

Le directeur général

Maisons-Alfort, le 10 juillet 2019

AVIS

de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

relatif à « une demande de modification des annexes de la directive 2008/38/CE de la Commission du 5 mars 2008 établissant une liste de destinations des aliments pour animaux visant l'objectif nutritionnel particulier « Réduction du risque de fièvre vitulaire chez les vaches laitières »

L'Anses met en œuvre une expertise scientifique indépendante et pluraliste.

L'Anses contribue principalement à assurer la sécurité sanitaire dans les domaines de l'environnement, du travail et de l'alimentation et à évaluer les risques sanitaires qu'ils peuvent comporter.

Elle contribue également à assurer d'une part la protection de la santé et du bien-être des animaux et de la santé des végétaux et d'autre part à l'évaluation des propriétés nutritionnelles des aliments.

Elle fournit aux autorités compétentes toutes les informations sur ces risques ainsi que l'expertise et l'appui scientifique technique nécessaires à l'élaboration des dispositions législatives et réglementaires et à la mise en œuvre des mesures de gestion du risque (article L.1313-1 du code de la santé publique).

Ses avis sont publiés sur son site internet.

L'Anses a été saisie le 05 novembre 2018 par la Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes (DGCCRF) d'une demande de modification des annexes de la directive 2008/38/CE de la Commission du 5 mars 2008 établissant une liste de destinations des aliments pour animaux visant l'objectif nutritionnel particulier « réduction du risque de fièvre vitulaire chez les vaches laitières »

1. CONTEXTE ET OBJET DE LA SAISINE

Le règlement (CE) n° 767/2009 du Parlement européen et du Conseil du 13 juillet 2009¹ concernant la mise sur le marché et l'utilisation des aliments pour animaux prévoit, dans son chapitre 3, la mise sur le marché de types spécifiques d'aliments pour animaux, dont les aliments visant un objectif nutritionnel particulier (ONP). Un ONP est défini à l'article 3 comme « *un objectif qui consiste à satisfaire les besoins nutritionnels spécifiques d'animaux dont le processus d'assimilation, le processus d'absorption ou le métabolisme est ou risque d'être perturbé temporairement ou de manière irréversible et qui, de ce fait, peuvent tirer des bénéfices de l'ingestion d'aliments pour animaux appropriés à leur état* ». Cet article 3 définit un « *aliment pour animaux visant des objectifs nutritionnels particuliers* » comme « *un aliment pour animaux capable de répondre à un objectif*

¹ Modifié en dernier lieu par le règlement n° 2017/2279 de la Commission du 11 décembre 2017

nutritionnel particulier du fait de sa composition particulière ou de son procédé de fabrication particulier, qui le distingue clairement des aliments pour animaux ordinaires. ».

Le chapitre 3 énonce à l'article 9 que « *les aliments pour animaux visant des objectifs nutritionnels particuliers ne peuvent être commercialisés en tant que tels que si leur destination est incluse sur la liste établie conformément à l'article 10 et s'ils répondent aux caractéristiques nutritionnelles essentielles correspondant à l'objectif nutritionnel particulier qui figure sur cette liste* ». L'article 10, point 1, du même règlement, prévoit que « *la Commission peut mettre à jour la liste des destinations énoncées dans la directive 2008/38/CE en ajoutant ou en supprimant des destinations ou en ajoutant, supprimant ou modifiant les conditions associées à une destination donnée* ». Ces modifications peuvent être demandées par des pétitionnaires. L'article 10, point 2, indique que « *pour être recevable, la demande doit comporter un dossier démontrant que la composition spécifique de l'aliment pour animaux répond à l'objectif nutritionnel particulier auquel il est destiné et qu'il n'a pas d'effets négatifs sur la santé animale, la santé humaine, l'environnement ou le bien-être des animaux* ».

