.R., K. Breinhild, W. Scott, H.M. Golder, E. Block, and I.J. Lean. 2012. Effect of fat
1237 additions to diets of dairy cattle on milk production and components: A meta-analysis
1238 and meta-regression. *J. Dairy Sci.* 95:3225–3247. doi:10.3168/jds.2011-4895.
- 1239 Rajaram, S. 2014. Health benefits of plant-derived α -linolenic acid. *Am. J. Clin. Nutr.*
1240 100:443S–448S. doi:10.3945/ajcn.113.071514.
- 1241 Shim, J.-S., K. Oh, and H.C. Kim. 2014. Dietary assessment methods in epidemiologic
1242 studies. *Epidemiol. Health.* 36:e2014009. doi:10.4178/epih/e2014009.

1243 Shingfield, K.J., L. Bernard, C. Leroux, and Y. Chilliard. 2010. Role of trans fatty acids in the
1244 nutritional regulation of mammary lipogenesis in ruminants. *Animal*. 4:1140–1166.
1245 doi:10.1017/S1751731110000510.

1246 Shingfield, K.J., and J.M. Griinari. 2007. Role of biohydrogenation intermediates in milk fat
1247 depression. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 109:799–816. doi:10.1002/ejlt.200700026.

1248 Simopoulos, A.P. 2008. The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in
1249 cardiovascular disease and other chronic diseases. *Exp. Biol. Med.* 233:674–688.
1250 doi:10.3181/0711-MR-311.

1251 Simopoulos, a. P. 2002. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty
1252 acids. *Biomed. Pharmacother.* 56:365–379. doi:10.1016/S0753-3322(02)00253-6.

1253 Soyeurt, H., F. Dehareng, N. Gengler, S. McParland, E. Wall, D.P. Berry, M. Coffey, and P.
1254 Dardenne. 2011. Mid-infrared prediction of bovine milk fatty acids across multiple
1255 breeds, production systems, and countries. *J. Dairy Sci.* 94:1657–1667.
1256 doi:10.3168/jds.2010-3408.

1257

1258 **Chapitre III. Les effets de l'utilisation de la graine de lin extrudée sur**
1259 **les performances de reproduction et les mammites subcliniques**

1260 **A. Détermination des effets moyens de l'utilisation de la graine de lin**
1261 **extrudée sur les performances de reproduction en conditions commerciales**
1262 **par une étude épidémiologique**

1263 **Does feeding extruded linseed to dairy cows improve reproductive performance in dairy**
1264 **herds? An observational study** (soumis à Theriogenology)

1265 T. Meignan^{a,b}, A. Madouasse^a, F. Beaudeau^a, C. Lechartier^c, N. Bareille^{a,*}

1266 ^a BIOEPAR, INRA, Oniris, La Chantrerie, F-44307 Nantes, France

1267 ^b VALOREX, La Messayais, F-35210 Combourtille, France

1268 ^c Unité de Recherche sur les Systèmes d'Élevage, Univ Bretagne Loire, Ecole Supérieure
1269 d'Agricultures, 55 rue Rabelais, F-49007 Angers, France

1270 *Corresponding author: Nathalie Bareille

1271 BIOEPAR, INRA, Oniris

1272 CS 40706, F-44307 Nantes, France

1273 Tel +33 2 40 68 78 49

1274 E-mail nathalie.bareille@oniris-nantes.fr

1275 **1. Abstract**

1276 Feeding n-3 fatty acids (**FA**) is often cited as a promising strategy to tackle impaired
1277 reproduction in dairy cows. However, the scientific literature shows conflicting results that
1278 may be explained by the nature of n-3 FA used, the amount supplemented and the timing of
1279 supplementation. In addition, designing a proper experimental design to study n-3 FA and
1280 reproduction is subjected to other difficulties such as the choice of the control diet or gaining
1281 enough statistical power. The objective of this retrospective observational study was to
1282 quantify the average effects of supplementing extruded linseed (**EL**), a feed rich in α -linolenic
1283 acid, to dairy cows on reproductive performances under field conditions in French
1284 commercial farms. Exposure measurement to EL feeding was particularly challenging as
1285 exact cow diets are not traced in farms. Therefore, to investigate potential dose-effect
1286 relationship, we defined a proxy of EL intake per day by using deliveries of EL based feeds
1287 from 22 companies in the study period 2008-2015 in France. The reference population was
1288 composed of cows that did not receive EL within herds that were supplied, but not
1289 continuously during the study period. An artificial insemination (**AI**) was considered exposed
1290 only if the cow was supplemented with EL from the calving to 17 days after AI. Mean daily
1291 EL intake in exposed population was 337 (\pm 239.4) g/cow/d. Reproductive performance was
1292 studied on 423,605 AIs from 1,096 herds and 158,125 cows using Cox models for days to
1293 first AI and days to conception, and logistic regression models for risk of return-to-AI,
1294 adjusted for factors likely to influence the reproductive performance and for a herd random
1295 effect. Risk of return-to-AI between 18-78 days after first and second AI did not differ

1296 between exposed and reference populations, but a reduced number of days to first AI (and a
1297 reduced number of days to conception) was observed. The effect on the days to first AI was
1298 higher with the lowest EL intake (HR: 1.13; 95% CI: 1.10, 1.15) than with higher EL intake
1299 levels (HR ranging from 1.06 to 1.07). This original large scale epidemiological study
1300 provides new insights into the effects of feeding EL at a commercially sustainable level to
1301 dairy cows and raises hypothesis on the biological mechanisms involved in the complex
1302 relationship between EL and reproduction.

1303 **Keywords:** dairy cow, extruded linseed, fertility, epidemiological study

1304 **2. Introduction**

1305 The deterioration of the reproductive performance of dairy cows is one of the main
1306 concerns of the modern dairy industry because it is closely linked to the profitability of the
1307 dairy farm [1]. The length and depth of negative energy balance (**NEB**) post-partum are major
1308 risk factors for poor fertility [2,3]. Improving fertility and energy status of the cow by adding
1309 fat to the diet could be a sustainable and cost-effective lever. Indeed, fat supplementation
1310 increases the energy content of the diet. However, large amounts of fat were found
1311 undesirable for the rumen function [4]. Besides, fat supplementation seldom improves the
1312 energy status of the cow [5] and could even aggravate the metabolic pressure on the cow in
1313 early post-partum by stimulating milk production [6]. The impact of supplementing dairy
1314 cows' diet with fat on reproduction still remains inconsistent and conflicting notably due to
1315 the nature of the supplements [6,7].

1316 Targeting some fatty acids (**FA**) in reproductive tissues, in particular n-3
1317 polyunsaturated fatty acids (**PUFA**), could improve reproduction in different ways such as
1318 accelerating the resumption of the post-partum ovarian cyclicity and follicle development, or
1319 by enhancing the quality of the oocyte, embryo and their environment (see reviews by
1320 Gulliver et al. [8] in sheep and cattle and by Wathes et al. [9,10] in mammals). Briefly, n-3
1321 FA were found to be involved in reproductive mechanisms through their essential role in the
1322 composition of cell membranes, through their status of precursors of prostaglandins and
1323 modulators of the expression patterns of enzymes involved in prostaglandins metabolism and
1324 steroidogenesis.

1325 The effect of PUFA has been shown in animals using linseed. Indeed, linseed oil
1326 contains about 55% of α -linolenic acid (**ALA**, 18:3 n-3) [11]. ALA can be converted into the
1327 eicosapentaenoic acid (**EPA**, 20:5 n-3) and docosahexaenoic acid (**DHA**, 22:6 n-3), the long
1328 chain n-3 PUFA. Supplementing EL and encapsulated flaxseed to dairy cows modified FA

1329 profiles of both the plasma and the ovarian compartments (i.e., follicular fluid, granulosa
1330 cells, cumulus-oocyte complexes) [12,13]. An increase in ALA and n-3 FA contents and a
1331 decrease in n-6:n-3 ratio were observed. Thus, linseed supplementation altered the FA profile
1332 in reproductive tissues and could improve the uterine, the oocyte and the embryo
1333 environments. Linseed also contains the plant lignan secoisolariciresinol diglucoside (SDG),
1334 which is metabolized by the rumen flora to the mammalian lignans enterolactone and
1335 enterodiol. This source of phytoestrogens could alter dairy cow reproduction by acting as
1336 estrogen-like molecules and interfering with endogenous sex hormone metabolism [14–16].
1337 Linseed supplementation to dairy cows influences the follicular and corpus luteum
1338 developments. Unlike Petit and Twagiramungu [17], Dirandeh et al. [18] and Jahani-
1339 Moghadam et al. [19] reported a larger ovulatory follicle in cows supplemented with EL than
1340 with protected palm oil. Besides, the corpus luteum was also larger [17,18], but not in cows
1341 supplemented with rolled linseed compared with rolled sunflower seed [20]. The incidence of
1342 cystic follicles in cows supplemented with EL was lower [18,19]. However, supplementing
1343 EL or other forms of linseed scarcely improved reproductive performance in these
1344 experimental trials. The conception and pregnancy rates were not altered by linseed
1345 supplementation in comparison with saturated FA or n-6 FA supplementations [17,19–23]
1346 even if Ambrose et al. [20] observed a trend towards an increase of the conception rate at first
1347 artificial insemination (AI). Pregnancy loss was reduced using whole linseed [17] or rolled
1348 linseed [20]. Finally, the resumption of the ovarian activity, the number of days open and the
1349 interval from calving to pregnancy were not studied or cannot be interpreted due to the
1350 presence of estrus synchronization programs in most of the experiments.

1351 Overall the experimental trials provide insights about the effects of PUFA on
1352 reproductive tissues but show limitations to explore the effects on reproductive performance
1353 at cow level due to their lack of statistical power [10]. Besides, difficulties are observed by
1354 researchers when balancing the treatment groups for a trial studying reproductive performance
1355 because of the numerous parameters influencing the cow fertility. Thus, an epidemiological
1356 work exploring the link between the exposition of dairy cows to EL and their reproductive
1357 performance is needed while considering the potential confounding factors under field
1358 conditions.

1359 The objective of this epidemiological study was to quantify the average effects of
1360 supplementing EL to dairy cows on reproductive performance under field conditions. Material
1361 and methods

1362

3. Material and Methods

1363

a) General study design and available data

1364

1365

1366

1367

1368

1369

1370

1371

1372

1373

1374

1375

1376

1377

1378

1379

1380

1381

1382

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[®] products (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. 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.

1383

1384

1385

1386

1387

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).

1388

b) Estimation of exposure to extruded linseed and determination

1389

of exposure status

1390

1391

1392

1393

1394

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 arrival date of feed in the farm. The daily number

1395 of cows in each herd was calculated based on movements data and test-day records. We
1396 considered that all cows (i.e., whatever lactation stage and milk yield) were supplemented
1397 with the same EL quantity within a herd. When a farmer distributed several feeds containing
1398 EL at the same time, herd daily exposures from each delivery were added. To sum up, at this
1399 step we calculated a mean EL intake by cow by herd for each day of the study period.

1400 Exposure status was determined within a herd at the AI level. An AI was considered
1401 exposed only if the cow was supplemented with EL continuously from calving until 17 days
1402 after AI. Consequently, lactations begun before 1st January 2008 as well as AIs recorded after
1403 14th December 2015 were excluded because of incomplete exposure sequences. For each AI,
1404 an average daily EL exposure during the interval between calving and 17 days after AI was
1405 calculated by adding each daily exposure (from each day in this interval), estimated as
1406 described above, divided by the number of days in this interval. The exposure variable was
1407 categorized into several levels of EL daily intake: 0 (i.e., unexposed),]0,50],]50,300],
1408]300,600] and]600,1500] g/cow/d based on EL use on the field. We considered that estimated
1409 EL daily intakes superior to 1500 g/cow/d (0.32% of final AI database) were inaccurate and
1410 related lactations were removed. Furthermore, in a previous work [24] this value was
1411 considered to be the upper limit of the practical range of EL supplementation to dairy cows
1412 (i.e., 600 g of fat from EL considering 40% of fat in EL). In summary, the exposure variable
1413 accounted for both the dose and minimal time of exposure.

1414 For each herd, all AIs recorded during the study period were considered for the study.
1415 All the AIs that were considered not exposed constituted the unexposed reference population.
1416 This enabled the comparison of reproductive performance within the same herd, thereby
1417 controlling for farming and climatic conditions [25].

1418 *c) Definition of reproductive performance and data selection*

1419 The effect of EL on reproductive performance was assessed using several outcome
1420 variables.

1421 Firstly, the occurrence of a new AI (i.e., a return-to-service (**RTS**)) after a first AI
1422 (dichotomous variable, yes/no) was considered. This indicator was used in several studies
1423 quantifying the effect of a disease on fertility or embryonic losses depending on the time
1424 when the event was observed [26–30]. Three RTS were considered:

1425 (i) a RTS between 18 to 26 days after an AI, which is likely to be associated with
1426 fertilization failure or early embryo loss (**early RTS**).

1427 (ii) a RTS between 27 to 78 days after service, which is likely to be associated with
1428 late embryo (after the stage of maternal recognition of gestation) or fetal (after day 42 of
1429 gestation) loss (**delayed RTS**).

1430 (iii) a RTS between 18 to 78 days after service (**overall RTS**).

1431 Late RTS (after 78 days post-service) was not studied as no scientific literature pointed out a
1432 possible effect of EL on risk of abortion. Only RTS after first and second AI were considered.
1433 Returns to service occurring before a given interval were excluded for the assessment of the
1434 risk of RTS during this interval (i.e., RTS before day 27 were excluded for assessing the risk
1435 of delayed RTS after AI).

1436 Secondly, the time from calving to first AI (**DAI1**; continuous variable) was
1437 considered as a proxy to assess the resumption of cyclicity postpartum and the ability of the
1438 cow to be inseminated.

1439 Finally, the time from calving to conception (days to AI resulting in fertilization of the
1440 oocyte **DAIF**; continuous variable) was considered. The AI was considered successful when
1441 there was no RTS between 18 to 78 days after AI. When the first AI and the AI resulting in
1442 fertilization occurred respectively after 150 or 270 days, DAI1 and DAIF were computed
1443 respectively as being 150 or 270 days.

1444 Data from dairy herds with unusual management (i.e., very small herds, extreme
1445 primiparous cows proportion, systematic delayed first service, use of synchronization
1446 protocols) and suspected to use a breeding bull, as well as data from cows with missing data
1447 (i.e., herd identification, parity, test-day record, insemination, calving date) were excluded
1448 [26,29,31]. Furthermore, data from cows with events not considered plausible and extreme
1449 data were excluded: calving to first test day record >75 d, DAI1 <21 d or >180 d, interval
1450 between two successive AI >200 d or <3 d, AI to calving interval >297 d or <175 d, peak
1451 milk yield (expressed as the maximum at the 3 first test-day records) <10 kg/d, milk protein
1452 content at the second test day record equal to 0. Classification bias can occur when cows are
1453 culled because their pregnancy status is uncertain. Thus cows culled within 200 days after AI
1454 were excluded from the analysis in order not to underestimate the risk of RTS. Data from
1455 nulliparous cows were excluded because of the lack of information about EL supplementation
1456 and so exposure status during their pregnancy. Only data from Holstein cows were included
1457 because of the strong effect of breed on reproductive performance [32,33]. This data selection
1458 reduced sample size to 1,096 herds.

1459

d) Statistical models

1460 The statistical unit to study RTS was the AI. The effect of EL exposure on the risk of
 1461 RTS was assessed using logistic mixed regression model. To account for factors likely to
 1462 influence the risk of RTS, this association was adjusted for several independent variables [26–
 1463 29,31,34]: calving to AI interval (10 levels), year of AI (8 levels), month of AI (12 levels),
 1464 rank of AI (1 or 2), semen from Holstein bull (yes/no), semen sexing (yes/no and one
 1465 accounting for missing data), parity (4 levels), calving ease (4 levels from easy to cesarian
 1466 section and one accounting for missing data), peak milk yield (7 levels), milk protein content
 1467 at second test day record (7 levels), and geographical area (7 levels). A herd random effect
 1468 was also added in the model to take into account in particular diseases and feeding
 1469 management differences between herds:

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

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

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

1470

1471 where $Y_{ijt} = 1$ when a RTS occurred in interval t for a cow i in herd j and 0 otherwise, $\alpha =$
 1472 intercept, X_{ijt} = matrix of predictors including exposure status with β the vector of
 1473 associated regression parameters, v_j = herd j random effect.

1474 Odds-ratios were converted into relative risks (RR) using the formula from Beaudou
 1475 and Fourichon [35].

1476 The statistical units to study respectively DAI1 and DAIF were respectively the first
 1477 AI and the successful AI. The effects of EL exposure on the DAI1 and DAIF were assessed
 1478 using multivariable proportional hazards Cox models. The association between EL exposure
 1479 and each outcome was adjusted for the same factors used to study RTS, except that the factors
 1480 rank of AI, semen from Holstein bull, semen sexing and calving to AI interval for DAI1, rank
 1481 of AI and calving to AI interval for DAIF, were obviously removed from the models. A herd
 1482 random effect (frailty term) assuming a gamma distribution [36] was added to the models to
 1483 take into account health and management differences between herds:

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

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

1484

1485 where $\lambda_0(t)$ = baseline hazard function, Z_{ij} = matrix of predictors including exposure status
1486 with β the vector of associated regression parameters, w_j = herd j random effect.

1487 All statistical analyses were performed in R (version 3.3.2) [37] using the function
1488 glmer from the package lme4 (version 1.1-12) and the function coxph from the package
1489 survival (version 2.40-1).

1490 **4. Results**

1491 ***a) Descriptive results***

1492 The final sample was composed of 1,096 herds, 158,125 cows, and 423,605 AIs
1493 (Table 3.1). Almost half of the AIs were unexposed. More than 78% of the exposed AIs were
1494 at levels]50, 300] or]300, 600] g/cow/d whatever the reproductive outcome considered.
1495 Mean daily EL intake in exposed population was 337 (\pm 239.4) g/cow/d. Rates of early RTS,
1496 delayed RTS, and overall RTS were respectively 22.6%, 33.3% and 48.4% in the reference
1497 population, and respectively 24.0%, 33.2% and 49.2% in the whole exposed population
1498 (Table 3.1). Calving-to-first AI interval and calving-to-conception interval were respectively
1499 91 (\pm 28.2) d and 110 (\pm 42.0) d in the reference population, and respectively 90 (\pm 27.9) d and
1500 107 (\pm 40.8) in the whole exposed population (Table 3.1).

1501 ***b) Return rates were not associated with exposure to extruded 1502 linseed***

1503 Overall RTS did not differ between the reference population and the exposed
1504 population (Table 3.2). Very low level of EL exposure (i.e., <50 g/cow/d from calving to
1505 17 days after AI) was not associated with early or delayed RTS. Other levels of exposure to
1506 EL were slightly associated with increased risk of early RTS (RR from 1.02 to 1.04) and with
1507 decreased risk of delayed RTS (RR from 0.95 to 0.96) (Table 3.2). No clear dose-dependent
1508 relationships within EL exposure levels were observed (Table 3.2).

1509 ***c) Earlier days to first AI and to conception associated with 1510 exposure to extruded linseed***

1511 Exposure to EL was associated with reduced DAI1 and reduced DAIF (Table 3.3).
1512 Very low level of EL exposure was associated with the highest reduction in DAI1 and DAIF
1513 (HR = 1.14 and HR = 1.19) compared to other levels of exposure.

1514 *d) Adjustment variables associated with reproductive*
1515 *performance*

1516 The magnitude of the association between RTS and the adjustment variables varied
1517 according to early or delayed RTS (Table 3.4), but not its direction (except for parity 3).
1518 Dystocia was strongly associated with increased risk of early and delayed RTS, as well as
1519 sexing semen and Holstein semen. As expected, increased calving-to-AI interval was
1520 positively associated with decreased risk of RTS, whereas increased peak milk yield was
1521 positively associated with increased risk of RTS (Table 3.4). Increased peak milk yield and
1522 decreased MPC at 2nd test day record were also associated with increased DAI1 and DAIF
1523 (Table 3.5). Strong associations of the dystocia with DAI1 and DAIF, and sexing semen and
1524 Holstein bull with DAIF were also observed (Table 3.5). Finally, inseminating in spring and
1525 early summer was associated with early and delayed RTS, as well as increased days open
1526 (Table 3.4, Table 3.5).