La directive 2008/38/CE de la Commission du 5 mars 2008² établissant une liste des destinations des aliments pour animaux visant des objectifs nutritionnels particuliers (ONP) a été prise en application de la directive 93/74/CEE qui prévoit l'établissement d'une liste positive des destinations des aliments pour animaux visant des objectifs nutritionnels particuliers. Cette liste doit mentionner la destination précise, à savoir l'objectif nutritionnel particulier, les caractéristiques nutritionnelles essentielles, les déclarations d'étiquetage et, le cas échéant, les indications particulières d'étiquetage.

Le dossier du pétitionnaire vise à créer un nouvel objectif nutritionnel particulier « Réduction du risque de fièvre vitulaire chez les vaches laitières » comme suit :

² Modifiée en dernier lieu par le règlement (UE) n° 1123/2014 de la Commission du 22 octobre 2014

| Particular Nutritional Purpose | Essential Nutritional Characteristics | Species or category of animals | Labelling Declarations | Recommended length of time | Other provisions |
|-------------------------------------|--|--------------------------------|--|---|---|
| Reduction of the risk of milk fever | Waxy-leaf nightshade meal allowing a daily release of 1, 25 (OH) ² Vit D ³ glycoside | Dairy cows | Content in <ul style="list-style-type: none"> - 1,25 dihydro-Vit D3 glycoside - Crude fiber - Mg as MgO - Crude fat - Crude starch -- Total amount of Vit. D³ per bolus | Minimum 1 to 2 days before calving apply 1 bolus. If calving is earlier than expected, it is important to notice that the bolus is already active 6 hours after calving. | <ul style="list-style-type: none"> - Application in the form of a bolus allows a daily release of around 38-46 µg/day of 1, 25 (OH)² Vit. D³ glycoside over 10-12 days . - A bolus may contain up to 20% iron in an inert, non-bioavailable form, in order to increase its density. - Indicate on the labelling of the box containing the bolus: <ul style="list-style-type: none"> • Simultaneous supplementation of vitamin D sources shall be avoided around the partus. • Before applying, it is recommended to have advice from a veterinarian or nutritionist concerning the health status of the dairy cow around the calving. |

Conformément aux dispositions du règlement (CE) n°767/2009, la saisine ne porte pas sur une évaluation des caractéristiques nutritionnelles optimales pour répondre à l'objectif nutritionnel particulier, mais sur une appréciation des éléments fournis par le demandeur.

L'avis de l'Anses est donc exclusivement demandé sur l'adéquation des preuves fournies par le demandeur pour démontrer d'une part l'efficacité des caractéristiques nutritionnelles proposées au regard de l'objectif nutritionnel particulier recherché et, d'autre part, l'absence d'effets négatifs sur la santé animale, la santé humaine, l'environnement ou le bien-être des animaux.

Plus précisément, au cas d'espèce, l'avis de l'Anses est demandé sur les questions suivantes, selon les termes de la saisine :

- 1) *Un aliment possédant les caractéristiques suivantes : Farine de Solanum glaucophyllum, administrée sous forme de bolus permettant une libération quotidienne de 1, 25 (OH)₂ Vit. D₃ glycoside permet-il d'atteindre l'objectif de réduction du risque de fièvre vitulaire?*
- 2) *La durée d'utilisation recommandée est-elle pertinente et adaptée à l'objectif nutritionnel particulier visé ?*
- 3) *Les autres dispositions prévues, concernant les exigences générales concernant le produit, relatives à l'utilisation du bolus sont-elles pertinentes et adaptées à l'objectif nutritionnel particulier visé ?*

4) La présentation sous forme de bolus (formulation retardante très concentrée) est-elle adaptée à l'objectif nutritionnel particulier visé ? Ce mode d'administration est-il plus avantageux qu'un aliment complémentaire ajouté à la ration quotidienne et fournissant un apport équivalent en 1, 25 (OH) 2 Vit. D3 glycoside ?

Dans le cas où l'Anses considèrerait que les caractéristiques nutritionnelles sont pertinentes, mais que leur définition gagnerait à être précisée pour garantir l'efficacité de l'aliment pour répondre à ces objectifs, il lui est demandé de proposer si possible un complément de définition.

Par ailleurs, l'Anses pourra, si elle l'estime nécessaire, émettre toute recommandation qu'elle juge souhaitable sur les caractéristiques des aliments pour animaux destinées à répondre à cet objectif nutritionnel. Ces recommandations devront cependant figurer dans l'avis de manière clairement séparée des réponses apportées aux questions de la saisine ».

2. ORGANISATION DE L'EXPERTISE

L'expertise a été réalisée dans le respect de la norme NF X 50-110 « Qualité en expertise - Prescriptions générales de compétence pour une expertise (Mai 2003) ». L'Anses analyse les liens d'intérêts déclarés par les experts avant leur nomination et tout au long des travaux, afin d'éviter les risques de conflits d'intérêts au regard des points traités dans le cadre de l'expertise.

Les déclarations d'intérêts des experts sont publiées sur le site internet de l'Anses (www.anses.fr).

L'expertise collective a été réalisée par le comité d'experts spécialisé (CES) « Alimentation animale (ALAN) » sur la base d'un rapport initial rédigé par trois rapporteurs et discuté lors de la réunion du 12 mars 2019 et du 09 avril 2019. L'analyse et les conclusions du CES ont été discutées et validées à l'unanimité lors de la réunion du 14 mai 2019.

3. ANALYSE ET CONCLUSIONS DU CES ALAN

3.1. Contexte scientifique

3.1.1. Description physiologique et physiopathologique de la fièvre vitulaire

La fièvre vitulaire appelée aussi hypocalcémie vitulaire, affecte environ 5 % des vaches laitières, principalement les meilleures productrices et parmi elles, les multipares à partir du troisième vêlage. Dans plus de 70 % des cas, les animaux récidivent aux vêlages suivants (Thihsing-Hansen *et al.*, 2002). Elle est exceptionnelle chez les vaches allaitantes.

La forme la plus connue est clinique, décrite sous le nom de fièvre vitulaire ou fièvre de lait. Elle se manifeste dans les 48 heures qui suivent le vêlage et débute par une démarche hésitante de la vache puis un affaissement du train arrière. En l'absence de traitement à ce

stade, les vaches entrent dans un coma avec parfois des tremblements, une agitation désordonnée de la tête et des membres postérieurs. La forme subclinique, caractérisée seulement par une calcémie anormalement basse (inférieur à 2,2 mmol/L=88 mg/L dans les 48h après le vêlage), est un facteur de risque de baisse de production, déplacements de caillette et troubles infectieux dont métrite. Cette pathologie est de plus en plus observée chez les vaches laitières hautes productrices (Chamberlin *et al.* 2013).

La fièvre vitulaire est toujours caractérisée par la baisse du calcium sanguin ou hypocalcémie. Sa concentration, en cas de forme clinique, est inférieure à 60 mg/L (au lieu de 100 mg/L normalement). L'incapacité de la vache à maintenir une concentration normale de calcium sérique est due à une mauvaise adaptation du métabolisme des minéraux en réponse à une demande accrue de calcium pour la sécrétion laitière³. Parmi les causes favorisant l'hypocalcémie on peut citer :

- Un excès important, (plus de 70 g par jour) de calcium avant le vêlage aussi bien du fait du complément minéral vitaminique (CMV) que des aliments grossiers riches en calcium, et à moindre degré, un excès de phosphore ;
- Un déficit en magnésium, pouvant lui-même être conditionné par un excès de potassium ;
- Une carence en 1,25 (OH)₂ D₃ (ou calcitriol) ;
- Une suralimentation des vaches tarées qui favorise la fixation de calcium dans les graisses de dépôt ;
- Un bilan alimentaire cations-anions [BACA=(Na+K)-(Cl+S)]⁴ exprimé en mEq/kg de matière sèche (MS) de ration élevé, entraînant une alcalose métabolique préjudiciable à la mobilisation du calcium osseux. En effet, de nombreuses études ont montré que l'ajout d'anions dans le régime avant vêlage pour réduire le BACA améliorerait le statut en calcium et donc empêchait la fièvre vitulaire (Ender *et al.* 1971 ; Block, 1984 ; Oetzel *et al.*, 1988; Gaynor *et al.*, 1989).