1527

1528 **Table 3.1** Return-to-service (**RTS**) rates, time from calving to first AI (**DAI1**) and time from calving to conception (**DAIF**) according to extruded linseed
 1529 (**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 ¹				
		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) ²	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) ³	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

1530 ¹Exposure status was defined by average daily intake of EL per cow per day during the interval from calving to 17 days after AI.

1531 ²Mean and SD were calculated including censored AI1 with their calving-to-first AI interval fixed at 150 days.

1532 ³Mean and SD were calculated including censored AIF with their calving-to-conception interval fixed at 270 days.

1533

1534 **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
 1535 period January 2008 to December 2015 (n = 423,605 AI from 158,125 cows).

Extruded linseed exposure status ¹	Interval of return								
	18 to 26 d			27 to 78 d			18 to 78 d		
	RR ²	95% CI ³	P ⁴	RR	95% CI	P	RR	95% CI	P
Unexposed	1	Ref ⁵		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

1536 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
 1537 of return 18 to 26, 27 to 78 and 18 to 78 days.

1538 ¹Exposure status was defined by average daily intake of EL per cow per day during the interval from calving to 17 days after AI.

1539 ²RR = 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
 1540 (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
 1541 levels), milk protein content at second test day record (7 levels), geographical area (7 levels) and herd random effect.

1542 ³CI = confidence interval.

1543 ⁴P = P-value.

1544 ⁵Ref = Reference.

1545

1546 **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
 1547 extruded linseed exposure status in 1096 French Holstein dairy herds during the study period January 2008 to December 2015 (respectively, n = 277,948 AI1
 1548 from 156,203 cows and n = 216,940 AIF from 129,215 cows).

Extruded linseed exposure status ¹	DAI1 (d)			DAIF (d)		
	HR ²	95% CI ³	P ⁴	HR	95% CI	P
Unexposed	1	Ref ⁵		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

1549 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.

1550 ¹Exposure status was defined by average daily intake of EL per cow per day during the interval from calving to 17 days after AI.

1551 ²HR = 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
 1552 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
 1553 from Holstein bull (yes/no), semen sexing (yes/no and missing data) for DAIF.

1554 ³CI = confidence interval.

1555 ⁴P = P-value.

1556 ⁵Ref = Reference.

1557

1558 **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
 1559 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 ⁴
	18 to 26 d			27 to 78 d			18 to 78 d			
	RR ¹	95% CI ²	P ³	RR	95% CI	P	RR	95% CI	P	
Parity										
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 ⁵		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
Difficulty of last calving										
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
Peak milk yield (kg/d)										
≥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
MPC at 2nd TD record (g/kg)										
≥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

1561

1562 ¹RR = relative risk adjusted for EL exposure status in addition to all adjustment variables.

1563 ²CI = confidence interval.

1564 ³P = P-value.

1565 ⁴Number of AI used for intervals of return 18 to 26 days and 18 to 78 days.

1566 ⁵Ref = Reference.

1567

1568 **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
 1569 according to the extruded linseed exposure status in 1096 French Holstein dairy herds during the study period January 2008 to December 2015 (respectively, n
 1570 = 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 ¹	95% CI ²	P ³		HR	95% CI	P	
Parity								
1	1.05	1.03; 1.06	<0.001	107,075	1.03	1.02; 1.04	<0.001	86,316
2	1	Ref ⁴		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
Difficulty of last calving								
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
Peak milk yield (kg/d)								
≥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
MPC at 2nd TD record (g/kg)								
≥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

1571

1572

1573

1574

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

1575 ¹HR = hazard ratio adjusted for EL exposure status in addition to all adjustment variables.

1576 ²CI = confidence interval.

1577 ³P = P-value.

1578 ⁴Ref = Reference.

1579

1580

5. Discussion

1581

1582

1583

1584

1585

1586

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.

1587

1588

1589

1590

1591

1592

1593

1594

1595

1596

1597

1598

1599

1600

1601

1602

1603

1604

1605

1606

1607

1608

1609

1610

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 [19]. 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 [17] or rolled linseed [20]. 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.[12] and Moallem et al. [38] 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. [39] 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. [40] 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. [6] 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.

1611

1612

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

1613 1181 (\pm 742.5) g/cow/d in 29 treatment diets from 21 trials studying EL and production
1614 performance [24], and to 826 g/cow/d, 1700 g/cow/d and 1745 g/cow/d in three trials studying
1615 EL and reproductive performance [13,19,21]. Thus, we lack knowledge to comment on the
1616 largest magnitude of the association between DAI1 or DIAF and EL exposure with the lowest
1617 intake of EL (<50 g of EL, <11 g of ALA). Such low level of ALA supplementation was not
1618 studied previously in the literature, but two studies found huge beneficial effects of low
1619 intakes of other PUFA. Sinedino et al. [41] in a study conducted with 739 lactating cows
1620 showed a very strong effect of supplementing an algae product containing 10 g of DHA on
1621 reproductive performance with reduction in the days-to-pregnancy interval of 22 days. De
1622 Veth et al. [42] in a multi-study analysis, predicted an optimal effect of conjugated linoleic
1623 acid on time to first ovulation (-8 d) and time to conception (-34 d) at a quantity from 8 to
1624 10 g/d. In light of these elements, there is need for experimental trials to focus on EL
1625 supplementation in a range observed under field conditions to strengthen our results obtained
1626 with low EL supplementation.

1627 Our study was, to our knowledge, the first one exploring a dose-dependent association
1628 of reproductive performance with EL or n-3 FA. In the present study, the dose-dependent
1629 relationship was far from being linear: no effect was demonstrated on risk of RTS and a quite
1630 constant positive effect was observed on DAI1 and DAIF. Besides, contrary to other exposure
1631 levels, the lowest level of EL intake was not associated with early and delayed RTS, whereas
1632 its association with reduced DAI1 or DIAF was of larger magnitude than other exposure
1633 levels. Yet, linear dose-dependent associations between intake of EL and other dairy cows
1634 production traits were reported: milk FA profile [24], enteric methane emission [43], and milk
1635 yield and milk contents (Meignan et al., under review). Interestingly, this latter study was
1636 based on the same initial dataset than the one used in the present study. Estimated daily milk
1637 yield increased with increased estimated EL daily intake compared to the daily milk yield of
1638 the reference population: respectively +0.00, +0.59, +0.90 and +1.13 kg/d with an EL intake
1639 of]0, 50],]50, 300],]300, 600] and]600, 1500] g/cow/d considering a second parity Holstein
1640 cow. Milk yield and negative energy balance (**NEB**) are known to negatively influence the
1641 return to ovarian cyclicity and the estrous behavior [44–46], and the oocyte and embryo
1642 quality [47]. Therefore, milk yield could act as a confounding factor and/or an explanatory
1643 factor on the association between EL exposure and reproductive performances. Here, the
1644 estimates of reproductive performances were adjusted for peak milk yield in order to take into
1645 account both milk yield and level of NEB. High peak milk yield was associated with an
1646 increased risk of overall RTS and increased DAI1 and DAIF. However, the way we adjusted

1647 for milk yield (using a discrete variable with categories of 5kg-range) did not allow to fully
1648 account for the concomitant association between milk yield and EL supplementation (of 0.6 to
1649 1.1 kg/d) while estimating the effects on reproductive performances. Another explanation for
1650 this non-linear effect of the EL supplementation could be that the antagonistic biological
1651 effect of PUFA depending on their concentration. For example, long-chain n-3 FA could act
1652 rather as pro- or anti-oxidant agents depending on the level used [48].

1653 Several biological processes could have been involved in the alteration of reproductive
1654 performances with EL supplementation. Indeed, EL contains ALA and lignans which could
1655 alter reproductive tissues. Firstly, EL supplementation, even at low levels, could alter FA
1656 profile and lignan content in ovarian compartments. It is well-know that specific FA dietary
1657 supplementation altered the FA profile in ovarian compartments [6]. Indeed, supplementing
1658 encapsulated linseed or EL increased ALA content, decrease arachidonic acid (**ARA**, 20:4 n-
1659 6), and decreased n-6:n-3 ratio in plasma, follicles follicular fluid and granulosa cells, and
1660 cumulus-oocyte complexes [12,13,38]. Besides, supplementing whole linseed increased
1661 enterolactone in milk [49] and supplementing EL increased enterolactone in follicular fluid of
1662 pre-ovulatory follicles which was correlated to intrafollicular estradiol concentration and
1663 estradiol-to-progesterone ratio [50]. Secondly, supplementing EL may have stimulated
1664 follicular development (resulting in shorter DAI), and estrous behavior (resulting in more
1665 returns within the interval 18 to 26 days and less in the interval 27 to 78 days) through its
1666 ALA and lignan contents. Extensively reviewed by Gulliver et al. [8], Wathes et al. [10] and
1667 Leroy et al. [6], n-3 FA increased the number of follicles, the size of the dominant follicle and
1668 its production of estradiol. It is important to emphasize that EL could interfere in follicular
1669 steroidogenesis by its ALA content but also by its lignan content [50]. Earlier ovulation after
1670 calving with PUFA supplementation seem also a consistent finding [10], even if the biological
1671 mechanism is not understood. However, n-3 FA could also delay onset of estrus through
1672 inhibition of PGF_{2α} and PGE₂ [8]. Wathes et al. [10] stated that n-3 FA reduced production of
1673 PGE₂, leading to larger follicles producing more estradiol, the latter being closely related to
1674 estrus expression [51]. Very little is known about the effect of ALA and lignan on estrous
1675 behavior and duration. However, Zachut et al. [13] observed a longer duration and greater
1676 intensity of behavioral estrus in cows supplemented with EL compared to cows supplemented
1677 with calcium salts of palm oil distillate, as well as longer estradiol surge. Third,
1678 supplementing EL could also reduce reproductive health disorders early postpartum as Jahani-
1679 Moghadam [19] observed a reduction in the incidence of cystic follicles which is associated
1680 with a reduced number DAI1 [52]. Extruded linseed through its ALA and lignan contents

1681 could in particular prevent oxidative stress and could modulate inflammation response [53–
1682 55]. Finally, decreased risk in delayed RTS could be partly explained by better embryo
1683 survival due to the inhibition of PGF_{2α} endometrial secretion [8].

1684 **6. Conclusions**

1685 Under field conditions, supplementing EL to dairy cows was associated with reduced
1686 number of days to first AI and days to conception but was not associated with overall risk of
1687 return-to-service. To our knowledge, this is the first time that an association between cow
1688 nutrition and reproductive performances was assessed by a large-scale retrospective
1689 observational study. Further experimental trials using low levels of EL and at proper timing
1690 are still needed to fully understand underlying biological mechanisms associated with ALA,
1691 phytoestrogens, antioxydants and dairy cow reproduction.

1692 **7. Acknowledgments**

1693 The authors gratefully acknowledge Chambres d'Agriculture, INRA, organismes de
1694 contrôle de performances et d'insémination artificielle, and organismes de sélection aux
1695 Systèmes Nationaux d'Information Génétique for providing the performance data. The authors
1696 also acknowledge P. Gontier (BIOEPAR, Oniris, Nantes, France) for aggregating deliveries
1697 data. This work was supported by Valorex, Combourtillé, France; Terrena, Ancenis, France;
1698 and Association Nationale de la Recherche et de la Technologie (ANRT), Paris, France. T.M.
1699 is affiliated with Valorex for the sake of transparency as Valorex is the official PhD employer
1700 in the official financing arrangement Conventions Industrielles de Formation par la Recherche
1701 (CIFRE). Two employees of Valorex, Guillaume Chesneau and Vincent Chatellier, were
1702 observers during the study. Data collection of feed deliveries of feeds containing extruded
1703 linseed was performed by Valorex and 21 companies selling TRADILIN[®] products. The
1704 funders had no role in study design, data analysis, decision to publish and preparation of the
1705 manuscript. The funding agreement allowed us to independently publish our findings
1706 whatever the nature of the results.

1707 T.M., A.M., F.B., and N.B. designed the study. T.M. and A.M. analyzed the data. T.M., A.M.,
1708 F.B., C.L., and N.B interpreted results. T.M. and N.B. drafted the manuscript. All authors
1709 revised critically the manuscript for important intellectual content and approved the final
1710 version to be published.

1711 **8. References**

1712 [1] Inchaisri C, Jorritsma R, Vos PLAM, van der Weijden GC, Hogeveen H. Economic

- 1713 consequences of reproductive performance in dairy cattle. *Theriogenology*
1714 2010;74:835–46. doi:10.1016/j.theriogenology.2010.04.008.
- 1715 [2] Butler WR. Energy balance relationships with follicular development ovulation and
1716 fertility in postpartum dairy cows. *Livest Prod Sci* 2003;83:211–8. doi:10.1016/S0301-
1717 6226(03)00112-X.
- 1718 [3] Walsh SW, Williams EJ, Evans ACO. A review of the causes of poor fertility in high
1719 milk producing dairy cows. *Anim Reprod Sci* 2011;123:127–38.
1720 doi:10.1016/j.anireprosci.2010.12.001.
- 1721 [4] Palmquist DL, Jenkins TC. Fat in Lactation Rations: Review. *J Dairy Sci* 1980;63:1–
1722 14. doi:10.3168/jds.S0022-0302(80)82881-5.
- 1723 [5] Staples CR, Burke JM, Thatcher WW. Influence of Supplemental Fats on Reproductive
1724 Tissues and Performance of Lactating Cows. *J Dairy Sci* 1998;81:856–71.
1725 doi:10.3168/jds.S0022-0302(98)75644-9.
- 1726 [6] Leroy J, Sturmey R, Van Hoeck V, De Bie J, McKeegan P, Bols P. Dietary Fat
1727 Supplementation and the Consequences for Oocyte and Embryo Quality: Hype or
1728 Significant Benefit for Dairy Cow Reproduction? *Reprod Domest Anim* 2014;49:353–
1729 61. doi:10.1111/rda.12308.
- 1730 [7] Santos J, Bilby T, Thatcher W, Staples C, Silvestre F. Long Chain Fatty Acids of Diet
1731 as Factors Influencing Reproduction in Cattle. *Reprod Domest Anim* 2008;43:23–30.
1732 doi:10.1111/j.1439-0531.2008.01139.x.
- 1733 [8] Gulliver CE, Friend M a., King BJ, Clayton EH. The role of omega-3 polyunsaturated
1734 fatty acids in reproduction of sheep and cattle. *Anim Reprod Sci* 2012;131:9–22.
1735 doi:10.1016/j.anireprosci.2012.02.002.
- 1736 [9] Wathes DC, Abayasekara DRE, Aitken RJ. Polyunsaturated fatty acids in male and
1737 female reproduction. *Biol Reprod* 2007;77:190–201.
1738 doi:10.1095/biolreprod.107.060558.
- 1739 [10] Wathes D, Cheng Z, Marei W, Fouladi-Nashta A. Polyunsaturated fatty acids and
1740 fertility in female mammals: an update. *CAB Rev Perspect Agric Vet Sci Nutr Nat*
1741 *Resour* 2013;8:1–14. doi:10.1079/PAVSNR20138041.
- 1742 [11] Petit H V. Review: Feed intake, milk production and milk composition of dairy cows
1743 fed flaxseed. *Can J Anim Sci* 2010;90:115–27. doi:10.4141/CJAS09040.
- 1744 [12] Zachut M, Dekel I, Lehrer H, Arieli A, Arav A, Livshitz L, et al. Effects of dietary fats
1745 differing in n-6:n-3 ratio fed to high-yielding dairy cows on fatty acid composition of
1746 ovarian compartments, follicular status, and oocyte quality. *J Dairy Sci* 2010;93:529–

- 1747 45. doi:10.3168/jds.2009-2167.
- 1748 [13] Zachut M, Arieli A, Moallem U. Incorporation of dietary n-3 fatty acids into ovarian
1749 compartments in dairy cows and the effects on hormonal and behavioral patterns
1750 around estrus. *Reproduction* 2011;141:833–40. doi:10.1530/REP-10-0518.
- 1751 [14] Landete JM. Plant and mammalian lignans: A review of source, intake, metabolism,
1752 intestinal bacteria and health. *Food Res Int* 2012;46:410–24.
1753 doi:10.1016/j.foodres.2011.12.023.
- 1754 [15] Pierson LM, Ferkin MH. The impact of phytoestrogens on sexual behavior and
1755 cognition in rodents. *Mamm Biol* 2015;80:148–54. doi:10.1016/j.mambio.2014.11.006.
- 1756 [16] Kiyama R. Biological effects induced by estrogenic activity of lignans. *Trends Food
1757 Sci Technol* 2016;54:186–96. doi:10.1016/j.tifs.2016.06.007.
- 1758 [17] Petit HV, Twagiramungu H. Conception rate and reproductive function of dairy cows
1759 fed different fat sources. *Theriogenology* 2006;66:1316–24.
1760 doi:10.1016/j.theriogenology.2006.04.029.
- 1761 [18] Dirandeh E, Towhidi A, Ansari Pirsaraei Z, Adib Hashemi F, Ganjkanlou M,
1762 Zeinoaldini S, et al. Plasma concentrations of PGFM and uterine and ovarian responses
1763 in early lactation dairy cows fed omega-3 and omega-6 fatty acids. *Theriogenology*
1764 2013;80:131–7. doi:10.1016/j.theriogenology.2013.03.012.
- 1765 [19] Jahani-Moghadam M, Mahjoubi E, Dirandeh E. Effect of linseed feeding on blood
1766 metabolites, incidence of cystic follicles, and productive and reproductive performance
1767 in fresh Holstein dairy cows. *J Dairy Sci* 2015;98:1828–35. doi:10.3168/jds.2014-8789.
- 1768 [20] Ambrose DJ, Kastelic JP, Corbett R, Pitney PA, Petit HV, Small JA, et al. Lower
1769 Pregnancy Losses in Lactating Dairy Cows Fed a Diet Enriched in α -Linolenic Acid. *J
1770 Dairy Sci* 2006;89:3066–74. doi:10.3168/jds.S0022-0302(06)72581-4.
- 1771 [21] Fuentes MC, Calsamiglia S, Sánchez C, González A, Newbold JR, Santos JEP, et al.
1772 Effect of extruded linseed on productive and reproductive performance of lactating
1773 dairy cows. *Livest Sci* 2008;113:144–54. doi:10.1016/j.livsci.2007.03.005.
- 1774 [22] Bork NR, Schroeder JW, Lardy GP, Vonnahme KA, Bauer ML, Buchanan DS, et al.
1775 Effect of feeding rolled flaxseed on milk fatty acid profiles and reproductive
1776 performance of dairy cows. *J Anim Sci* 2010;88:3739–48. doi:10.2527/jas.2010-2841.
- 1777 [23] Dirandeh E, Towhidi A, Zeinoaldini S, Ganjkanlou M, Ansari Pirsaraei Z, Fouladi-
1778 Nashta A. Effects of different polyunsaturated fatty acid supplementations during the
1779 postpartum periods of early lactating dairy cows on milk yield, metabolic responses,
1780 and reproductive performances. *J Anim Sci* 2013;91:713–21. doi:10.2527/jas.2012-