³ Les vaches laitières ont besoin d'environ 20 g de calcium par jour à la fin de la période de tarissement. Avec la production de colostrum, la demande augmente de 30 à 70 g par jour en fonction de la production laitière. Cependant, les mécanismes permettant de réduire l'excrétion urinaire de calcium, d'augmenter l'absorption du calcium dans l'intestin et de réguler positivement la libération de calcium par le tissu osseux prennent environ 48 heures, ce qui peut entraîner une insuffisance de l'apport en calcium au cours de cette période (Martin-Tereso *et al.*, 2014).

⁴ sodium (Na), potassium (K), chlore (Cl) et soufre (S)



3.1.2. Prévention et traitement de la fièvre vitulaire

- **La prévention**

- L'apport en minéraux dans la ration

Des apports en minéraux ont été calculés afin de permettre une alimentation optimale⁵. Concernant le calcium, les recommandations d'apport sont de 20 g à 60 g par jour juste avant vêlage (Degaris *et al.*, 2008). Ces valeurs doivent être contrôlées car une ration trop riche en calcium peut avoir des effets délétères et multiplier par trois voire plus, l'incidence de la fièvre vitulaire (Kronqvist *et al.*, 2011)⁶.

Le magnésium est un ion directement lié aux hormones régulatrices de la calcémie et à leurs récepteurs (Goff 2008 ; Allen *et al.*, 2008). Une magnésémie inférieure à 15 mg/L est un facteur prédisposant à l'hypocalcémie (Martin-Tereso *et al.*, 2014 ; Degaris *et al.*, 2008). Il faut donc veiller à incorporer au moins 0,35 % de magnésium par kg de MS (Neves *et al.*, 2017 ; Leno *et al.*, 2017). L'étude de Lean *et al.* (2006) a montré qu'augmenter le taux d'incorporation de magnésium dans la ration de 0,3 % à 0,4 % permet de diminuer fortement le risque de fièvre vitulaire (baisse de 62 %).

La teneur en phosphore à apporter est de 0,4 % par kg de MS, sans pour autant dépasser la dose seuil de 80 g par jour (Degaris *et al.*, 2008 ; Goff, 2008) car cela peut bloquer la production rénale de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ et donc augmenter la prévalence de fièvre vitulaire (Eisenberg *et al.*, 2019 ; Venjakob *et al.*, 2017).

Les ions sodium, potassium, chlore et soufre sont à prendre en compte pour obtenir une ration avec un bilan anion cation (BACA) négatif, entre -50 et -100 mEq/kg de matière sèche. Cependant, les recommandations concernant le BACA de la ration varient selon les auteurs. Ainsi, selon Moore *et al.* (2000), une ration à -150 meq/Kg de MS et une urine à pH 6, trois semaines avant le vêlage, suffit à la prévention d'un nombre important de cas d'hypocalcémie. D'après Horst *et al.* (1997), pour obtenir un effet préventif optimal, il est nécessaire d'obtenir une ration finale dont le BACA est d'environ -100 meq/kg de MS. L'utilisation de rations anioniques permet de diviser l'incidence des fièvres vitulaires par 6 (Goff *et al.*, 1991) ou par 4 (Thilsting-Hansen *et al.*, 2002).

- L'apport en vitamine D₃

La période d'apport de la vitamine D₃ (appelée également cholécalciférol), entre 2 et 8 jours avant la date du vêlage, conditionne la réussite du traitement. Une injection de 25 mg de

⁵ Taux d'incorporation en % de matière sèche pour la ration des vaches taries : calcium 0,85-1 %, magnésium 0,35-4%, phosphore 0,4 %, sodium 0,12 %, potassium 1 %, chlore 0,5 % et soufre <0,4 % (Goff, 2008, 2014)

⁶ Des antagonistes de l'absorption du calcium peuvent être utilisés en limitant la disponibilité du calcium dans la lumière de l'intestin grêle. Le silicate (zéolite) fait partie de cette famille. La zéolite doit être distribuée à raison de 1 kg/jour pendant 4 semaines. A cette posologie, la zéolite permet la prévention de la fièvre vitulaire (Thilsting - Hansen *et al.*, 2002).

vitamine D₃ (cholécalférol) permet de prévenir la fièvre vitulaire (Aubadie-Ladrix, 2005). La voie *per os* peut être utilisée avec un apport de 50 à 75 mg par jour de vitamine D₃ entre 3 et 10 jours avant le part (Guerin, 2004). L'apport de vitamine D₃ est le moyen le plus utilisé pour réduire l'incidence de la fièvre vitulaire.

- Le drenchage

Cette technique consiste à réaliser une administration *per os* de calcium à l'aide d'une sonde œsophagienne et d'une pompe pendant la période peri-partum. Les formulations sont à base de sels de calcium tels que le chlorure de calcium (Thilsting-Hansen *et al.*, 2002). L'inconvénient de l'utilisation de ces sels de calcium est l'irritation qu'ils provoquent au niveau de la muqueuse du tractus digestif. Le drenchage permet de réduire de 50 % à 60 % le risque de fièvre vitulaire (Thilsting-Hansen *et al.*, 2002).

En résumé, seuls le BACA, la vitamine D₃ ou ses formes hydroxylées et le drenchage sont réellement utilisés pour prévenir la fièvre vitulaire. L'efficacité de ces différents moyens varie selon la littérature. L'utilisation du BACA semble le moyen le plus efficace pour Horst *et al.*, (1997). Le BACA et le drenchage sont les moyens les plus efficaces selon Sorensen *et al.*, (2002). La vitamine D₃ est classée après le drenchage et le BACA (Thilsting-Hansen *et al.*, 2002).

• **Le traitement**

Le traitement de base (calcithérapie) consiste à rétablir une calcémie dans les valeurs normales le plus rapidement possible⁷. Ainsi, lors d'une hypocalcémie à 50 mg/l, le déficit en calcium extracellulaire sur une vache de 600 kg serait d'environ 10 g⁸. Par conséquent, l'apport recommandé est de 1 g de calcium pour 45 kg de poids vif (Allen *et al.*, 2008) ou encore de 2 g pour 100 kg de poids vif (Schelcher *et al.*, 2002 ; Goff, 2008). Le traitement peut se faire par voie intraveineuse, sous-cutanée ou *per os*. La voie intraveineuse est à privilégier pour sa rapidité d'action sous réserve de l'administrer lentement car le calcium est cardiotoxique. Habituellement, l'efficacité du calcium en intraveineuse est immédiate et environ 75 % des vaches sont debout après la perfusion. Suite à ce premier traitement, il est toutefois possible que 25 % à 30 % de ces vaches rechutent dans les 12 h à 24 h, nécessitant un deuxième traitement. Ce phénomène est lié à l'hypocalcémie transitoire provoquée par l'administration du calcium par voie veineuse.

⁷ Le calcium peut être amené sous plusieurs formes. Le plus utilisé est le borogluconate de calcium mais il existe aussi sous forme de gluconate de calcium, de chlorure de calcium ou encore de glucoheptonate de calcium. Dans les préparations pharmaceutiques disponibles sur le marché, les sels de calcium sont souvent associés avec une complémentation en phosphore et en magnésium.