- 1781 5359.
- 1782 [24] Meignan T, Lechartier C, Chesneau G, Bareille N. Effects of feeding extruded linseed
1783 on production performance and milk fatty acid profile in dairy cows: A meta-analysis. *J*
1784 *Dairy Sci* 2017;100:4394–408. doi:10.3168/jds.2016-11850.
- 1785 [25] Nusinovici S, Souty C, Seegers H, Beaudeau F, Fourichon C. Decrease in milk yield
1786 associated with exposure to bluetongue virus serotype 8 in cattle herds. *J Dairy Sci*
1787 2013;96:877–88. doi:10.3168/jds.2012-5800.
- 1788 [26] Robert A, Beaudeau F, Seegers H, Joly A, Philipot J. Large scale assessment of the
1789 effect associated with bovine viral diarrhoea virus infection on fertility of dairy cows in
1790 6149 dairy herds in Brittany (Western France). *Theriogenology* 2004;61:117–27.
1791 doi:10.1016/S0093-691X(03)00182-1.
- 1792 [27] Malher X, Beaudeau F, Philipot JM. Effects of sire and dam genotype for complex
1793 vertebral malformation (CVM) on risk of return-to-service in Holstein dairy cows and
1794 heifers. *Theriogenology* 2006;65:1215–25. doi:10.1016/j.theriogenology.2005.08.003.
- 1795 [28] Marcé C, Beaudeau F, Bareille N, Seegers H, Fourichon C. Higher non-return rate
1796 associated with *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis infection at early
1797 stage in Holstein dairy cows. *Theriogenology* 2009;71:807–16.
1798 doi:10.1016/j.theriogenology.2008.10.017.
- 1799 [29] Nusinovici S, Seegers H, Joly A, Beaudeau F, Fourichon C. Quantification and at-risk
1800 period of decreased fertility associated with exposure to bluetongue virus serotype 8 in
1801 naïve dairy herds. *J Dairy Sci* 2012;95:3008–20. doi:10.3168/jds.2011-4799.
- 1802 [30] Marceau A, Madouasse A, Lehébel A, van Schaik G, Veldhuis A, Van der Stede Y, et
1803 al. Can routinely recorded reproductive events be used as indicators of disease
1804 emergence in dairy cattle? An evaluation of 5 indicators during the emergence of
1805 bluetongue virus in France in 2007 and 2008. *J Dairy Sci* 2014;97:6135–50.
1806 doi:10.3168/jds.2013-7346.
- 1807 [31] Seegers H, Coulon R, Beaudeau F, Fouchet M, Quillet JM. Factors associated with
1808 variation in occurrence of different types of return-inseminations in dairy herds.
1809 *Rencontres autour des Rech. sur les ruminants*, vol. 8, Paris: 2001, p. 357–60.
- 1810 [32] Bedere N, Disenhaus C, Ducrocq V, Leurent-Colette S, Delaby L. Ability of dairy
1811 cows to ensure pregnancy according to breed and genetic merit for production traits
1812 under contrasted pasture-based systems. *J Dairy Sci* 2017;100:2812–27.
1813 doi:10.3168/jds.2016-11588.
- 1814 [33] Bedere N, Disenhaus C, Ducrocq V, Leurent-Colette S, Delaby L. Ability of dairy

- 1815 cows to be inseminated according to breed and genetic merit for production traits under
1816 contrasting pasture-based feeding systems. *Animal* 2017;11:826–35.
1817 doi:10.1017/S1751731116002111.
- 1818 [34] Gröhn YT, Rajala-Schultz PJ. Epidemiology of reproductive performance in dairy
1819 cows. *Anim Reprod Sci* 2000;60–61:605–14. doi:10.1016/S0378-4320(00)00085-3.
- 1820 [35] Beaudeau F, Fourichon C. Estimating relative risk of disease from outputs of logistic
1821 regression when the disease is not rare. *Prev Vet Med* 1998;36:243–56.
1822 doi:10.1016/S0167-5877(98)00095-6.
- 1823 [36] Ducrocq V, Casella G. A Bayesian analysis of mixed survival models. *Genet Sel Evol*
1824 1996;28:505–29. doi:10.1186/1297-9686-28-6-505.
- 1825 [37] R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. Vienna,
1826 Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2016.
- 1827 [38] Moallem U, Shafran A, Zachut M, Dekel I, Portnick Y, Arieli A. Dietary α -linolenic
1828 acid from flaxseed oil improved folliculogenesis and IVF performance in dairy cows,
1829 similar to eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids from fish oil. *Reproduction*
1830 2013;146:603–14. doi:10.1530/REP-13-0244.
- 1831 [39] Thangavelu G, Colazo MG, Ambrose DJ, Oba M, Okine EK, Dyck MK. Diets enriched
1832 in unsaturated fatty acids enhance early embryonic development in lactating Holstein
1833 cows. *Theriogenology* 2007;68:949–57. doi:10.1016/j.theriogenology.2007.07.002.
- 1834 [40] Petit HV, Cavalieri FB, Santos GTD, Morgan J, Sharpe P. Quality of Embryos
1835 Produced From Dairy Cows Fed Whole Flaxseed and the Success of Embryo Transfer.
1836 *J Dairy Sci* 2008;91:1786–90. doi:10.3168/jds.2007-0782.
- 1837 [41] Sinedino LDP, Honda PM, Souza LRL, Lock AL, Boland MP, Staples CR, et al.
1838 Effects of supplementation with docosahexaenoic acid on reproduction of dairy cows.
1839 *Reproduction* 2017;153:707–23. doi:10.1530/REP-16-0642.
- 1840 [42] de Veth MJ, Bauman DE, Koch W, Mann GE, Pfeiffer AM, Butler WR. Efficacy of
1841 conjugated linoleic acid for improving reproduction: A multi-study analysis in early-
1842 lactation dairy cows. *J Dairy Sci* 2009;92:2662–9. doi:10.3168/jds.2008-1845.
- 1843 [43] Martin C, Ferlay A, Mosoni P, Rochette Y, Chilliard Y, Doreau M. Increasing linseed
1844 supply in dairy cow diets based on hay or corn silage: Effect on enteric methane
1845 emission, rumen microbial fermentation, and digestion. *J Dairy Sci* 2016;99:3445–56.
1846 doi:10.3168/jds.2015-10110.
- 1847 [44] Lopez H, Satter L., Wiltbank M. Relationship between level of milk production and
1848 estrous behavior of lactating dairy cows. *Anim Reprod Sci* 2004;81:209–23.

- 1849 doi:10.1016/j.anireprosci.2003.10.009.
- 1850 [45] Dobson H, Smith R, Royal M, Knight C, Sheldon I. The High-producing Dairy Cow
1851 and its Reproductive Performance. *Reprod Domest Anim* 2007;42:17–23.
1852 doi:10.1111/j.1439-0531.2007.00906.x.
- 1853 [46] Cutullic E, Delaby L, Causeur D, Michel G, Disenhaus C. Hierarchy of factors
1854 affecting behavioural signs used for oestrus detection of Holstein and Normande dairy
1855 cows in a seasonal calving system. *Anim Reprod Sci* 2009;113:22–37.
1856 doi:10.1016/j.anireprosci.2008.07.001.
- 1857 [47] Leroy J, Opsomer G, Van Soom A, Goovaerts I, Bols P. Reduced Fertility in High-
1858 yielding Dairy Cows: Are the Oocyte and Embryo in Danger? Part I: The Importance
1859 of Negative Energy Balance and Altered Corpus Luteum Function to the Reduction of
1860 Oocyte and Embryo Quality in High-yielding Dairy Cows. *Reprod Domest Anim*
1861 2008;43:612–22. doi:10.1111/j.1439-0531.2007.00960.x.
- 1862 [48] Giordano E, Visioli F. Long-chain omega 3 fatty acids: Molecular bases of potential
1863 antioxidant actions. *Prostaglandins, Leukot Essent Fat Acids* 2014;90:1–4.
1864 doi:10.1016/j.plefa.2013.11.002.
- 1865 [49] Petit H V, Gagnon N. Concentration of the mammalian lignans enterolactone and
1866 enterodiol in milk of cows fed diets containing different concentrations of whole
1867 flaxseed. *Animal* 2009;3. doi:10.1017/S1751731109990346.
- 1868 [50] Zachut M. Short communication: Concentrations of the mammalian lignan
1869 enterolactone in preovulatory follicles and the correlation with intrafollicular estradiol
1870 in dairy cows fed extruded flaxseed. *J Dairy Sci* 2015;98:8814–7.
1871 doi:10.3168/jds.2015-9699.
- 1872 [51] Perry GA, Swanson OL, Larimore EL, Perry BL, Djira GD, Cushman RA.
1873 Relationship of follicle size and concentrations of estradiol among cows exhibiting or
1874 not exhibiting estrus during a fixed-time AI protocol. *Domest Anim Endocrinol*
1875 2014;48:15–20. doi:10.1016/j.domaniend.2014.02.001.
- 1876 [52] Fourichon C, Seegers H, Malher X. Effect of disease on reproduction in the dairy cow:
1877 a meta-analysis. *Theriogenology* 2000;53:1729–59. doi:10.1016/S0093-
1878 691X(00)00311-3.
- 1879 [53] Petit H V. Antioxidants and dairy production: the example of flax. *Rev Bras Zootec*
1880 2009;38:352–61. doi:10.1590/S1516-35982009001300035.
- 1881 [54] Friggens NC, Disenhaus C, Petit H V. Nutritional sub-fertility in the dairy cow:
1882 towards improved reproductive management through a better biological understanding.

1883 *Animal* 2010;4:1197–213. doi:10.1017/S1751731109991601.
1884 [55] Mavangira V, Sordillo LM. Role of lipid mediators in the regulation of oxidative stress
1885 and inflammatory responses in dairy cattle. *Res Vet Sci* 2017:0–1.
1886 doi:10.1016/j.rvsc.2017.08.002.
1887

1888 **B. Détermination des effets moyens de l'utilisation de la graine de lin**
1889 **extrudée sur l'incidence et la persistance des mammites subcliniques en**
1890 **conditions commerciales par une étude épidémiologique**

1891 **1. Introduction**

1892 Comme évoqué en introduction générale, les AGPI n-6 (AA) et n-3 (ALA, EPA,
1893 DHA) à l'origine de la formation des oxylipides sont susceptibles de moduler la réponse
1894 inflammatoire des animaux (Mavangira and Sordillo, 2017). La supplémentation en AGPI n-3
1895 pourrait, en agissant en autres sur la synthèse des oxylipides à propriétés anti-inflammatoires,
1896 modifier la réponse inflammatoire lors d'infections intra-mammaires (Ryman et al., 2017).
1897 Cependant, compte tenu de la littérature scientifique très récente et de la complexité des
1898 mécanismes biologiques sous-jacents, il serait présomptueux d'émettre une hypothèse d'effet
1899 bénéfique de la supplémentation en GLE sur les maladies à composante infectieuse des
1900 bovins. Nous avons toutefois tenu à explorer cette piste avec les données sanitaires à notre
1901 disposition issues de l'étude épidémiologique : la concentration en cellules somatiques du lait
1902 (CCS) le jour du contrôle laitier (CL).

1903 Le terme « cellules somatiques du lait » signifie cellules appartenant au corps de
1904 l'animal (soma en grec signifie corps) et présentes dans le lait (Schalm and Lasmanis, 1968).
1905 Elles sont divisées en deux grands groupes : les cellules épithéliales et les leucocytes
1906 (macrophages, granulocytes neutrophiles et lymphocytes). Lors d'infection intramammaire,
1907 on observe une très forte augmentation du pourcentage des granulocytes neutrophiles et
1908 diminution du pourcentage relatif des cellules épithéliales (Dulin et al., 1982; Miller et al.,
1909 1986). Cette réaction inflammatoire de la glande mammaire, nommée mammite, en réponse à
1910 une infection par une ou plusieurs espèces bactériennes conduit à des modifications plus ou
1911 moins importantes de la composition du lait dues notamment à une augmentation de la
1912 perméabilité capillaire. Réduire la réponse inflammatoire consécutive à une infection
1913 intramammaire pourrait donc permettre de réduire les dommages cellulaires au niveau de
1914 l'épithélium mammaire.

1915 L'objectif de l'étude était de produire des connaissances sur les effets de la GLE
1916 l'incidence et la persistance des mammites subcliniques (MSC) en conditions d'utilisation de
1917 terrain.

1918 **2. Matériel et méthodes**

1919 **a) Dispositif expérimental**

1920 L'étude a été réalisée à partir du même jeu de données que pour l'évaluation de l'effet
1921 de la GLE sur les performances de production et les taux (cf. matériel et méthodes chapitre 2
1922 partie B). Brièvement, une étude épidémiologique exposé/non exposé rétrospective a été
1923 réalisée sur les données issues d'élevages commerciaux pendant la période 2008-2015. Les
1924 données de concentrations en CCS mesurées lors du CL issues de vaches ayant reçu de la
1925 GLE ont été comparées à des données CCS issues de vaches n'ayant pas reçu de la GLE.
1926 L'exposition à la GLE a été calculée à partir des livraisons d'aliments commerciaux à base de
1927 GLE étant donné que les données de la ration n'étaient pas disponibles.

1928 **b) Définition de la variable d'exposition**

1929 Nous avons repris les données d'exposition considérées pour étudier les performances
1930 de production. Chaque CL a été classé selon la distribution journalière moyenne estimée de
1931 GLE depuis le contrôle laitier précédent. Les classes d'exposition sont donc les mêmes :
1932 0 (i.e., non exposé),]0, 50],]50, 300],]300, 600] and]600, 1 500] g/vache/j. Les CL des
1933 élevages ayant distribué de la GLE durant la période d'étude 2008-2015 qui n'ont pas été
1934 considérés comme exposés ont constitué la base de données « non exposé ».

1935 **c) Définition des variables à expliquer**

1936 Deux variables à expliquer ont été définies afin de tester l'effet prévention et l'effet
1937 curatif de la GLE : l'incidence de MSC et la guérison de MSC. La CCS a été utilisée comme
1938 indicateur de MSC. Deux seuils ont été étudiés : 100,000 et 200,000 cellules/mL. Ces seuils
1939 ont été choisis sur la base notamment du travail réalisé par (Djabri, 2002). Il a réalisé la
1940 synthèse de 9 études ayant publié la valeur informative (sensibilité et spécificité) des tests
1941 basés sur le CCS du lait de mamelle. Il en a déduit que le seuil permettant le mieux de
1942 discriminer les mamelles infectées dans au moins un quartier ou non était de 100 000
1943 cellules/mL (sensibilité de 63% et spécificité de 71%). Celui permettant le mieux de
1944 discriminer les mamelles infectées par un pathogène majeur dans au moins un quartier ou non
1945 était de 180 000 cellules/mL (sensibilité de 77% et spécificité de 80%).

1946 L'incidence de MSC est définie par une variable dichotomique à chaque CL à partir de
1947 la donnée du CL précédent : la variable d'incidence prend la valeur 1 lorsque la CCS au CL
1948 considéré dépasse le seuil défini par rapport au CL précédent. La guérison de MSC est définie
1949 à l'inverse : la variable prend la valeur 1 lorsque la CCS au CL considéré passe en dessous du

1950 seuil défini par rapport au CL précédent. Pour étudier l'incidence de MSC, la vache doit donc
1951 être considérée saine au CL précédent et pour la guérison de MSC, la vache doit être
1952 considérée malade au CL précédent. Le critère de jugement de l'état sain vis-à-vis de MSC a
1953 été défini de deux manières : soit un CL soit deux CL sous le seuil défini pour définir le statut
1954 sain. Le choix de faire varier ce critère permet d'améliorer la spécificité du test basé sur les
1955 CCS : le jugement d'une vache saine sur la base de 2 CL inférieurs au seuil est plus fiable que
1956 celui sur la base d'un seul CL.

1957 *d) Modélisation statistique*

1958 L'unité statistique est le couple de deux CL consécutifs. L'effet de la GLE sur
1959 l'incidence de MSC et la guérison de MSC a été étudié par des modèles de régression
1960 logistique à effets mixtes. Les modèles ont été ajustés des effets fixes de facteurs influençant
1961 la survenue de MSC et leur guérison : parité (5 niveaux), stade de lactation (6 niveaux),
1962 production laitière au CL précédent (ou 1er contrôle du couple de CL étudié) (8 niveaux),
1963 mois du contrôle (12 niveaux), année du contrôle (8 niveaux), localisation géographique (7
1964 niveaux). De plus, les modèles ont été ajustés d'un effet aléatoire troupeau afin de tenir
1965 compte des disparités entre élevages notamment de gestion de la santé et des conditions
1966 d'hygiène du bâtiment et de traite, facteurs de risque importants de la survenue ou guérison de
1967 MSC.

1968 Les analyses statistiques ont été réalisées à partir de la fonction glmer du package
1969 lme4 (version 1.1-12) du logiciel R (R Core Team, 2016).

1970 **3. Résultats**

1971 *a) Statistiques descriptives*

1972 L'échantillon final était constitué de 1 204 troupeaux et 1 997 763 CL dont 400 716
1973 premiers CL après vêlage. Le taux d'incidence de MSC de l'échantillon n'a pas varié selon le
1974 critère de définition du statut sain (17,4% vs. 17,5% au seuil 100 000 cellules/mL) mais a
1975 évolué selon le seuil de CCS retenu (respectivement, 17,4% vs. 10,4% pour 100 000 et
1976 200 000 cellules/mL) (Tableau 3.6). Plus de la moitié des couples de CL a été non-exposée.
1977 Le taux d'incidence de MSC dans la population de référence a été de 17,7 (10,7) % au seuil
1978 de 100,000 (200,000) cellules/mL, supérieur aux taux d'incidence de MSC dans chacune des
1979 catégories d'exposition quel que soit le seuil ou l'hypothèse de définition du statut sain
1980 retenus : respectivement 17,0 (10,4), 16,6 (9,9), 17,4 (10,4), 17,1 (10,4) % au seuil 100 000
1981 (200 000) cellules/mL pour les catégories d'exposition]0, 50],]50, 300],]300, 600] et]600,

1982 1 500] g/vache/j (Tableau 3.6). Le taux de guérison de MSC de l'échantillon a varié selon le
1983 critère de définition du statut sain (27,2% vs. 19,5% en considérant respectivement 1 ou 2 CL
1984 sous le seuil 100 000 cellules/mL) et a aussi évolué selon le seuil de CCS retenu
1985 (respectivement, 27,2% vs. 37,3% pour 100 000 et 200 000 cellules/mL) (Tableau 3.7). Plus
1986 de la moitié des couples de CL a été non-exposée. Le taux de guérison de MSC dans la
1987 population de référence a été de 26,5 (36,6) % au seuil de 100 000 (200 000) cellules/mL,
1988 inférieur aux taux de guérison de MSC pour chacune des catégories d'exposition quel que soit
1989 le seuil ou l'hypothèse de définition du statut sain retenus sauf pour l'exposition la plus faible:
1990 respectivement 28,0 (37,7), 28,4 (38,6), 28,6 (39,9) au seuil 100 000 (200 000) cellules/mL
1991 pour les catégories d'exposition]50, 300],]300, 600] and]600, 1 500] g/vache/j (Tableau
1992 3.7).

1993 ***b) La supplémentation en GLE n'est pas associée au risque***
1994 ***d'incidence de mammites subcliniques***

1995 Quelle que soit la quantité de GLE, le seuil de CCS considéré ou le nombre de CL
1996 pour définir le statut sain, la supplémentation en GLE n'a pas modifié le risque d'incidence de
1997 MSC par rapport à la population de référence (Tableau 3.8), à l'exception d'une légère
1998 augmentation du risque de nouvelles MSC au seuil 100,000 cellules/mL (OR de 1,03 à 1,04)
1999 pour la quantité de GLE de]300, 600] g/vache/jour.

2000 ***c) La supplémentation en GLE est associée à une meilleure***
2001 ***guérison des mammites subcliniques***

2002 A l'exception de la quantité de GLE la plus faible, quelle que soit la quantité de GLE,
2003 le seuil de CCS considéré ou le nombre de CL pour définir le statut sain, la supplémentation
2004 en GLE était associée à une légère augmentation du risque de guérison de MSC par rapport à
2005 la population de référence (OR de 1,03 à 1,10) (Tableau 3.9).

2006 ***d) Des variables d'ajustement intéressantes***

2007 Le risque d'incidence de SCM augmente avec la parité, tandis que le risque de
2008 guérison de SCM diminue (Tableau 3.10). Le risque d'incidence de SCM augmente avec le
2009 stade de lactation, tandis que le risque de guérison de SCM diminue. La production laitière au
2010 CL précédent (ou 1^{er} contrôle du couple de CL étudié) n'est pas associée au risque
2011 d'incidence de SCM tandis qu'une faible production laitière au CL précédent augmente le
2012 risque de guérison par rapport à une production moyenne. Le risque d'incidence de SCM

2013 augmente lors des mois d'été tandis le risque de guérison de SCM diminue lors des mois de
2014 printemps et d'été.

2015 **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)
 2016 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		177,176	155,283	187,554	175,397				
Lactations		338,307	272,728	374,031	330,399				
Pairs of TDs ¹	Total	1,048,244	582,540	1,281,647	801,594				
	0	866,102	480,357	1,147,466	722,739				
	1	182,142	102,183	134,181	78,855				
	Rate (%)	17.4	17.5	10.5	9.8				
EL exposure status ²		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

2017 ¹Considering 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
 2018 second TD (i.e., below then above somatic cells count threshold).

2019 ²Exposure 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)
 2020 transition (TR) corresponding to the first TD after beginning EL supplementation (ii) carry-over (CO) corresponding to the first TD after stopping EL
 2021 supplementation.

2022 **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
 2023 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 ¹	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 ²		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

2024 ¹Considering 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
 2025 second TD (i.e., above then below somatic cells count threshold).

2026 ²Exposure 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)
 2027 transition (**TR**) corresponding to the first TD after beginning EL supplementation (ii) carry-over (**CO**) corresponding to the first TD after stopping EL
 2028 supplementation.

2029 **Table 3.8** Model results for the association between extruded linseed (EL) exposure status and risks of new subclinical mastitis between two consecutive test
 2030 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
 2031 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 ¹	95% CI ²	P ³	OR	95% CI	P	OR	95% CI	P	OR	95% CI	P
EL exposure status ⁴												
Unexposed	1	Ref ⁵		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

2032 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
 2033 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.

2034 ¹OR = 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
 2035 TD (12 levels), year of TD (8 levels), geographical area (7 levels) and herd random effect.

2036 ²CI = confidence interval.

2037 ³P = P-value.

2038 ⁴Exposure 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)
 2039 transition (**TR**) corresponding to the first TD after beginning EL supplementation (ii) carry-over (**CO**) corresponding to the first TD after stopping EL
 2040 supplementation.

2041 ⁵Ref = Reference.

2042 **Table 3.9** Model results for the association between extruded linseed (**EL**) exposure status and risks of subclinical mastitis cure between two consecutive test
 2043 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
 2044 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 ¹	95% CI ²	P ³	OR	95% CI	P	OR	95% CI	P	OR	95% CI	P
EL exposure status ⁴												
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

2045 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
 2046 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.

2047 ¹OR = 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
 2048 TD (12 levels), year of TD (8 levels), geographical area (7 levels) and herd random effect.

2049 ²CI = confidence interval.

2050 ³P = P-value.

2051 ⁴Exposure 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)
 2052 transition (**TR**) corresponding to the first TD after beginning EL supplementation (ii) carry-over (**CO**) corresponding to the first TD after stopping EL
 2053 supplementation.

2054 ⁵Ref = Reference.

2055 **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**)
 2056 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
 2057 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 ¹	95% CI ²	P ³	Number of pairs of TDs	OR	95% CI	P	Number of pairs of TDs
Parity								
1	0.73	0.72 ; 0.74	<0.001	493,064	1.41	1.37 ; 1.44	<0.001	81,943
2	1	Ref ⁴		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
Days in milk (d)								
≥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
Milk yield at previous TD (kg/d)								
≥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
Month of TD								
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

2058 ¹OR = odds-ratio adjusted for EL exposure status in addition to all adjustment variables.

2059 ²CI = confidence interval.

2060 ³P = P-value.

2061 ⁴Ref = Reference.

2062
2063
2064
2065
2066

2067
2068
2069
2070
2071
2072
2073
2074
2075
2076
2077
2078
2079
2080
2081
2082
2083
2084
2085
2086
2087
2088
2089
2090
2091
2092
2093
2094

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 discutées 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; Ramirez 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

2095 (Cardozo et al., 2015; Frössling et al., 2017). Un stade de lactation supérieur à 100 jours a été
2096 identifié comme facteur de risque de persistance par Cardozo et al. (2015), ce qui est aussi en
2097 accord avec nos résultats. Dans cette même étude, le niveau de production laitière individuelle
2098 n'était pas associé ni au risque de nouvelles MSC ni au risque de persistance dans le modèle
2099 final retenu. Dans notre étude, le niveau de production laitière était associé au risque de
2100 guérison, les vaches faibles productrices ayant plus de chances de guérir. Ceci peut paraître
2101 logique, mais peut aussi être dû à un effet de confusion. En effet, la vache à CCS élevée au
2102 CL précédent, puisque c'est le critère pour que le CL étudié soit inclus, aurait eu une forte
2103 diminution de production laitière. Celle-ci, avec potentiellement d'autres signes cliniques,
2104 aurait été détectée par l'éleveur qui aurait décidé de lui administrer un traitement, traitement
2105 qui serait alors à l'origine de l'amélioration de la guérison au CL étudié.

2106 *b) Hypothèses biologiques associées*

2107 Dans notre étude, la supplémentation en GLE n'était pas associée à un effet préventif
2108 sur la survenue de MSC, mais elle était associée à un effet curatif. Dans les faits, il est serait
2109 plus prudent de parler de réduction de la réponse inflammatoire à l'origine de la disparition de
2110 la MSC que de guérison, qui dans le cas des mammites sous-entend une élimination des
2111 bactéries, car aucune vérification de la guérison bactériologique n'a pu être constatée.
2112 Toutefois, la réduction de réponses inflammatoires incontrôlées est une voie de recherche
2113 thérapeutique des maladies inflammatoires des vaches laitières en début de lactation, en
2114 particulier les mammites, afin de permettre de limiter les dommages tissulaires causées par
2115 l'inflammation (Sordillo, 2016; Mavangira and Sordillo, 2017; Ryman et al., 2017).

2116 Nous pouvons émettre l'hypothèse que la supplémentation en acide α -linoléique
2117 (ALA) et en anti-oxydants (i.e., lignanes) en quantité modeste (puisqu'à partir d'environ
2118 170g/vache par jour de GLE) a modulé la réponse inflammatoire de l'hôte (effet anti-
2119 inflammatoire) et réduit le risque de persistance de MSC. Ces effets pourraient également
2120 provenir des dérivés de l'ALA formés lors de la biohydrogénation ruminale par
2121 hydrogénation (Basiricò et al., 2017) ou par élongation dans les tissus. Cependant, l'effet
2122 propre de l'ALA est à privilégier. En effet, ces résultats intéressants sont en cohérence avec
2123 l'expérience de Ryman et al. (2017) reposant sur l'exposition ex-vivo de leucocytes à des
2124 challenges microbiens. Ils ont observé une modulation dans un sens plutôt favorable de la
2125 synthèse des oxylipides (anti-inflammatoires) dans des leucocytes issus de vaches
2126 supplémentées en ALA par infusion abomasale (donc n'ayant pas subi de BHR) en
2127 comparaison de témoins issus de vaches non supplémentées ou supplémentées en acide

2128 linoléique (**LA**). Une réduction de la réponse inflammatoire a aussi été observée in-vitro sur
2129 des cellules endothéliales bovines mises en présence de lipopolysaccharides après
2130 supplémentation en AG n-3 à longue chaîne (Contreras et al., 2012).

2131 Ryman et al. (2017) font aussi l'hypothèse que le ratio ALA/LA serait plus influent
2132 sur la modulation de la réponse inflammatoire que la quantité absolue d'ALA apportée. Greco
2133 et al. (2015) ont d'ailleurs prouvé que la réponse inflammatoire de vaches soumises à une
2134 infusion de lipopolysaccharides dans la mamelle était diminuée lorsqu'elles recevaient une
2135 ration avec un ratio n-6/n-3 plus faible. Or on sait que même une supplémentation modeste en
2136 ALA fait varier ce ratio dans le lait (Meignan et al., 2017) et dans les tissus. Enfin, la synthèse
2137 des oxylipides à la supplémentation en ALA pourrait être différente selon l'agent pathogène
2138 rencontré (gram négatif ou gram positif) (Ryman et al., 2017). Cependant, dans notre étude
2139 nous ne disposons pas de cette information. Il serait donc intéressant de mener une étude
2140 prospective avec identification des agents pathogènes et supplémentation en GLE afin
2141 d'apporter des éléments de réponse à cette interrogation.

2142 *c) Conclusion*

2143 Nous avons montré, qu'en conditions de terrain, la supplémentation en GLE en
2144 quantités modestes était associée à une moindre persistance des MSC. Cet effet pourrait
2145 s'expliquer par une réduction de la réponse inflammatoire suite à l'apport d'ALA. La
2146 principale inconnue qui demeure suite à ce travail est l'existence ou pas d'une meilleure
2147 guérison bactériologique en parallèle de la disparition des MSC. Au final, cette étude ouvre
2148 des perspectives sur l'intérêt thérapeutique de la nutrition chez la vache laitière, à l'heure où
2149 l'usage des antibiotiques doit être rationalisé.

2150 **5. Références**

- 2151 Basiricò, L., P. Morera, D. Dipasquale, A. Tröschler, and U. Bernabucci. 2017. Comparison
2152 between conjugated linoleic acid and essential fatty acids in preventing oxidative stress
2153 in bovine mammary epithelial cells. *J. Dairy Sci.* 100:2299–2309. doi:10.3168/jds.2016-
2154 11729.
- 2155 Bodoh, G.W., W.J. Battista, L.H. Schultz, and R.P. Johnston. 1976. Variation in Somatic Cell
2156 Counts in Dairy Herd Improvement Milk Samples. *J. Dairy Sci.* 59:1119–1123.
2157 doi:10.3168/jds.S0022-0302(76)84331-7.
- 2158 Cardozo, L.L., A. Thaler Neto, G.N. Souza, L.C.A. Picinin, N.C. Felipus, N.L.M. Reche, F.A.
2159 Schmidt, D. Werncke, and E.E. Simon. 2015. Risk factors for the occurrence of new and
2160 chronic cases of subclinical mastitis in dairy herds in southern Brazil. *J. Dairy Sci.*

2161 98:7675–7685. doi:10.3168/jds.2014-8913.

2162 Contreras, G.A., S.A. Mattmiller, W. Raphael, J.C. Gandy, and L.M. Sordillo. 2012.
 2163 Enhanced n-3 phospholipid content reduces inflammatory responses in bovine
 2164 endothelial cells. *J. Dairy Sci.* 95:7137–7150. doi:10.3168/jds.2012-5729.

2165 Coulon, J.B., F. Dauver, and J.P. Garel. 1996. Facteurs de variation de la numération
 2166 cellulaire du lait chez des vaches laitières indemnes de mammites cliniques. *INRA Prod.*
 2167 *Anim.* 9:133–139.

2168 Djabri, B. 2002. Valeur informative de la concentration en cellules somatiques du lait de
 2169 quartier pour identifier l’infection intramammaire des vaches laitières Valeur informative
 2170 de la concentration en cellules somatiques du lait de quartier pour identifier l’infection i.
 2171 Université Rennes I. 222 pp.

2172 Dulin, A.M., M.J. Paape, and B.T. Weinland. 1982. Cytospin Centrifuge in Differential
 2173 Counts of Milk Somatic Cells. *J. Dairy Sci.* 65:1247–1251. doi:10.3168/jds.S0022-
 2174 0302(82)82337-0.

2175 Frössling, J., A. Ohlson, and C. Hallén-Sandgren. 2017. Incidence and duration of increased
 2176 somatic cell count in Swedish dairy cows and associations with milking system type. *J.*
 2177 *Dairy Sci.* 100:7368–7378. doi:10.3168/jds.2016-12333.

2178 Greco, L.F., J.T.N. Neto, A. Pedrico, R.A. Ferrazza, F.S. Lima, R.S. Bisinotto, N. Martinez,
 2179 M. Garcia, E.S. Ribeiro, G.C. Gomes, J.H. Shin, M.A. Ballou, W.W. Thatcher, C.R.
 2180 Staples, and J.E.P. Santos. 2015. Effects of altering the ratio of dietary n-6 to n-3 fatty
 2181 acids on performance and inflammatory responses to a lipopolysaccharide challenge in
 2182 lactating Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 98:602–617. doi:10.3168/jds.2014-8805.

2183 Mavangira, V., and L.M. Sordillo. 2017. Role of lipid mediators in the regulation of oxidative
 2184 stress and inflammatory responses in dairy cattle. *Res. Vet. Sci.* 0–1.
 2185 doi:10.1016/j.rvsc.2017.08.002.

2186 Meignan, T., C. Lechartier, G. Chesneau, and N. Bareille. 2017. Effects of feeding extruded
 2187 linseed on production performance and milk fatty acid profile in dairy cows: A meta-
 2188 analysis. *J. Dairy Sci.* 100:4394–4408. doi:10.3168/jds.2016-11850.

2189 Miller, R.H., M.J. Paape, and J.C. Acton. 1986. Comparison of Milk Somatic Cell Counts by
 2190 Coulter and Fossomatic Counters. *J. Dairy Sci.* 69:1942–1946. doi:10.3168/jds.S0022-
 2191 0302(86)80621-X.

2192 R Core Team. 2016. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation
 2193 for Statistical Computing, Vienna, Austria.

2194 Ramírez, N.F., G. Keefe, I. Dohoo, J. Sánchez, O. Arroyave, J. Cerón, M. Jaramillo, and L.G.

2195 Palacio. 2014. Herd- and cow-level risk factors associated with subclinical mastitis in
2196 dairy farms from the High Plains of the northern Antioquia, Colombia. *J. Dairy Sci.*
2197 97:4141–4150. doi:10.3168/jds.2013-6815.

2198 Rupp, R., D. Boichard, C. Bertrand, and S. Bazin. 2000. Bilan national des numérations
2199 cellulaires dans le lait des différentes races bovines laitières Françaises. *INRA Prod.*
2200 *Anim.* 13:257–267.

2201 Ryman, V.E., N. Packiriswamy, B. Norby, S.E. Schmidt, A.L. Lock, and L.M. Sordillo. 2017.
2202 Supplementation of linoleic acid (C18:2n-6) or α -linolenic acid (C18:3n-3) changes
2203 microbial agonist-induced oxylipid biosynthesis. *J. Dairy Sci.* 100:1870–1887.
2204 doi:10.3168/jds.2016-11599.

2205 Schalm, O.W., and J. Lasmanis. 1968. The leukocytes: origin and function in mastitis. *J Am*
2206 *Vet Med Assoc.* 153:1688–1694.

2207 Sordillo, L.M. 2016. Nutritional strategies to optimize dairy cattle immunity. *J. Dairy Sci.*
2208 99:4967–4982. doi:10.3168/jds.2015-10354.

2209

2210 **Chapitre IV. Evaluation de l'intérêt économique de l'utilisation de la**
2211 **graine de lin extrudée par simulations**

2212 *Les simulations décrites dans ce chapitre ont été effectuées par T.Meignan. Le paramétrage*
2213 *du troupeau a été effectué par A.Bekara. Le paramétrage des simulations a été effectué par*
2214 *P.Gontier pour les performances de production et T.Meignan pour les performances de*
2215 *reproduction. Les calculs de surcoût alimentaire ont été effectués par Valorex. La rédaction*
2216 *de ce chapitre de thèse a été assurée par T.Meignan, N.Bareille et A.Bekara.*

2217 **A. Introduction**

2218 Compte tenu des effets contrastés de la GLE, un aliment haut de gamme, sur les
2219 performances animales, la question de l'analyse coûts-bénéfices de l'utilisation de la GLE en
2220 exploitation bovine laitière a déjà été soulevée et étudiée (Béguin et al., 2009). Cependant,
2221 cette étude montre trois limites importantes compte tenu des connaissances produites depuis
2222 cette date, en particulier dans cette thèse.

2223 La première concerne la quantité de GLE qui a été évaluée. Se basant sur les études
2224 expérimentales disponibles alors, les auteurs ont retenu une supplémentation de 700 grammes
2225 de GLE par vache et par jour (1 kg d'un aliment composé de 70% de GLE). Nous avons pu
2226 montrer que sur la période de 2008 à 2015, la quantité journalière moyenne de GLE
2227 supplémentée était de 297 g/vache/jour et que seulement 12% des contrôles laitiers exposés
2228 étaient catégorisés au-dessus de 600g/vache/jour vaches (Chapitre 2-B).

2229 La deuxième limite de cette étude est relative aux effets sur la production laitière et les
2230 taux de matières utiles des vaches pris en compte (cf. Tableau 1.3) qui s'appuyaient sur les
2231 travaux réalisés en station expérimentale dans les années 1990. Ainsi, chacun des effets
2232 techniques sont moins favorables à ce qu'il a été estimé dans cette thèse dans les conditions
2233 actuelles d'utilisation de la GLE.

2234 Enfin, seuls les effets induits par la supplémentation en GLE sur les performances de
2235 production ont été pris en compte. Pourtant, l'amélioration des performances de reproduction
2236 s'accompagne d'une amélioration du résultat économique des exploitations laitières (De
2237 Vries, 2006; Inchaisri et al., 2010; Kalantari and Cabrera, 2012). A titre d'exemple, Inchaisri
2238 et al. (2010) ont estimé l'impact de la réduction de l'intervalle entre deux vêlages successifs
2239 de 407 jours à 362 jours par un gain moyen de 34 euros par vache et par an. De plus, la
2240 moindre persistance des infections intra-mammaires réduit la durée des mammites

2241 subcliniques et leurs conséquences néfastes sur la rentabilité de l'atelier laitier (Seegers et al.,
2242 2003).

2243 Compte tenu de la diversité des effets bénéfiques observés, de la relative faiblesse de
2244 chacun d'entre eux, et des adaptations constantes des exploitations agricoles au contexte de
2245 prix et aux aléas subis sur leur troupeau, il est illusoire de chercher à quantifier les coûts-
2246 bénéfiques de l'apport de GLE par étude observationnelle; l'approche par modélisation-
2247 simulation s'impose. Dans l'étude de Béguin et al. (2009), un modèle de budget partiel a été
2248 utilisé. Il permet d'estimer la variation d'un indicateur de résultat économique entre une
2249 situation initiale et une situation finale, résultant d'une décision. Cette méthode était adaptée
2250 aux hypothèses prises par ces auteurs qui ont raisonné sur des modifications, d'une part, des
2251 produits, induites par la valorisation différenciée du prix du lait, et d'autre part, de la
2252 composition de rations intégrant ou pas la GLE, et leurs conséquences sur le système
2253 fourrager. Dès lors que la fécondité est impactée, il est plus difficile de prévoir les
2254 modifications de produits et charges annuelles de l'exploitation. Le recours à une
2255 modélisation-simulation dynamique doit alors être privilégié.

2256 L'objectif de ce chapitre de thèse est d'évaluer, par modélisation-simulation
2257 dynamique, l'intérêt économique de l'utilisation de la graine de lin extrudée en exploitation
2258 bovine laitière.

2259 **B. Matériel et méthodes**

2260 **1. Schéma d'étude et scénarios de simulations**

2261 *a) Description de l'atelier d'élevage laitier retenu*

2262 L'intérêt économique de l'utilisation de la graine de lin extrudée peut varier selon les
2263 caractéristiques des exploitations bovines laitières concernées. Faute de temps, la priorité a été
2264 donnée à l'exploration des résultats dans le contexte dominant des clients de l'entreprise
2265 Valorex : l'élevage breton. Afin de se rapprocher du mieux possible de sa réalité technique et
2266 économique, un descriptif détaillé du fonctionnement et des performances de l'exploitation a
2267 été recherché dans l'observatoire INOSYS – réseaux d'élevage. Il s'agit d'un dispositif
2268 partenarial associant des éleveurs volontaires et des ingénieurs de l'Institut de l'élevage et des
2269 Chambres d'agriculture dont la finalité est la production de références sur les systèmes
2270 d'élevage herbivores.

2271 L'atelier laitier modélisé est un atelier type breton intensif de plaine décrit en 2013. Le
2272 troupeau est composé de 50 vaches Prim'Holstein en lactation qui produisent en moyenne

2273 9200 L/an à 40,2 g/L de TB et 32,8 g/L de TP, avec des performances de reproduction et de
2274 santé moyennes. La ration est majoritairement constituée d'ensilage de maïs associé à une
2275 utilisation maximale du pâturage du printemps à l'automne, et à de l'enrubannage l'hiver. La
2276 quantité de concentrés est maîtrisée : 1175 kg/VL/an.

2277 **b) Scénarios d'apport de graine de lin extrudée**

2278 Les scénarios testés sont au nombre de 9 : un scénario de référence (pas de distribution
2279 de GLE) et 8 scénarios qui correspondent à des stratégies différenciées de supplémentation en
2280 GLE. Les stratégies de supplémentation en GLE ont été définies selon la quantité de GLE
2281 apportée et selon le ciblage de la supplémentation sur certaines vaches. Il a été considéré que
2282 lorsque de la GLE est supplémentée, elle est substituée à une quantité d'aliments concentrés
2283 assurant le même apport énergétique et protéique et que l'apport de fourrage n'est pas
2284 modifié.