⁸ Ce calcul ne prend pas en compte les pertes continues dans le lait

3.1.3. Rôle de la vitamine D₃ et de certains minéraux dans la régulation de la fièvre vitulaire

La vitamine D₃ (cholécalférol), principal agent de régulation du calcium, a été utilisée pour prévenir la fièvre vitulaire. Cependant, des doses élevées de vitamine D₃ doivent être appliquées dans un laps de temps réduit avant la parturition afin de prévenir cette pathologie⁹.

La vitamine D₃ est biologiquement inactive et nécessite deux étapes métaboliques pour atteindre la forme active, le calcitriol (1,25 (OH)₂ D₃). En effet, le calcitriol résulte d'une double hydroxylation de la vitamine D₃, la première, en position 25 a lieu au niveau hépatique et conduit à la 25-OH vitamine D₃ (ou calcidiol), la seconde, en position 1, a lieu au niveau du rein et aboutit à la 1,25 (OH)₂ D₃ (ou calcitriol). Les études de Hove *et al.*, (1982) et Horst *et al.*, (2003) ont montré que la 1,25 (OH)₂ D₃ était plus efficace que la vitamine D₃ dans la prévention de la fièvre vitulaire.

Concernant le calcium, un modèle développé par Lean *et al.*, (2006), basé sur une méta-analyse, a montré une relation quadratique entre la concentration de calcium dans le régime des vaches tarées et l'incidence prévue de la fièvre de lait, les concentrations les plus faibles (2-5g/kg MS) et les plus élevées (20-25¹⁰ g/kg MS) de calcium entraînant une incidence prédite plus faible (courbe en cloche, la fréquence maximale de fièvre vitulaire étant atteinte avec des concentrations de calcium de 13 g/kg de matière sèche). Des études expérimentales avec une diminution de la consommation de calcium pendant la période de tarissement ont montré une diminution du risque de fièvre vitulaire et d'hypocalcémie au vêlage (Goings *et al.*, 1974; Shappell *et al.*, 1987).

Le magnésium alimentaire est également important vis-à-vis de l'incidence de la fièvre vitulaire. Ainsi, Lean *et al.* (2006) ont montré une relation entre une augmentation de la concentration de magnésium dans le régime alimentaire et une diminution du risque de développer une fièvre vitulaire. Le statut en magnésium de l'animal affecte l'homéostasie du calcium. Les vaches souffrant d'hypomagnésémie peuvent donc répondre plus lentement et moins efficacement à l'hypocalcémie survenue lors de la parturition et avoir ainsi plus de risques de développer une fièvre vitulaire.

Il a été démontré qu'une forte consommation de potassium avant le vêlage augmentait le risque de fièvre de lait (Goff *et al.*, 1997). Les autres minéraux ayant une forte influence sur le bilan acido-basique sont le sodium (Na), le chlore (Cl) et le soufre (S). Cependant, les variations de la concentration de ces minéraux dans les fourrages ont une influence plus faible sur la valeur de la différence entre les cations et les anions alimentaires (BACA), calculée comme (Na + K) - (Cl + S), que les variations de la concentration en potassium (Pehrson *et al.*, 1999).

A noter enfin que l'effet premier du 1,25 (OH)₂ D₃ est d'augmenter l'absorption active du calcium intestinal, *via* l'augmentation de l'expression du transporteur CaBP (calcium

⁹The Merck Veterinary Manual
http://www.merckvetmanual.com/mvm/metabolic_disorders/disorders_of_calcium_metabolism/parturient_paresis_in_cows.html, 2016 (consulté le 29/05/2019).

¹⁰ Ces valeurs sont atteintes par le biais d'un modèle, mais ne sont pas réalistes, dans la mesure où un tel apport chez la vache laitière ne serait pas réalisable en pratique.

binding protein), ce qui augmente aussi l'absorption du phosphore. La concentration plasmatique en calcium et en phosphore ayant tendance à augmenter, cela stimule la sécrétion de calcitonine par les cellules C de la glande thyroïde, ce qui à son tour augmente l'accrétion osseuse (Puche *et al*, 1976 ; nommé ostéopétrose). Ce phénomène étant limité et rapidement saturable, les concentrations plasmatiques de calcium et de phosphore restent élevées, même si la calcitonine augmente l'excrétion urinaire de calcium, de phosphore, mais aussi de magnésium, de sodium et de potassium. L'excès de sels de calcium dans le sang conduit à la précipitation de cristaux qui se déposent dans plusieurs organes¹¹.