2285 Quatre quantités journalières de GLE ont été testées ; elles correspondent à la valeur
2286 moyenne des classes de distribution distinguées dans l'étude épidémiologique : 27 g, 173 g,
2287 427g et 789 g. Deux stratégies de distribution ciblée ont été testées : (1) toutes les vaches tout
2288 le temps, (2) les vaches à un stade de lactation inférieur à 180 jours tout le temps. Cette
2289 deuxième stratégie est justifiée par deux éléments : une supplémentation ciblée sur
2290 l'amélioration des performances de reproduction et une connaissance des effets sur la
2291 production laitière et les taux de matières utiles qui n'a été produite que sur les données de
2292 vaches à moins de 180 jours de lactation (Chapitre 2.2). Cette stratégie de distribution ciblée
2293 n'a cependant pas été testée avec la première quantité de supplémentation en GLE car aucun
2294 effet sur les performances de production n'a été observé (Chapitre 2.2).

2295 **c) Contraintes de simulation**

2296 De manière empirique, l'horizon temporel des simulations a été fixé à 8 ans dont 3 ans
2297 de scénario de référence. Durant les 3 années de référence, aucune utilisation de la GLE n'est
2298 simulée quel que soit le scénario. Cet horizon temporel est suffisant pour observer les effets
2299 de la GLE sur les performances zootechniques. Chaque simulation a été répliquée 250 fois
2300 afin de stabiliser les résultats étant donné la stochasticité du modèle.

2301 Les simulations tendent à respecter chaque année un objectif de production de
2302 450 000 L à un TB de 40,2 g/L avec possibilité de dépassement de 3%, selon les règles du
2303 quota matières grasses qui était appliqué en France jusqu'en mars 2015.

2304

2. Description du modèle de simulation et paramétrages

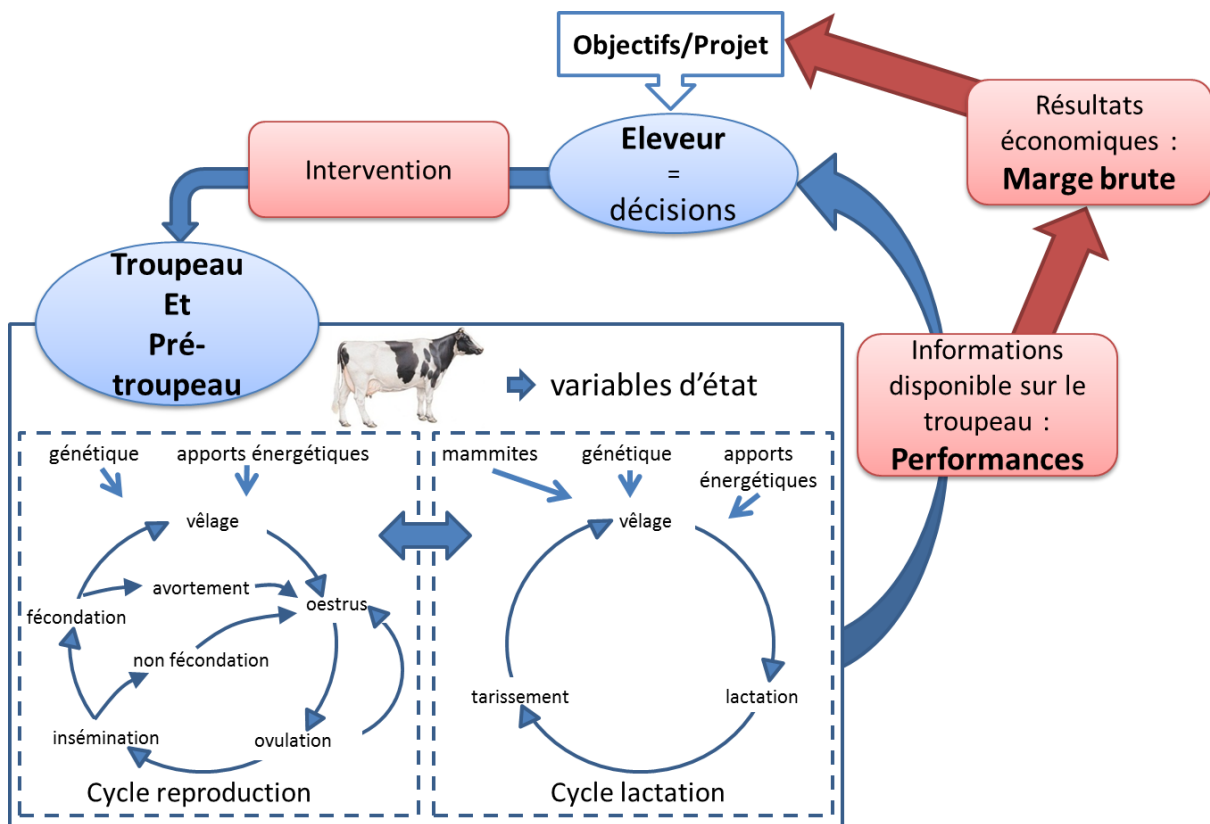
2305

a) Principales caractéristiques du simulateur

2306

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, évènements 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.

2319



2320

2321

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

2322 Les individus représentés dans le simulateur sont les vaches et le pré-troupeau obtenu
2323 par auto-renouvellement. Les fonctions de production et de reproduction sont modélisées,
2324 l'une et l'autre, par une succession d'évènements qui subissent les influences mutuelles. Ces
2325 fonctions sont aussi influencées par la génétique des individus, les apports alimentaires et les
2326 troubles de santé. L'éleveur est représenté en tant que décisionnaire ; il prend des décisions
2327 relatives à la reproduction des animaux, à leur tarissement, au choix des femelles à conserver
2328 ou à réformer, etc. Les performances animales et économiques (marge brute de l'atelier) sont
2329 synthétisées avec un pas de temps annuel.

2330 Le modèle a été décrit de façon détaillée dans une publication relative à l'étude des
2331 croisements entre races bovines laitières (Dezetter et al., 2017). Nous avons fait le choix ici de
2332 ne présenter que des éléments d'intérêt pour l'objectif de ce chapitre.

2333 *b) Paramétrisation du troupeau initial*

2334 La complexité de ce modèle dû au nombre élevé de paramètres utilisés et la
2335 stochasticité des processus simulés rend la calibration de l'élevage initial et des scénarios
2336 simulés plus difficile (Hofmann, 2005).

2337 Afin de calibrer un élevage initial représentatif d'un système d'élevage de bovin
2338 laitier, nous avons eu recours à la méthode Approximate Bayesian Computation (**ABC**) pour
2339 estimer les paramètres d'entrée du modèle : la sensibilité de détection de chaleurs en fonction
2340 du niveau d'expression de chaleurs, de la parité et du rang d'ovulation postpartum (**Se**) et la
2341 probabilité de conception à 21 jours (**CR₂₁**). Ces paramètres sont susceptibles de changer d'un
2342 système d'élevage à l'autre (cette méthode a permis d'en créer 12 dont le système breton que
2343 nous avons utilisé dans cette thèse). Les autres paramètres du modèle ont été fixés à partir :
2344 des données observées sur des cas types représentatifs du système d'élevage simulé (groupage
2345 des vêlages, niveau de production laitière, composition du troupeau), des données de la
2346 littérature, et de l'expertise des concepteurs du modèle (Dezetter et al., 2017). Nous avons
2347 choisi d'estimer ces deux paramètres (**Se** et **CR₂₁**) car ils avaient l'effet le plus important sur
2348 les résultats technico-économiques des élevages bovins laitiers dans plusieurs analyses de
2349 sensibilité qui ont été faites sur des modèles de simulation (Inchaisri et al., 2010). La méthode
2350 ABC permet d'estimer les valeurs des paramètres d'un modèle par simulation, en étudiant la
2351 ressemblance entre le jeu de données observé et les jeux de données simulés par le modèle.
2352 Ainsi, les valeurs des paramètres d'entrée du modèle qu'on cherche à estimer (**Se** et **CR₂₁**)
2353 sont tirées au sort dans une distribution définie, puis chaque valeur est utilisée pour simuler un
2354 jeu de données. Plus les données simulées sont semblables aux données observées, plus les

2355 valeurs des paramètres tirées au sort et utilisées pour les simulations sont probables (Toni et
 2356 al., 2009). Cependant, la probabilité de générer des données simulées présentant une distance
 2357 faible par rapport aux données observées diminue rapidement lorsque la dimension des
 2358 données augmente. Cela conduit à une diminution substantielle de l'efficacité d'estimation des
 2359 paramètres par la méthode ABC. Une approche communément utilisée pour réduire ce
 2360 problème consiste à remplacer les données observées avec un ensemble de statistiques
 2361 résumées de dimension réduite, ces statistiques résumées sont sélectionnées de façon à
 2362 capturer les informations pertinentes dans les données observées (Sunnåker et al., 2013).
 2363 C'est-à-dire qu'on ne doit pas utiliser toutes les données observées pour estimer les
 2364 paramètres du modèle, mais qu'il faut choisir des données pertinentes d'un point de vue du
 2365 processus simulé. Les statistiques résumées utilisées dans le travail de création des troupeaux
 2366 initiaux sont présentées dans le tableau 4.1.

2367 **Tableau 4.1** Statistiques résumées utilisées pour l'estimation des paramètres d'entrée du modèle (Se et
 2368 CR₂₁).

Statistiques résumées	
Reproduction	<ul style="list-style-type: none"> - IVV moyen - IV1IA moyen - IVIAF moyen - IAF par IA moyen - Distribution mensuelle des vêlages (groupé ou étalé) - Age moyen au 1^{er} vêlage
Caractéristiques du troupeau	<ul style="list-style-type: none"> - Nombre de vaches - Nombre de génisses moins d'un an - Nombre de génisses âgées entre un an et 2 ans - Nombre de génisses âgées plus de 2 ans - % de réalisation du quota

2369
 2370 Les statistiques résumées des données observées, pour un système d'élevage donné,
 2371 ont été obtenues à partir des données du système d'élevage de l'observatoire INOSYS –
 2372 réseaux d'élevage, et de la base de données des performances de reproduction des élevages de
 2373 bovins en France (Observatoire de la reproduction, projet Reproscope). L'observatoire a été
 2374 utilisé pour calculer la moyenne des performances de reproduction, absente dans le fichier
 2375 INOSYS, à partir des élevages représentatifs du système d'élevage simulé.

2376 L'algorithme ABC utilisé pour estimer les paramètres d'entrée du modèle est le
 2377 suivant (Toni et al., 2009) :

- 2378 (i) Echantillonner 500 valeurs de Se et CR₂₁ à partir d'une distribution uniforme [0-1]
 2379 (ii) Simuler pour chaque valeur échantillonnée un jeu de données

2380 (iii) Calculer les statistiques résumées (Tableau 4.1) pour les données observées $S(X_O)$ et les
2381 données simulées $S(X^*)$

2382 (iv) Calculer pour chaque répétition la distance (d) entre $S(X_O)$ et $S(X^*)$. Dans ce travail, nous
2383 avons utilisé la distance euclidienne :

$$2384 \quad d(S(X_O) \text{ et } S(X^*)) = \sqrt{\sum_{j=1}^S \left(\frac{S_j(X^*)}{k_j} - \frac{S_j(X_O)}{k_j} \right)^2}$$

2385 où k_j est l'écart type empirique des j ($j = 1, \dots, S$) statistiques résumées des données simulées
2386 $S_j(X^*)$

2387 (v) Fixer la valeur de la distance tolérée ϵ . La distance tolérée est déterminée par la proportion
2388 des simulations conservées p_ϵ . un $p_\epsilon = x\%$ signifie qu'on garde que $x\%$ des simulations qui
2389 ont la plus petite distance avec les données observées. Dans ce travail, nous avons fixé la
2390 valeur de p_ϵ à 5%.

2391 (vi) Estimer la médiane de Se et de CR_{21} à partir des paramètres d'entrée du modèle qui ont
2392 donné les simulations conservées dans l'étape (v). Ces médianes ont été utilisées pour simuler
2393 l'élevage initial de chaque système d'élevage.

2394

2395 Enfin, les valeurs de prix du lait et des intrants correspondent aux prix disponibles
2396 dans le descriptif du système d'élevage et ont été complétés par des valeurs de prix de 2014.

2397 *c) Paramétrisation des effets de la graine de lin extrudée sur les* 2398 *performances animales*

2399 Les effets zootechniques qui ont été implémentés sont issus de l'étude
2400 épidémiologique (Tableau 4.2). La variabilité des réponses de production liée à la parité et à
2401 la quantité de GLE a été prise en compte. La variabilité des réponses liée à la nature des
2402 fourrages (baisse de 3,2 g/kg de TB avec une ration riche en ensilage de maïs) observée lors
2403 de la méta-analyse n'a pas été prise en compte malgré une part d'ensilage de maïs dans la
2404 ration distribuée élevée dans le système d'élevage étudié. Nous avons fait le choix de ne pas
2405 appliquer cette forte baisse étant donné les quantités élevées de GLE utilisées dans ces
2406 expérimentations et le manque d'associations avec d'autres fourrages. De plus, les effets
2407 moyens estimés dans l'étude épidémiologique intègrent déjà l'effet de ce fourrage, utilisé de
2408 façon dominante en exploitation bovine laitière mais souvent associé avec d'autres fourrages.

2409 **Tableau 4.2** Rappel des effets de l'utilisation de graines de lin extrudées (GLE) sur les performances
 2410 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

2411
 2412 Le gain d'intervalle vêlage-IA première à représenter a été fixé à environ 4 jours pour
 2413 chaque quantité de GLE. L'intervalle vêlage-IA première n'est pas une variable d'état qui
 2414 s'applique à chaque vache, mais est un résultat de simulation qui dépend de la succession des
 2415 évènements de reproduction de l'animal. Ainsi, pour obtenir ce gain moyen de 4 jours au
 2416 niveau du troupeau, ce gain a été implémenté via l'amélioration de la sensibilité de détection
 2417 des chaleurs par rapport au scénario de référence, évoluant de 50 à 60%.

2418 Les effets associés à l'exposition à la GLE sur la persistance des mammites-
 2419 subcliniques n'ont pas été pris en compte dans les simulations étant donné l'antériorité du
 2420 travail de simulations par rapport au travail sur les mammites subcliniques.

2421 3. Analyse des résultats

2422 Les résultats présentés sont la moyenne des performances observées sur les années 6 à
 2423 8. Ainsi, les trois années de référence avant l'implémentation de la supplémentation en GLE
 2424 et les deux années suivantes ne sont pas prises en compte.

2425 *a) Analyse des performances zootechniques du troupeau en* 2426 *fonction des stratégies différenciées d'apport de GLE*

2427 L'évolution sur les 3 années des performances zootechniques annuelles du troupeau
 2428 pour les stratégies différenciées d'apport de GLE ont été analysées en écart aux performances
 2429 zootechniques de référence sans apport de GLE. Les critères retenus pour mesurer l'intérêt
 2430 des différentes stratégies sur les performances zootechniques des ateliers ont été :

- 2431 - Pour les performances de production : la production laitière moyenne par vache
2432 présente-année, le TB et le TP annuel moyen du lait livré ;
2433 - Pour les performances de reproduction : l'intervalle vêlage-IA première et
2434 l'intervalle vêlage-IA fécondante annuel moyen par vache.

2435 ***b) Analyse des performances économiques l'atelier en fonction***
2436 ***des stratégies différenciées d'apport de GLE***

2437 Le calcul de surcoût alimentaire a été effectué *a posteriori* des simulations. Le
2438 raisonnement pour évaluer ce surcoût est basé sur la différence de la valeur d'un volume iso-
2439 énergétique et iso-protéique d'un aliment classique qui est remplacé par de la GLE. La GLE
2440 est introduite sous forme du produit Tradi-Mega de Valorex qui contient 70% de graine de lin
2441 et 30% de son de blé. Les valeurs alimentaires de cet aliment, particulièrement riche en
2442 lipides, ont été recalculées à partir des valeurs des tables INRA (1,36 UFL, 150 PDIN, 122
2443 PDIE et 18,4 % de protéine par kg brut). Sur la base d'une équivalence énergétique et
2444 protéique, il a été calculé qu'un kg de Tradi-Mega pouvait remplacer 1,3 kg d'un mélange de
2445 blé (88%) et de tourteau de soja (12%). L'écart de prix entre 1 kg de Tradi-Mega (0,54 €, prix
2446 moyen sur les 9 dernières années) et 1,3 kg du mélange blé - tourteau de soja (0,27 €, prix
2447 moyen sur la même période) est de 0,27 €, ce qui revient à un surcoût de 0,38 € pour un
2448 apport de 1 kg de GLE pure (0,27 / 70%). Selon la dose de GLE apportée, le surcout
2449 alimentaire annuel par vache a donc été évalué à 3,80 € pour une dose de 0,27 g, à 24,37 €
2450 pour une dose de 173 g, à 60,16 € pour une dose de 427 g et à 111,16 € pour une dose de
2451 789 g. Un compteur du nombre de jours-vaches recevant une dose de GLE a été introduit dans
2452 le simulateur pour pouvoir sommer le surcoût alimentaire annuel.

2453 Le critère économique principal étudié a été la marge brute annuelle (MB) de l'atelier
2454 bovin laitier. Le simulateur produit une MB qui n'intègre ni le coût des fourrages ni la
2455 rémunération du travail. Son évolution sur les trois dernières années de simulation pour les
2456 stratégies différenciées de supplémentation en GLE ont été analysées en écart aux
2457 performances économiques de référence sans supplémentation en GLE. Nous avons aussi
2458 choisi de montrer le différentiel de marge avant d'intégrer le coût d'introduction de la GLE
2459 dans la ration afin de ne pas dépendre d'un prix fixe alors qu'il est soumis à une forte
2460 variabilité sur le marché. Pour comprendre la formation de ce différentiel de marge brute, le
2461 produit, les charges opérationnelles et leurs composantes cumulées sur les années 6 à 8 ont été
2462 étudiés.

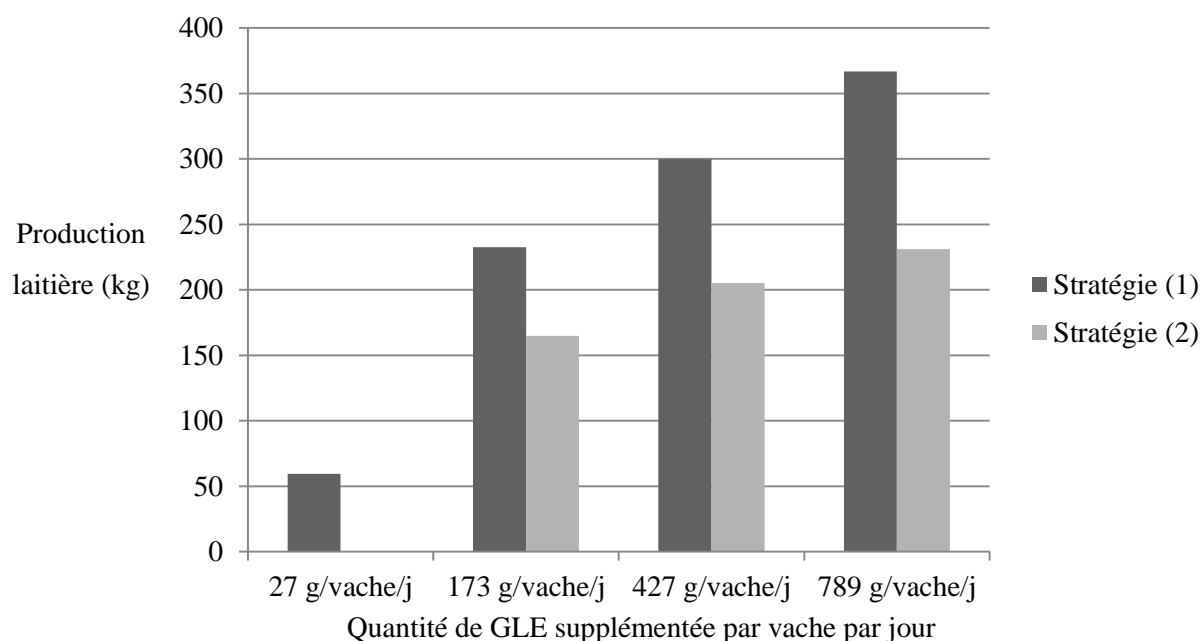
2463 **C. Résultats et discussion**

2464 **1. Effets sur les performances zootechniques du troupeau**

2465 Les performances du troupeau de référence (moyennes années 6 à 8) sont 8847 kg de
2466 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
2467 première insémination et 130,8 jours d'intervalle vêlage-IA fécondante.