3.1.4. Apport de la vitamine D₃ par *Solanum Glaucophyllum*

La plante *Solanum glaucophyllum* Desf. (SG ; synonymes *Solanum malacoxylum* Sendtn. ou *Solanum glaucum* Dun.), fait partie de la famille des Solanacées. Cette plante pousse en Amérique du Sud dont l'Argentine et le Brésil, mais elle est **inconnue en France**. Elle est responsable de calcinose, une intoxication végétale observée spontanément chez les chevaux et les bovins, après ingestion de feuilles de SG.

L'intoxication est liée à la présence de vitamine D₃ dans ses formes hydroxylées en grande quantité dans ces plantes¹², c'est à dire à la présence de calcitriol (1,25 (OH)₂ D₃) ou de dérivé glycosylé de calcitriol (1,25 (OH)₂ D₃ glycosides) qui est hydrolysé dans le rumen chez les polygastriques, ou l'intestin grêle chez les monogastriques en 1,25 (OH)₂ D₃. L'animal ingérant cette plante ingère donc la forme active de la vitamine D₃ : le 1,25 (OH)₂ D₃ ou calcitriol, forme que l'on ne trouve habituellement, ni dans les sources d'origine animale, ni dans les sources d'origine végétale. Toutes les parties de la plante sont susceptibles d'être toxiques.

Lors d'intoxication expérimentale avec SG, chez le cobaye (Campero *et al.*, 1970), les symptômes apparaissent après seulement quelques jours de consommation : on observe une perte de poids, d'appétit et de prise de boisson. Les dépôts de sels de calcium ne sont observés qu'à l'autopsie : après 6 jours lors d'analyse microscopique, après une trentaine de jours lors d'analyses macroscopiques. A l'arrêt de l'exposition à la plante, un délai important est nécessaire pour observer une régression des calcifications (Mello, 2003).

Contrairement aux intoxications avec un excès de vitamine D₃ (ancien raticide), où il est possible d'appliquer un « antidote » en administrant de la calcitonine, dans le but d'inhiber l'hydroxylation en 1 (donc d'inhiber l'activation de la vitamine D₃) (Dougherty *et al.*, 1990 ; Morrow, 2001), l'intoxication liée à cette plante, qui contient la forme active hydroxylée de la vitamine D₃, ne permet d'envisager un tel « antidote ». Ce type de traitement n'est donc pas possible. Des traitements à base d'oxalates de potassium et d'hydroxyde d'aluminium n'ont montré aucune efficacité (Mello, 2003).

¹¹ L'aorte (intima), les reins (dans la lumière des tubules qui perdent leur épithélium, et dans les artères rénales), les tendons, les ligaments, l'utérus (parois minces mais dures et ayant perdu leur élasticité), les muqueuses stomacales et intestinales, la thyroïde, les muscles squelettiques dont le cœur (minéralisation des valves et de l'endocarde), les muscles intercostaux et le diaphragme, les nœuds lymphatiques, la rate (dans les ramifications de l'artère splénique), les poumons et les bronches.

¹² et non de vitamine D₂ ou ergostérol, la forme habituelle rencontrée dans les plantes

Pour l'étude du présent dossier, il est donc important de rappeler les éléments suivants :

- La vitamine D3, appelée également cholécalciférol est biologiquement inactive et nécessite deux étapes métaboliques (avec hydroxylation) pour atteindre la forme active, le calcitriol ou $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$;
- Le calcitriol peut être également présent sous forme glycosylée ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ glycosides) qui est hydrolysé dans le rumen chez les polygastriques ou l'intestin grêle chez les monogastriques en $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. C'est cette forme glycosylée qui est majoritairement présente dans le Green Bolus.