2468 Les différences de performances du troupeau du scénario de référence avec les
2469 scénarios de supplémentation en GLE (stratégie 1, toutes les vaches) sont bien représentatives
2470 des hypothèses implémentées au niveau individuelle en amont (Figure 4.2, Figure 4.3, Figure
2471 4.4, Figure 4.5, Figure 4.6).

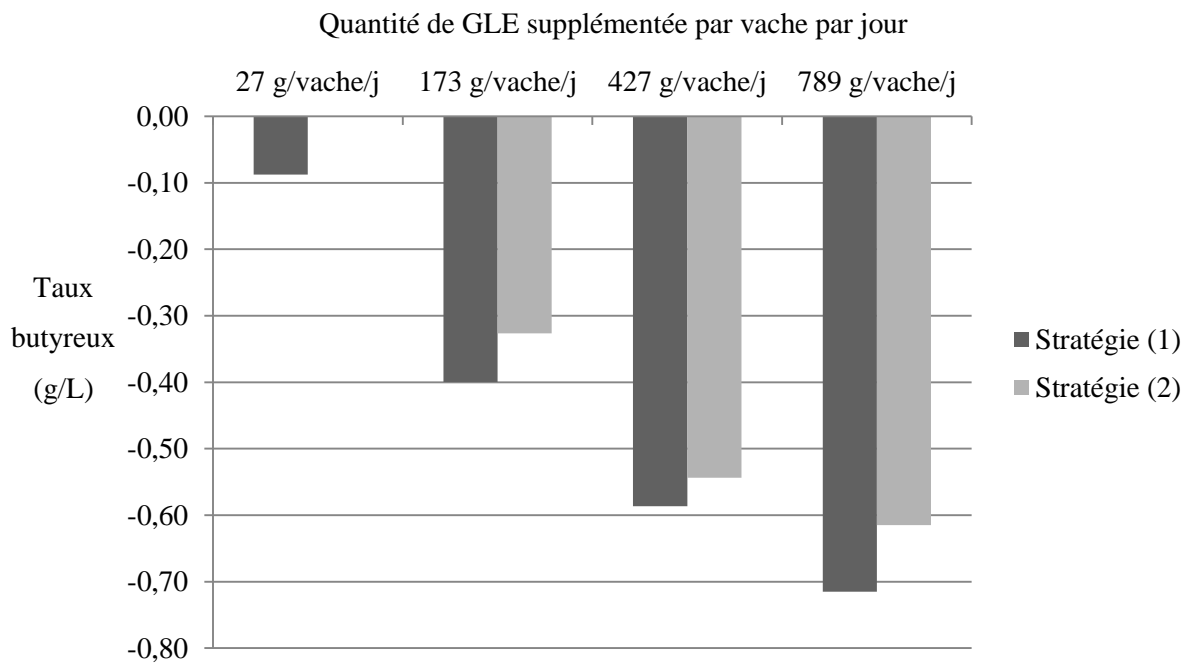
2472



2473

2474 **Figure 4.2** Ecarts de production laitière individuelle (kg) entre le scénario de référence et les sept
2475 scénarios de supplémentation en GLE (moyenne des moyennes années 6 à 8). Stratégie (1) : toutes les
2476 vaches sont supplémentées. Stratégie (2) : seulement les vaches dans les 180 jours après vêlage sont
2477 supplémentées.

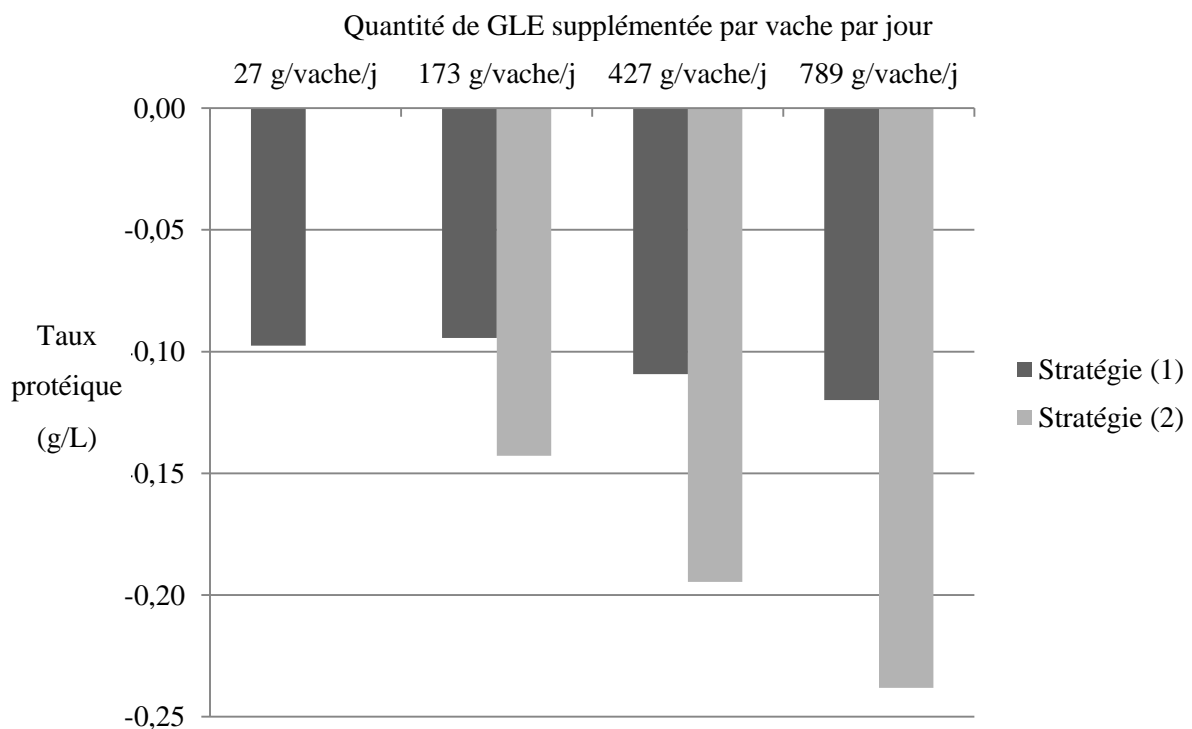
2478



2479

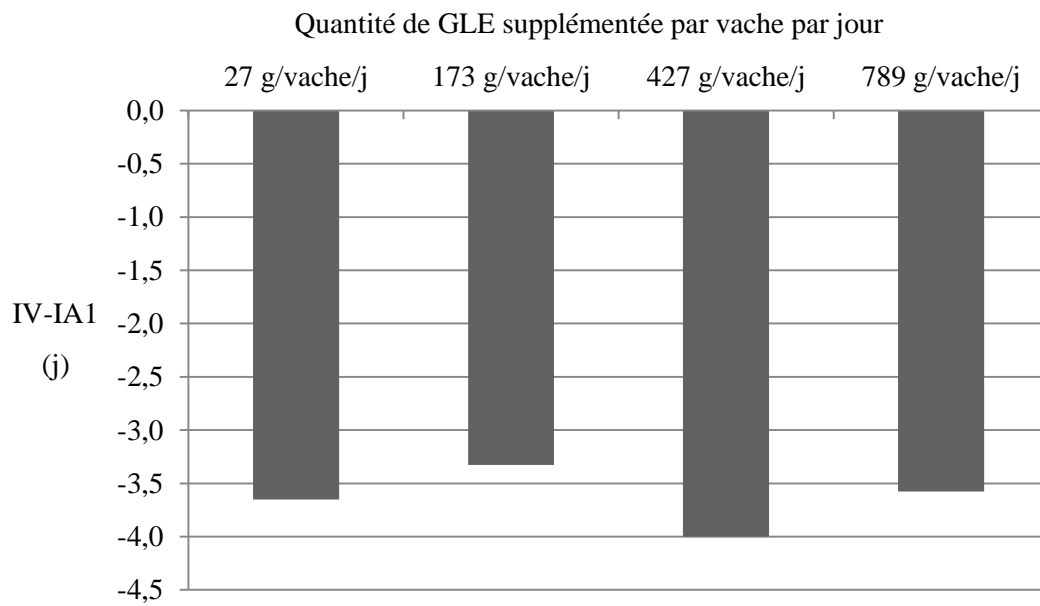
2480 **Figure 4.3** Ecarts de TB (g/L) entre le scénario de référence et les sept scénarios de supplémentation
 2481 en GLE (moyenne des moyennes années 6 à 8). Stratégie (1) : toutes les vaches sont supplémentées.
 2482 Stratégie (2) : seulement les vaches dans les 180 jours après vêlage sont supplémentées.

2483



2484

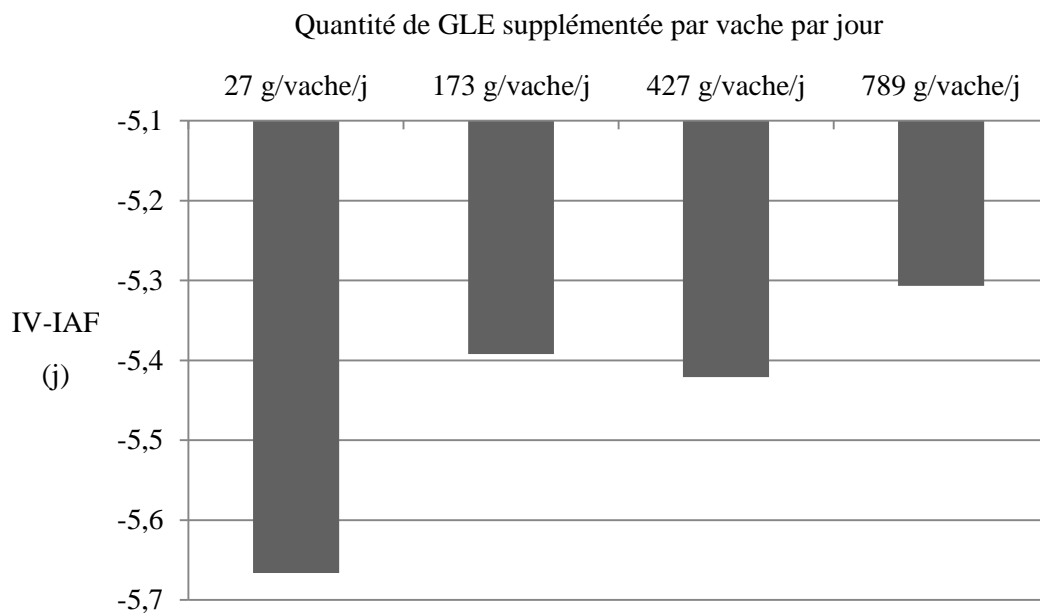
2485 **Figure 4.4** Ecarts de TP (g/L) entre le scénario de référence et les sept scénarios de supplémentation
 2486 en GLE (moyenne des moyennes années 6 à 8). Stratégie (1) : toutes les vaches sont supplémentées.
 2487 Stratégie (2) : seulement les vaches dans les 180 jours après vêlage sont supplémentées.



2488

2489 **Figure 4.5** Ecart d'intervalle-IA première entre le scénario de référence et les quatre principaux
 2490 scénarios de supplémentation en GLE (moyenne des moyennes années 6 à 8).

2491



2492

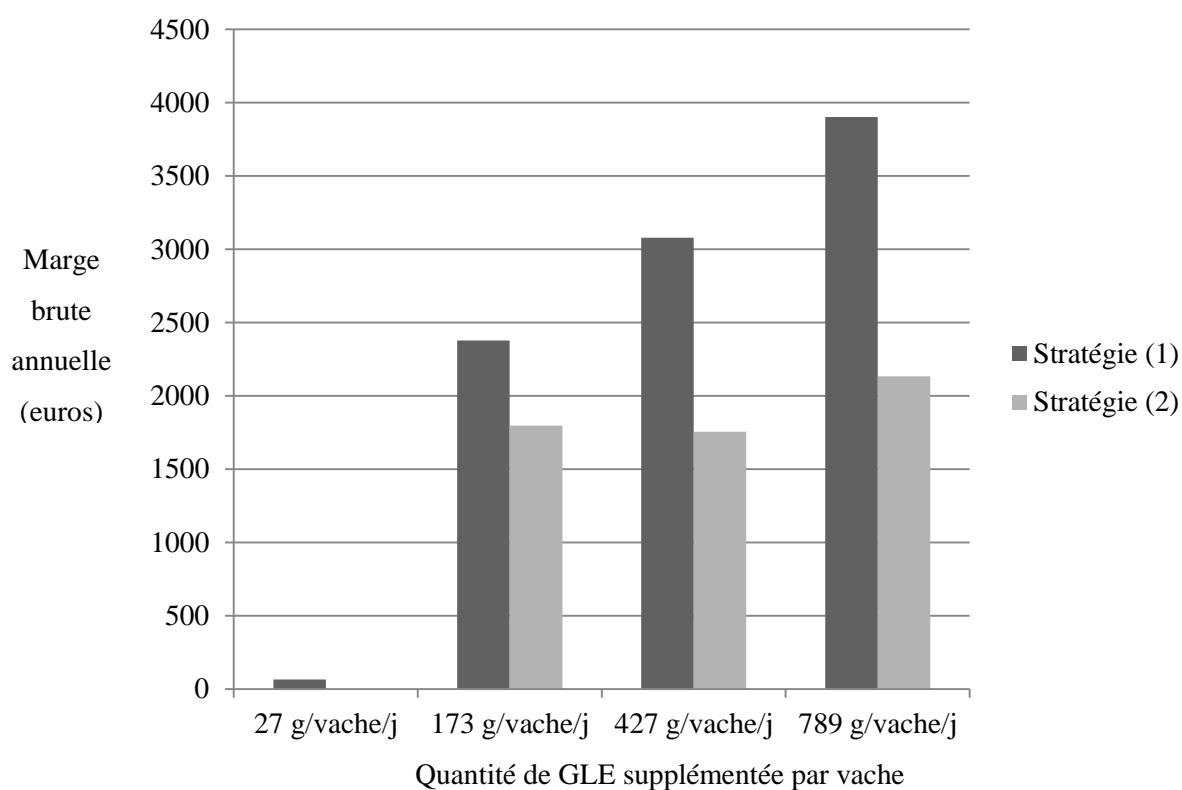
2493 **Figure 4.6** Ecart d'intervalle-IA fécondante entre le scénario de référence et les quatre principaux
 2494 scénarios de supplémentation en GLE (moyenne des moyennes années 6 à 8).

2495 Les performances du troupeau avec la stratégie de supplémentation uniquement aux
2496 vaches dans les 180 jours après leur vêlage sont aussi cohérentes puisqu'intermédiaires entre
2497 le scénario de référence et le scénario avec la même quantité de GLE supplémentée mais pour
2498 toutes les vaches (Figure 4.2, Figure 4.3, Figure 4.4).

2499 2. Effets sur les performances économiques de l'atelier

2500 Avant l'intégration du surcoût alimentaire lié à l'introduction de la GLE dans la ration,
2501 toutes les stratégies de supplémentation en GLE dégagent une marge supérieure par rapport à
2502 une absence de supplémentation en GLE (Figure 4.7). L'augmentation de production laitière
2503 et l'amélioration de l'intervalle vêlage-IA première améliorent donc plus la marge que la
2504 baisse des taux de matières utiles ne la pénalise. L'effet du gain uniquement lié à
2505 l'amélioration de l'IVIA1 observé pour la supplémentation de 27 g/vache/j de GLE reste
2506 faible : +65euros/an et contribue de façon très secondaire à l'amélioration de la marge pour
2507 les niveaux plus élevés de supplémentation en GLE.

2508

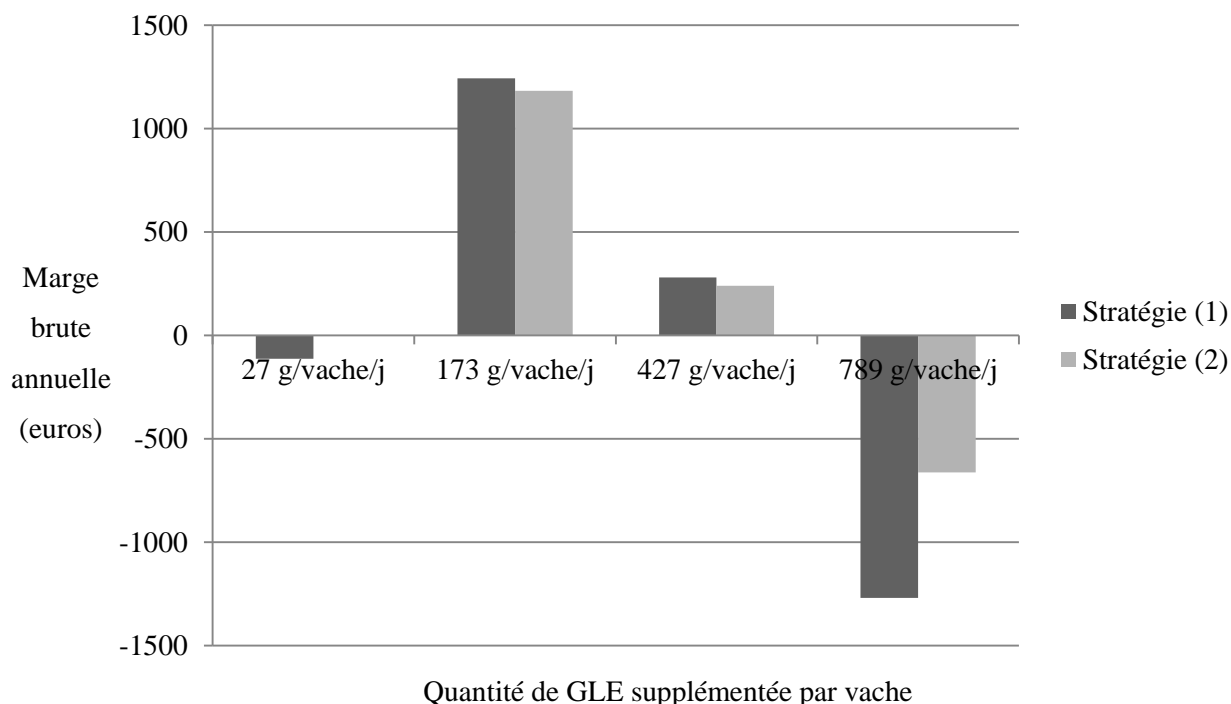


2509

2510 **Figure 4.7** Ecart de la marge brute annuelle (euros) entre le scénario de référence et les sept scénarios
2511 de supplémentation en GLE avant l'intégration du surcoût alimentaire lié à l'introduction de la GLE
2512 dans la ration (moyenne des moyennes années 6 à 8). Stratégie (1) : toutes les vaches sont

2513 supplémentées. Stratégie (2) : seulement les vaches dans les 180 jours après vêlage sont
2514 supplémentées.

2515
2516 L'amélioration de la marge brute avec la stratégie de supplémentation uniquement aux
2517 vaches dans les 180 jours après leur vêlage (stratégie 2) progresse de façon modérée avec la
2518 dose La différence de marge entre les trois supplémentations de la stratégie (1) est plus
2519 importante que la différence de marge entre ces mêmes supplémentations de la stratégie (2).



2520
2521 **Figure 4.8** Ecarts de la marge brute annuelle (euros) entre le scénario de référence et les sept scénarios
2522 de supplémentation en GLE après l'intégration du surcoût alimentaire lié à l'introduction de la GLE
2523 dans la ration (moyenne des moyennes années 6 à 8). Stratégie (1) : toutes les vaches sont
2524 supplémentées. Stratégie (2) : seulement les vaches dans les 180 jours après vêlage sont
2525 supplémentées.

2526
2527 Les conséquences économiques de l'utilisation de GLE varient d'un gain de marge
2528 brute de 1243 euros/an pour une supplémentation modeste en GLE (173 g/vache/j) à une perte
2529 de 1268 euros/an pour une supplémentation élevée en GLE (789 g/vache/j). Dans les
2530 exploitations utilisant les niveaux de supplémentation 27 g/vache/j et 427 g/vache/j, le surcoût
2531 de l'introduction de GLE dans la ration compense le gain économique lié à l'amélioration des
2532 performances animales.

2533 Pour la supplémentation la plus élevée (789 g/vache/j), l'éleveur peut toutefois
2534 bénéficier d'une prime de 14 euros/1000L si le lait produit sur son exploitation est collecté en
2535 BBC, ce qui représenterait pour l'élevage du simulateur un produit supplémentaire de 6640
2536 euros par an, et donc un gain final de marge brute finale de 5372 euros/an. La compensation
2537 financière nécessaire pour ne faire que maintenir le résultat économique initial de l'élevage
2538 simulé devrait être de 2,6 euros/1000L dans le contexte de la filière BBC alors que l'étude de
2539 Béguin et al. (2009) rapportait des compensations variant de 4,7 à 13,7 euros/1000L. La
2540 sévérité de leurs hypothèses techniques est à l'origine de cette différence.

2541 Les conséquences économiques de l'utilisation de GLE sont probablement sous-
2542 estimées dans notre étude. En effet, nous n'avons pas pris en compte l'effet de la
2543 supplémentation en GLE sur la persistance des mammites subcliniques qui pourraient se
2544 traduire par un gain de production laitière, une baisse de pénalités pour une concentration en
2545 cellules somatiques du lait élevée et enfin une diminution des traitements antibiotiques. De
2546 plus, l'effet gain de travail induit par l'amélioration de la fécondité n'a pas non plus été pris
2547 en compte. Enfin, des externalités positives comme la réduction d'émission de méthane
2548 entérique induit par la supplémentation en GLE (Martin et al., 2008, 2016) n'ont pas été pris
2549 en compte.

2550 Les conséquences économiques de l'utilisation de GLE issues de cette étude ont été
2551 estimées dans un système d'élevage particulier. L'extrapolation à d'autres systèmes d'élevage
2552 devrait se faire avec prudence.

2553 **D. Conclusion**

2554 Les conséquences économiques de l'utilisation de GLE varient d'un gain de marge
2555 brute de 1243 euros/an pour une supplémentation modeste en GLE (173 g/vache/j) à une perte
2556 de 1268 euros/an pour une supplémentation élevée en GLE (789 g/vache/j) pour un système
2557 d'élevage type breton composé de 50 vaches laitières produisant 9000L de lait par an. Le gain
2558 économique lié à l'utilisation de GLE s'explique essentiellement par l'amélioration de la
2559 production laitière individuelle. Dans le cas de la filière BBC, la prime accordée sur la qualité
2560 nutritionnelle du lait permet de dégager une marge brute intéressante par rapport au scénario
2561 de référence : +5372 euros/an pour un quota de 450000L.

2562 **E. Références**

2563 Béguin, E., P. Brunschwig, G. Heumez, C. Garnier, and B. Gilles. 2009. Enrichir le lait en
2564 oméga 3 avec la graine de lin - Impact technico-économique d'un concentré à base de
2565 graine de lin extrudée dans 2 systèmes fourragers. Institut de l'Elevage, Paris. 1-12 pp.

- 2566 Dezetter, C. 2015. Evaluation de l'intérêt du croisement entre races bovines laitières. Oniris.
2567 225 pp.
- 2568 Dezetter, C., N. Bareille, D. Billon, C. Côrtes, C. Lechartier, and H. Seegers. 2017. Changes
2569 in animal performance and profitability of Holstein dairy operations after introduction of
2570 crossbreeding with Montbéliarde, Normande, and Scandinavian Red. *J. Dairy Sci.*
2571 100:8239–8264. doi:10.3168/jds.2016-11436.
- 2572 Hofmann, M. 2005. On the Complexity of Parameter Calibration in Simulation Models. *J.*
2573 *Def. Model. Simul. Appl. Methodol. Technol.* 2:217–226.
2574 doi:10.1177/154851290500200405.
- 2575 Inchaisri, C., R. Jorritsma, P.L.A.M. Vos, G.C. van der Weijden, and H. Hogeveen. 2010.
2576 Economic consequences of reproductive performance in dairy cattle. *Theriogenology.*
2577 74:835–846. doi:10.1016/j.theriogenology.2010.04.008.
- 2578 Kalantari, A.S., and V.E. Cabrera. 2012. The effect of reproductive performance on the dairy
2579 cattle herd value assessed by integrating a daily dynamic programming model with a
2580 daily Markov chain model. *J. Dairy Sci.* 95:6160–6170. doi:10.3168/jds.2012-5587.
- 2581 Martin, C., A. Ferlay, P. Mosoni, Y. Rochette, Y. Chilliard, and M. Doreau. 2016. Increasing
2582 linseed supply in dairy cow diets based on hay or corn silage: Effect on enteric methane
2583 emission, rumen microbial fermentation, and digestion. *J. Dairy Sci.* 99:3445–3456.
2584 doi:10.3168/jds.2015-10110.
- 2585 Martin, C., J. Rouel, J.P. Jouany, M. Doreau, and Y. Chilliard. 2008. Methane output and diet
2586 digestibility in response to feeding dairy cows crude linseed, extruded linseed, or linseed
2587 oil. *J. Anim. Sci.* 86:2642–2650. doi:10.2527/jas.2007-0774.
- 2588 Seegers, H., C. Fourichon, and F. Beaudeau. 2003. Production effects related to mastitis and
2589 mastitis economics in dairy cattle herds. *Vet. Res.* 34:475–491.
2590 doi:10.1051/vetres:2003027.
- 2591 Sunnåker, M., A.G. Busetto, E. Numminen, J. Corander, M. Foll, and C. Dessimoz. 2013.
2592 Approximate Bayesian Computation. *PLoS Comput. Biol.* 9:e1002803.
2593 doi:10.1371/journal.pcbi.1002803.
- 2594 Toni, T., D. Welch, N. Strelkowa, A. Ipsen, and M.P. Stumpf. 2009. Approximate Bayesian
2595 computation scheme for parameter inference and model selection in dynamical systems.
2596 *J. R. Soc. Interface.* 6:187–202. doi:10.1098/rsif.2008.0172.
- 2597 De Vries, A. 2006. Economic Value of Pregnancy in Dairy Cattle. *J. Dairy Sci.* 89:3876–
2598 3885. doi:10.3168/jds.S0022-0302(06)72430-4.
- 2599

2600 **Chapitre V. Discussion générale**

2601 **A. Réponses aux besoins de recherche**

2602 Rappelons ici que l'objectif de la thèse était de produire des connaissances sur les
2603 effets de l'utilisation de la GLE sur les performances animales en élevage bovin laitier, puis
2604 d'en estimer les conséquences économiques au niveau de l'exploitation bovine laitière. Nous
2605 avons ainsi estimé les effets de la GLE sur les performances laitières (production laitière et
2606 taux de matières utiles), la composition en acides gras du lait, les performances de
2607 reproduction, l'incidence et la persistance des mammites subcliniques, par deux approches
2608 scientifiques mobilisant deux sources de données complémentaires : la méta-analyse
2609 mobilisant la littérature scientifique, et l'épidémiologie observationnelle mobilisant les
2610 données des élevages commerciaux. Les conséquences économiques de l'utilisation de la
2611 GLE ont été explorées à partir des connaissances produites sur les réponses animales selon
2612 quatre niveaux de supplémentation par simulations.

2613 *a) Une objectivation des effets de la graine de lin extrudée sur les* 2614 *performances animales en conditions de terrain*

2615 Le premier enjeu résidait dans l'estimation des réponses animales à une
2616 supplémentation en GLE dans ses conditions d'utilisation actuelles. Ainsi, nous avons
2617 constaté, par une méta-analyse de la littérature scientifique, une utilisation de la GLE dans des
2618 quantités très supérieures à celles que l'entreprise préconise et que l'on a par la suite estimées
2619 dans l'étude épidémiologique à partir des données de livraisons de produits commerciaux à
2620 base de GLE. De ce fait, les résultats observés dans ces essais expérimentaux apparaissaient
2621 difficilement transférables aux élevages commerciaux puisque la quantité de lipides
2622 supplémentés sous forme d'AGPI est un des facteurs les plus importants dans la réussite de
2623 cette pratique. Cette analyse de la littérature justifiait alors déjà la pertinence du cœur du
2624 travail de thèse : l'étude de la GLE sur les performances animales en élevages commerciaux.
2625 De plus, la littérature scientifique sur les performances de reproduction était rare (la finalité
2626 des expérimentations étant souvent l'étude des éléments de fonction de la reproduction plutôt
2627 que des performances de reproduction) et les essais souvent mal décrits/reportés/réalisés. Ces
2628 deux points étaient soulignés aussi par Rodney et al. (2015) à plusieurs reprises dans leur
2629 récente méta-analyse du lien entre supplémentation lipidique et performances de reproduction.
2630 Ainsi, notre étude épidémiologique exposé/non exposé rétrospective, basée sur les données de

2631 plus de 1200 élevages commerciaux dans des conditions d'utilisation actuelles de la GLE était
2632 pleinement justifiée.

2633 Bien que notre caractérisation de l'exposition à la GLE soit soumise aux biais de
2634 distribution et d'ingestion différenciées entre vaches, les quantités journalières de GLE
2635 estimées étaient 4 fois plus faibles que celles utilisées par les chercheurs dans les essais
2636 expérimentaux avec en moyenne environ 300 g de GLE par vache en lactation. L'exploration
2637 des relations entre quantité de GLE et amplitude des effets sur les performances de
2638 production laitière nous a confortés dans la validité de la méthode d'estimation des quantités
2639 journalières de GLE à partir des livraisons d'aliments commerciaux contenant de la GLE. A
2640 titre d'exemple, les effets estimés sur le TB étaient, d'une part, en cohérence avec les
2641 mécanismes biologiques connus que nous avons rappelés dans la discussion de la méta-
2642 analyse, et d'autre part, parfaitement proportionnels à la dose de GLE et à la parité des vaches
2643 alors qu'ils ont été estimés avec des modèles distincts par parité. Que retenir comme ordres de
2644 grandeur des effets sur la production laitière associés à la consommation de GLE par les
2645 vaches laitières ? A la dose la plus utilisée sur le terrain, entre 50g et 300g par vache et par
2646 jour, une vache laitière en deuxième lactation produit 0,7 kg/j de lait en plus, 0,4 g/kg de TB
2647 et 0,03 g/kg de TP en moins.

2648 Notre étude a permis de quantifier les effets associés aux performances de
2649 reproduction : une vache supplémentée en GLE, même à petite dose, a été inséminée pour la
2650 première fois, puis fécondée, environ 3 à 4 jours plus tôt qu'une vache n'en recevant pas, sans
2651 que la fertilité n'ait été modifiée. Elle apporte enfin des connaissances réellement originales
2652 sur les effets associés à une maladie à composante infectieuse, les mammites, montrant un
2653 moindre risque de persistance de mammites subcliniques chez une vache supplémentée en
2654 GLE.

2655 La quantification des effets de la GLE sur les performances animales en conditions de
2656 terrain pourrait être biaisée par un facteur de confusion lié au meilleur conseil et suivi des
2657 élevages utilisant des produits à base de GLE ainsi qu'à une amélioration de l'attention de
2658 l'éleveur lorsqu'il utilise un aliment coûteux. Magrini et Duru (2014) en se basant sur des
2659 entretiens avec des groupements de producteurs du label Bleu-Blanc-Cœur (**BBC**) évoquent
2660 qu'il « est parfois difficile de distinguer les effets positifs de cette complémentation en lin des
2661 effets directement liés à un meilleur suivi des élevages ». Ainsi, le suivi régulier de la ration
2662 pour veiller au respect du cahier des charges BBC s'accompagne d'un appui plus personnalisé
2663 pour la maîtrise du système d'élevage (Magrini et Duru, 2014). L'obligation de résultat dans
2664 cette filière BBC impose aux éleveurs d'utiliser des quantités assez élevées de GLE assez

2665 difficiles à maîtriser au vu des interactions digestives expliquées dans le chapitre 1.
2666 Cependant, on peut supposer qu'étant donnée la linéarité des associations quantité-effet
2667 observées entre la GLE et les réponses des performances de production dans notre étude,
2668 l'effet de ce facteur de confusion reste faible. De plus, l'inclusion de performances obtenues
2669 avant ou après les supplémentations en GLE intra-élevage sur tout le territoire français a
2670 limité l'effet de ce facteur de confusion.

2671 Nous avons souvent relié au cours des chapitres précédents l'effet de la GLE à celui de
2672 l'ALA, qui représente environ 22% de la GLE, même si nous avons étudié l'exposition à la
2673 GLE et non à l'ALA. Les éleveurs ont pu apporter de l'ALA aux animaux via d'autres
2674 sources que la GLE Tradi-Lin. Cependant, l'information sur les rations distribuées aux vaches
2675 dans les élevages de notre étude n'était pas disponible de façon rétrospective. Un biais de
2676 confusion lié à d'autres apports alimentaires d'ALA a pu exister mais nous l'avons considéré
2677 comme faible par analyse de 3 sources d'apports non tracés potentiels. Premièrement, il est
2678 peu probable que l'éleveur ait pu acheter d'autres formes de lin ou d'autres GLE auprès de
2679 fournisseurs non partenaires de l'étude étant donnée la position monopolistique de Valorex en
2680 France. Deuxièmement, une autre source d'ALA est le concentré protéique de luzerne.
2681 Cependant, sa teneur en ALA reste faible par rapport à celle de la GLE (environ 6 fois moins
2682 entre les deux produits commerciaux composés l'un d'1 kg de concentré protéique de luzerne
2683 et l'autre de 0,7 kg de GLE dans l'essai de Hurtaud et al. (2013)), son intérêt étant plutôt un
2684 apport de protéines. Enfin, troisièmement, la dernière source intéressante d'ALA est l'herbe.
2685 Sa teneur en ALA est fonction d'une part, de son stade végétatif avec une teneur la plus
2686 élevée au printemps d'après la méta-analyse de Glasser et al. (2013), et d'autre part, de
2687 l'espèce, variant de 49 g/100 g total AG en moyenne pour du trèfle violet à 61 g/100 g total
2688 AG pour du ryegrass. Cette méta-analyse apporte une autre information essentielle qui est
2689 finalement assez peu discutée et rarement évoquée : l'effet du mode de récolte, ensilage ou
2690 foin apparait peu important au regard de la variabilité liée au stade végétatif (Glasser et al.,
2691 2013), mis à part un foin récolté dans de mauvaises conditions pouvant diminuer par deux la
2692 teneur en ALA. Or, nous faisons souvent l'hypothèse d'un facteur de confusion lié à la saison
2693 par l'apport d'ALA au pâturage de printemps. Mais, finalement, les quantités d'herbe ingérées
2694 par le pâturage ne sont pas forcément plus importantes que celles ingérées par le foin et
2695 l'ensilage d'herbe en hiver, et donc d'ALA. Nous avons toutefois réalisé les modèles
2696 statistiques de l'étude épidémiologique sur les variables de production uniquement en période
2697 hivernale afin d'étudier cet effet saison. Cependant, aucune différence dans les effets estimés
2698 de l'exposition à la GLE n'a été observée. Une baisse du TB est observée sur les mois de mars

2699 à septembre par rapport aux mois d'hiver (Tableau 2.9), pouvant correspondre à l'apport
2700 d'ALA via l'herbe pâturée. Cet effet est cependant plus difficile à objectiver sur les
2701 performances de reproduction étant donnée la durée importante d'exposition requise pour
2702 l'inclusion d'une IA dans nos modèles (du vêlage jusqu'à 17 jours après l'IA). De plus, un
2703 autre facteur de confusion entre en jeu puisque les chaleurs seraient mieux détectées au
2704 printemps par l'éleveur grâce à des signaux comportementaux comme le chevauchement plus
2705 exprimés au pâturage (Cutullic et al., 2009).

2706 ***b) Une variabilité de ces performances difficile à explorer***

2707 L'étude épidémiologique ne nous a permis d'estimer qu'un effet moyen de la
2708 supplémentation en GLE à partir de 1200 élevages sur les performances animales, de la
2709 production à la santé. Or, la méta-analyse nous avait confirmé une information importante :
2710 l'effet d'interaction entre la supplémentation en GLE et la ration associée. Le nombre limité
2711 de données (n = 29) par rapport à l'hétérogénéité des rations rencontrées dans les essais ne
2712 nous a pas permis d'identifier finement les caractéristiques physico-chimiques de la ration
2713 modulant les effets de la GLE. Mais nous avons quand même mis en évidence l'effet de
2714 certains fourrages : un apport élevé d'ensilage de maïs agit négativement sur le TB tandis que
2715 l'apport de foin de luzerne semble exercer un pouvoir tampon dans le rumen qui neutralise cet
2716 effet. L'influence de la ration associée à la GLE n'a pas pu être analysée dans l'étude
2717 épidémiologique du fait du caractère rétrospectif de l'étude. On peut faire l'hypothèse que
2718 l'utilisation des données de rations des entreprises de conseil en élevage (une donnée par mois
2719 au niveau troupeau) aurait pu apporter des connaissances sur l'effet de la nature des fourrages
2720 avec des quantités de GLE modestes. Nous avons essayé de corriger des effets estimés de la
2721 supplémentation en GLE, les effets pédoclimatiques, et par extrapolation les effets fourrages,
2722 en incluant la variable décrivant la zone géographique dans chacun de nos modèles.
2723 Cependant, les effets ont été compliqués à analyser, encore plus lorsque des interactions ont
2724 été testées. Enfin, la variabilité des réponses aurait été intéressante à caractériser aussi en
2725 fonction de l'apport d'herbe de la ration afin de répondre à la question posée précédemment
2726 des facteurs de confusion d'apport d'ALA sous forme d'herbe.

2727 Les hypothèses que nous avons dû prendre pour mesurer l'exposition (début de la
2728 distribution de la livraison des produits à base de GLE le lendemain de l'arrivée de la
2729 livraison sur la ferme, quantité identique distribuée à chaque vache en lactation quels que
2730 soient son stade de lactation et son niveau de production laitière) nous ont contraints à ne pas
2731 explorer l'influence du timing de supplémentation en GLE. En effet, pour sécuriser la

2732 séquence temporelle d'exposition, nous avons inclus d'une part, des troupeaux avec des
2733 livraisons régulières de produits à base de GLE, et d'autre part, uniquement des IAs réalisées
2734 sur des vaches supplémentées du vêlage jusqu'à 17 jours après l'IA. Or, nous pouvons faire
2735 l'hypothèse que ce timing est important pour l'étude des performances de reproduction et que
2736 des périodes devraient être ciblées en priorité en fonction des effets biologiques des AG
2737 supplémentés (Silvestre et al., 2011; Dirandeh et al., 2013). Nous ne pouvons pas nous
2738 attendre au même effet lorsque l'on supplémente de J0 à J40 après vêlage ou qu'à partir de
2739 J30 ou J50. Les expérimentations devraient être plus rigoureuses sur ce paramètre ; souvent le
2740 choix du début de la supplémentation en AGPI post-partum n'est ni discuté ni justifié. Nous
2741 avons essayé d'étudier les performances de reproduction en assouplissant la règle d'inclusion
2742 des IAs, par exemple inclure les IAs dont l'exposition a débuté seulement au moins 21 jours
2743 ou 42 jours avant, le nombre de données était faiblement réduit ce qui ne nous a pas permis
2744 d'observer de changement dans les résultats.

2745 *c) Une analyse économique simplifiée*

2746 Les conséquences économiques de l'utilisation de GLE varient d'un gain de marge
2747 brute de 1243 euros/an pour une supplémentation modeste en GLE (173 g/vache/j) à une perte
2748 de 1268 euros/an pour une supplémentation élevée en GLE (789 g/vache/j). Cependant, pour
2749 l'exploitation simulée, l'utilisation de cette supplémentation élevée en GLE, si on applique la
2750 prime BBC de 14 euros/1000L, permet un gain de marge brute de 5372 euros/an.

2751 Le manque d'analyse de la variabilité des effets de la supplémentation en GLE selon la
2752 ration à laquelle elle était associée, nous a contraints dans le choix de nos scénarios de
2753 simulation pour estimer les conséquences économiques de l'utilisation de la GLE. En effet,
2754 seulement la notion de quantité de GLE supplémentée a pu être étudiée. La notion de timing
2755 de la supplémentation en GLE (pris en compte grossièrement : toute la lactation ou seulement
2756 durant les 180 premiers jours de lactation) a été étudié, d'une part pour un intérêt
2757 zootechnique avec l'usage de la GLE pour améliorer la reproduction, et d'autre part, pour ne
2758 pas faire d'inférence par rapport à nos résultats de l'étude épidémiologique.

2759 Les simulations économiques n'ont été réalisées qu'à partir du système d'élevage type
2760 breton. Pourtant, il aurait été intéressant d'explorer les conséquences économiques de
2761 l'utilisation de la GLE dans un deuxième système d'élevage, celui rencontré dans le
2762 département du Doubs où de nombreux éleveurs utilisent de GLE dans leur troupeau. En
2763 effet, le contexte de prix (valorisation du lait en AOP), de la ration (cahier des charges AOP,
2764 valorisation de l'herbe, interdiction ensilage de maïs) et le choix de la race sont différents.

2765 Cependant, les analyses de l'effet de la supplémentation en GLE sur les performances de
2766 production et de reproduction chez la vache Montbéliarde n'ont été que partiellement
2767 réalisées faute de temps. De plus, le manque d'information pour prendre en compte la
2768 variabilité des effets de la GLE selon la ration associée en conditions de terrain ont rendu les
2769 simulations dans ce système herbager moins intéressantes.

2770 **B. Des résultats de la recherche au terrain : de nouveaux**
2771 **positionnements de l'utilisation de la graine de lin extrudée hors et dans la**
2772 **filière Bleu-Blanc-Cœur**

2773 L'effet bénéfique associé à la supplémentation de faibles doses de GLE sur la
2774 reproduction des vaches laitières que nous avons mis en évidence permet d'envisager le
2775 développement de l'utilisation de la GLE par des éleveurs peu attirés par le discours
2776 d'intensification laitière à l'animal. Ainsi, beaucoup d'éleveurs pourraient intégrer de la GLE
2777 à moindre coût dans la ration de leurs animaux pour bénéficier des effets positifs sur la
2778 reproduction. De plus, le nouveau chapitre que l'on a ouvert sur le lien entre GLE et santé des
2779 vaches laitières pourrait aussi les intéresser. La supplémentation en GLE en petites quantités
2780 pourrait ainsi trouver sa place chez des éleveurs qui cherchent avant tout à bien valoriser leur
2781 herbe.

2782 Au sein de la filière BBC, la valorisation du concept de « one health » pourrait être
2783 intéressante. Ainsi, Magrini et Duru (2014) ont axé la discussion de l'analyse de la filière
2784 BBC sur l'ouverture du label à des systèmes plus autonomes et herbagers via la dimension
2785 environnementale. Cependant l'obligation de résultats, sur le niveau d'AG n-3 à atteindre,
2786 reste une contrainte à l'entrée des éleveurs dans le label sous sa forme actuelle. Refaire le lien
2787 nutrition-santé mais cette fois via la santé des animaux à l'aide de ces nouvelles
2788 connaissances scientifiques permettrait de revenir à la base du label de BBC développé pour
2789 des raisons de santé humaine.

2790 Les nouvelles connaissances apportées sur la reproduction et la santé animales
2791 permettent d'envisager un rapprochement de ces deux « voies » d'utilisation de la GLE (hors
2792 ou dans la filière BBC) par un intérêt économique qui va au-delà de la prime qualité du lait de
2793 BBC : l'objectif d'une triple performance santé-environnement-économie via la nutrition
2794 animale.

2795 **C. Des nouvelles voies scientifiques à explorer par l'épidémiologie mais**
2796 **aussi par l'essai expérimental**

2797 Les connaissances scientifiques créées sur l'association entre la supplémentation en
2798 GLE et les performances de reproduction et de santé ouvrent la voie à de nouvelles recherches
2799 à conduire, par l'épidémiologie mais aussi par l'expérimentation.

2800 *a) Une étude prospective nécessaire pour étudier la santé des*
2801 *veaux*

2802 Nous évoquons dans l'introduction des éléments sur lien entre supplémentation en
2803 GLE et santé des veaux. L'effet d'une supplémentation en GLE chez la mère au tarissement
2804 (ou en lactation avec l'hypothèse d'une lipomobilisation des AG n-3 en début de la lactation
2805 suivante) permet de modifier la composition en AG du colostrum vers un profil qui serait plus
2806 favorable à la santé des veaux (Santschi et al., 2009; Leiber et al., 2011; Lerch et al., 2015).
2807 Des travaux intéressants ont été menés avec cette idée de transfert très précoce au veau, mais
2808 avec des apports d'aliments riches en AGPI plutôt en acide linoléique (**LA**) (Garcia et al.,
2809 2014a; b, 2016b), ou bien avec des sources riche en AG n-3 (Moallem and Zachut, 2012). Ces
2810 derniers ne sont pas allés au bout de leur idée en se limitant seulement à l'étude du transfert
2811 placentaire par la composition en AG du plasma sanguin du veau nouveau-né. Les travaux de
2812 Garcia et al. ont montré que l'ingestion de ce colostrum issu de mères supplémentées en AGS
2813 ou en AGPI pourrait aussi favoriser l'absorption des immunoglobulines G (**IgG**) (Garcia et
2814 al., 2014a). Plusieurs hypothèses pourraient expliquer ce phénomène. La supplémentation en
2815 AG pourrait modifier l'activité du récepteur FcRn du tractus intestinal impliqué dans le
2816 passage des IgG du colostrum dans l'intestin des veaux par un changement dans la
2817 composition en AG des membranes cellulaires. De plus, une amélioration de la fluidité
2818 membranaire grâce aux AGPI permettrait d'améliorer aussi la circulation des IgG. Enfin, une
2819 hypothèse spécifique au rôle des AG n-3 pourrait être émise sur un taux de vidange gastrique
2820 plus rapide chez des veaux ayant reçu un colostrum plus riche en AG n-3, favorisant une
2821 absorption plus rapide des IgG dans l'intestin.

2822 La supplémentation en AGPI des veaux sevrés contribue à améliorer leur santé et leurs
2823 performances. Ainsi, de nombreux essais expérimentations ont montré une augmentation du
2824 gain moyen quotidien et de l'efficacité alimentaire, une réduction du nombre de jours avec
2825 diarrhée, ainsi qu'une modification des réponses immunitaires et inflammatoires après
2826 vaccination, lors d'enrichissement de leur aliment d'allaitement ou aliment de démarrage en
2827 ALA et en LA (Hill et al., 2007a; b; c, 2009, 2011, Garcia et al., 2015, 2016b).

2828 Les éléments de connaissance sur la supplémentation des vaches en fin de gestation
2829 peuvent pourtant être considérés suffisamment probants pour quantifier les bénéfices pour la
2830 santé et la croissance des veaux en conditions de terrain, où l'exposition aux agents
2831 pathogènes pourrait permettre de mieux extérioriser les effets bénéfiques de l'alimentation
2832 reçue par les veaux. Cependant, les bases de données nationales ne peuvent renseigner que sur
2833 la mortalité des veaux, indicateur sanitaire qui ne permet pas de juger spécifiquement des
2834 capacités de défense immunitaire du veau. Ainsi, une étude épidémiologique prospective de
2835 type exposé/non exposé avec suivi de la survenue de troubles de santé des veaux, voire aussi
2836 de la qualité du colostrum et de l'efficacité transfert immunité passive chez le nouveau-né,
2837 pourrait venir compléter nos travaux.

2838 ***b) Une exploration complémentaire des effets trans-***
2839 ***générationnels***

2840 Garcia et al. (2016a) sont allés jusqu'au bout de leurs études sur le lien entre
2841 supplémentation en AGPI et santé des veaux puisqu'ils ont aussi étudié les performances des
2842 génisses en première lactation en fonction de leur exposition fœtale aux AG, afin d'explorer
2843 les effets dit trans-générationnels. Leurs résultats sont assez peu intéressants et souffrent
2844 d'une manque de puissance statistique mais leur expérimentation n'était pas forcément faite
2845 pour étudier spécifiquement ces effets.

2846 Nous avons aussi commencé à étudier ces effets en comparant les
2847 performances de reproduction de vaches exposées ou non à la GLE au cours de la période
2848 fœtale dans une approche aussi exploratoire. Nos résultats provisoires indiquent que la
2849 fécondité des vaches exposées *in utero* sont meilleures que celles non exposées même si elles
2850 ne reçoivent pas de GLE elles-mêmes. Une sécurisation de la mesure de l'exposition et des
2851 facteurs d'ajustement introduits dans les modèles doit être réalisée avant publication de ce
2852 résultat.

2853 En plus de l'exploration des effets que nous avons commencé à explorer avec les
2854 données à notre disposition, l'étude prospective envisagée ci-dessus à partir de vaches
2855 gestantes exposées ou non à la GLE pourraient permettre aussi d'estimer les effets de la GLE
2856 reçue *in utero* sur les performances laitières et de reproduction des génisses durant leur
2857 première lactation.

2858 *c) Des mécanismes biologiques complexes, à élucider par*
2859 *l'expérimentation*

2860 L'étude épidémiologique nous a permis de mettre en évidence supplémentation en
2861 GLE associée à une réduction de l'intervalle-vêlage-IA1. Nous avons notamment fait
2862 l'hypothèse que les chaleurs seraient mieux exprimées grâce à l'ALA mais aussi grâce aux
2863 lignanes, qui sont des polyphénols anti-oxydants mais aussi des phytoestrogènes. Cependant,
2864 la littérature scientifique est très rare sur ce sujet. La principale difficulté pour comprendre les
2865 mécanismes biologiques des effets zootechniques de la GLE sur la reproduction et la santé
2866 sera d'identifier quels sont les agents biologiques en cause et quels effets biologiques associés
2867 sont à prendre en compte : stress oxydatif, inflammation, etc. L'épidémiologie ne peut que
2868 quantifier les associations entre exposition et évènement de santé ou de reproduction,
2869 l'expérimentation doit compléter cette approche pour prouver le lien de causalité.

2870 **D. Références**

- 2871 Cutullic, E., L. Delaby, D. Causeur, G. Michel, and C. Disenhaus. 2009. Hierarchy of factors
2872 affecting behavioural signs used for oestrus detection of Holstein and Normande dairy
2873 cows in a seasonal calving system. *Anim. Reprod. Sci.* 113:22–37.
2874 doi:10.1016/j.anireprosci.2008.07.001.
- 2875 Dirandeh, E., A. Towhidi, S. Zeinoaldini, M. Ganjkanlou, Z. Ansari Pirsaraei, and A.
2876 Fouladi-Nashta. 2013. Effects of different polyunsaturated fatty acid supplementations
2877 during the postpartum periods of early lactating dairy cows on milk yield, metabolic
2878 responses, and reproductive performances. *J. Anim. Sci.* 91:713–721.
2879 doi:10.2527/jas.2012-5359.
- 2880 Garcia, M., L.F. Greco, E. Block, J.E.P. Santos, W.W. Thatcher, and C.R. Staples. 2016a.
2881 Programming effect of dietary fatty acids on performance of Holstein heifers from birth
2882 through first lactation. *Anim. Feed Sci. Technol.* 222:64–74.
2883 doi:10.1016/j.anifeedsci.2016.10.003.
- 2884 Garcia, M., L.F. Greco, M.G. Favoreto, R.S. Marsola, L.T. Martins, R.S. Bisinotto, J.H. Shin,
2885 A.L. Lock, E. Block, W.W. Thatcher, J.E.P. Santos, and C.R. Staples. 2014a. Effect of
2886 supplementing fat to pregnant nonlactating cows on colostral fatty acid profile and
2887 passive immunity of the newborn calf. *J. Dairy Sci.* 97:392–405. doi:10.3168/jds.2013-
2888 7086.
- 2889 Garcia, M., L.F. Greco, M.G. Favoreto, R.S. Marsola, D. Wang, J.H. Shin, E. Block, W.W.
2890 Thatcher, J.E.P. Santos, and C.R. Staples. 2014b. Effect of supplementing essential fatty

2891 acids to pregnant nonlactating Holstein cows and their preweaned calves on calf
2892 performance, immune response, and health. *J. Dairy Sci.* 97:5045–5064.
2893 doi:10.3168/jds.2013-7473.

2894 Garcia, M., L.F. Greco, A.L. Lock, E. Block, J.E.P. Santos, W.W. Thatcher, and C.R. Staples.
2895 2016b. Supplementation of essential fatty acids to Holstein calves during late uterine life
2896 and first month of life alters hepatic fatty acid profile and gene expression. *J. Dairy Sci.*
2897 99:7085–7101. doi:10.3168/jds.2015-10472.

2898 Garcia, M., J.H. Shin, A. Schlaefli, L.F. Greco, F.P. Maunsell, J.E.P. Santos, C.R. Staples,
2899 and W.W. Thatcher. 2015. Increasing intake of essential fatty acids from milk replacer
2900 benefits performance, immune responses, and health of preweaned Holstein calves. *J.*
2901 *Dairy Sci.* 98:458–477. doi:10.3168/jds.2014-8384.

2902 Glasser, F., M. Doreau, G. Maxin, and R. Baumont. 2013. Fat and fatty acid content and
2903 composition of forages: A meta-analysis. *Anim. Feed Sci. Technol.* 185:19–34.
2904 doi:10.1016/j.anifeedsci.2013.06.010.

2905 Hill, T.M., J.M. Aldrich, R.L. Schlotterbeck, and H.G.B. II. 2007a. Effects of changing the fat
2906 and fatty acid composition of milk replacers fed to neonatal calves. *Prof. Anim. Sci.*
2907 23:135–143.

2908 Hill, T.M., J.M. Aldrich, R.L. Schlotterbeck, and H.G.B. II. 2007b. Amino Acids , Fatty
2909 Acids , and Fat Sources for Calf Milk Replacers. *Prof. Anim. Sci.* 23:401–408.

2910 Hill, T.M., J.M. Aldrich, R.L. Schlotterbeck, and H.G.B. II. 2007c. Effects of Changing the
2911 Fatty Acid Composition of Calf Starters. *Prof. Anim. Sci.* 23:665–671.

2912 Hill, T.M., H.G. Bateman, J.M. Aldrich, and R.L. Schlotterbeck. 2009. Effects of changing
2913 the essential and functional fatty acid intake of dairy calves. *J. Dairy Sci.* 92:670–676.
2914 doi:10.3168/jds.2008-1368.

2915 Hill, T.M., M.J. VandeHaar, L.M. Sordillo, D.R. Catherman, H.G. Bateman, and R.L.
2916 Schlotterbeck. 2011. Fatty acid intake alters growth and immunity in milk-fed calves. *J.*
2917 *Dairy Sci.* 94:3936–3948. doi:10.3168/jds.2010-3935.

2918 Hurtaud, C., G. Chesneau, D. Coulmier, and J.L. Peyraud. 2013. Effects of extruded linseed
2919 or alfalfa protein concentrate in interaction with two levels of concentrates on milk
2920 production and composition in dairy cows. *Livest. Sci.* 158:64–73.
2921 doi:10.1016/j.livsci.2013.10.002.

2922 Leiber, F., R. Hochstrasser, H.-R. Wettstein, and M. Kreuzer. 2011. Feeding transition cows
2923 with oilseeds: Effects on fatty acid composition of adipose tissue, colostrum and milk.
2924 *Livest. Sci.* 138:1–12. doi:10.1016/j.livsci.2010.11.016.

- 2925 Lerch, S., J.A.A. Pires, C. Delavaud, K.J. Shingfield, D. Pomiès, B. Martin, Y. Chilliard, and
2926 A. Ferlay. 2015. Rapeseed or linseed in dairy cow diets over 2 consecutive lactations:
2927 Effects on adipose fatty acid profile and carry-over effects on milk fat composition in
2928 subsequent early lactation. *J. Dairy Sci.* 98:1005–1018. doi:10.3168/jds.2014-8578.
- 2929 Magrini, M., and M. Duru. 2014. Dynamiques d'innovation dans l'alimentation des bovins
2930 - lait : une analyse du processus de diffusion de la démarche « Bleu-Blanc-Cœur » et de
2931 ses répercussions. *Fourrages.* 217:79–90.
- 2932 Moallem, U., and M. Zachut. 2012. Short communication: The effects of supplementation of
2933 various n-3 fatty acids to late-pregnant dairy cows on plasma fatty acid composition of
2934 the newborn calves. *J. Dairy Sci.* 95:4055–4058. doi:10.3168/jds.2012-5457.
- 2935 Rodney, R.M., P. Celi, W. Scott, K. Breinhild, and I.J. Lean. 2015. Effects of dietary fat on
2936 fertility of dairy cattle: A meta-analysis and meta-regression. *J. Dairy Sci.* 98:5601–
2937 5620. doi:10.3168/jds.2015-9528.
- 2938 Santschi, D.E., H.-R. Wettstein, F. Leiber, a.-K.M. Witschi, and M. Kreuzer. 2009.
2939 Colostrum and milk fatty acids of dairy cows as influenced by extruded linseed
2940 supplementation during the transition period. *Can. J. Anim. Sci.* 89:383–392.
2941 doi:10.4141/CJAS08115.
- 2942 Silvestre, F.T., T.S.M. Carvalho, N. Francisco, J.E.P. Santos, C.R. Staples, T.C. Jenkins, and
2943 W.W. Thatcher. 2011. Effects of differential supplementation of fatty acids during the
2944 peripartum and breeding periods of Holstein cows: I. Uterine and metabolic responses,
2945 reproduction, and lactation. *J. Dairy Sci.* 94:189–204. doi:10.3168/jds.2010-3370.
- 2946

2947 **Chapitre VI. Conclusion générale**

2948

2949 Cette collaboration entre entreprises du secteur de l'alimentation animale, Valorex et
2950 Terrena, et établissements d'enseignement supérieur et de recherche, Oniris-INRA et ESA, a
2951 permis de réaliser une étude épidémiologique exposé/non exposé très originale quant à la
2952 mesure de l'exposition. Les ressentis d'éleveurs sur des effets favorables de la graine de lin
2953 extrudée sur les performances et la santé des vaches laitières ont pu être objectivés. Ainsi, les
2954 effets de la supplémentation en graine de lin extrudée dans les conditions d'utilisation du
2955 terrain se traduisent par une amélioration de la production laitière individuelle, une modeste
2956 diminution des taux de matières utiles du lait et une amélioration de la fécondité, voire de la
2957 santé des animaux.

2958 Le recours au simulateur d'exploitation bovine laitière de l'UMR Oniris-INRA
2959 BIOEPAR a permis d'explorer l'intérêt économique pour un éleveur à utiliser de la graine de
2960 lin extrudée. La supplémentation souvent utilisée dans la filière BBC permet de maximiser le
2961 gain de marge brute lorsque l'éleveur bénéficie de la prime basée sur la qualité de la matière
2962 grasse du lait. Mais ce travail a aussi montré que d'autres niveaux de supplémentation en
2963 graine de lin extrudée sont rémunérateurs pour l'éleveur sans intégrer les externalités
2964 positives pour la société.

2965 De nouvelles pistes de recherche ont pu être dégagées sur l'implication de la graine de
2966 lin extrudée et de ses composants sur les fonctions de reproduction et sur les phénomènes
2967 inflammatoires. Ainsi, une réduction du risque de la persistance de mammites subcliniques a
2968 été observée dans les élevages commerciaux. Ce résultat avant-gardiste au regard de la
2969 littérature scientifique permet d'envisager de nouvelles voies thérapeutiques via la nutrition
2970 animale.

2971 Enfin, ce travail de thèse est le premier, à notre connaissance, à explorer le lien entre
2972 nutrition animale et performances animales par une étude épidémiologique d'une telle
2973 ampleur. Ce travail montre qu'il peut être très intéressant de sortir du cadre de recherche
2974 stéréotypé de l'essai en conditions contrôlées pour étudier les effets de la nutrition animale.

2975

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 α -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 α -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.