3.2. Présentation du dossier fourni par le pétitionnaire

Le dossier du pétitionnaire est constitué de 58 pages et de 13 annexes (dont certaines en flamand ou en allemand). Sont également joints les 17 références bibliographiques du dossier, et 6 documents fournis en annexes du dossier par la DGCCRF (pdf, ou xls, de type poster ou graphiques sans mention de leur lien au dossier, la plupart en flamand).

Le dossier du pétitionnaire comprend 5 chapitres présentés comme suit :

- 1) Description de l'objet de l'ONP (réduction du risque de fièvre de lait) et des approches nutritionnelles et pharmacologiques classiquement utilisées dans cet objectif ;
- 2) Informations concernant le produit de farine de *Solanum glaucophyllum* (SG), issue du broyage de feuilles séchées de *Solanum glaucophyllum*, présentée sous forme de bolus afin d'assurer une libération contrôlée de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ glycosides ;
- 3) Présentation du produit Green Bolus contenant la farine de SG, incluant sa composition, sa production et ses spécifications ;
- 4) Etudes d'efficacité et de sécurité de Green Bolus ;
- 5) Données de sécurité

Certains documents fournis par le pétitionnaire n'ont pas été inclus dans l'analyse car ils sont présentés en flamand ou en allemand, sous forme de graphiques extraits de leur contexte (6 documents). Ces graphiques sont par ailleurs présents dans le dossier principal. De plus, la référence ¹³ qui indique que les feuilles de SG font partie du catalogue des matières premières, n'a pas été prise en compte dans l'analyse pour juger de la pertinence de l'ONP.

3.3. Analyse des publications retenues pour juger de la pertinence de l'ONP

3.3.1. Apport de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ glycosides sous forme de bolus

Six références fournies par le pétitionnaire ont été considérées quant à l'effet de l'apport de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ glycosides sous différentes formes (en particulier sous la forme de bolus) sur la calcémie, la phosphatémie, ainsi que la teneur plasmatique en magnésium et en $1,25$

¹³ Règlement (UE) 2017/1017 de la commission du 15 juin 2017 modifiant le Règlement (UE) 68/2013 relatif au catalogue des matières premières pour aliments des animaux.

(OH)₂ D₃ (Références 6, 8, 9 (et 10), 12, et 13, cf. tableau 1). Par ailleurs, deux études supplémentaires issues d'une recherche bibliographique ont été incluses dans l'analyse (Bachman *et al.*, 2017 ; Ishii *et al.*, 2015, cf. tableau 2).

La référence 6 (Herbonis 2007, communication interne de la société commercialisant le Panbonis qui constitue la forme de présentation en poudre de SG) concerne l'effet d'une administration orale journalière de 7,5 à 9 g de SG (feuilles broyées) pendant 5 jours avant le vêlage chez la vache (soit un total de 37,5 g à 45 g) ou 2 applications de 15 g de SG, chacune dans un intervalle de 3 jours. **Une stabilisation de la calcémie est observée après ces apports, sans qu'il y ait une mention particulière du nombre et de l'âge/parité des animaux. De plus, cette référence ne fournit pas de données concernant la libération de 1,25 (OH)₂ D₃ glycosides.**

Par ailleurs, un autre essai a porté sur la comparaison d'un lot qui a reçu 5g/j de SG, (soit l'équivalent de 250 µg de 1,25 (OH)₂ D₃ sous forme de poudre (Solbone)) avec un lot témoin qui a reçu un traitement à base de sels de calcium. Cet essai n'apporte pas d'information sur la réponse au niveau de la calcémie, en revanche, les cas de fièvres vitulaires ont été observés sur 5 vaches sur 29 dans le lot ayant reçu l'apport en SG, et 6 vaches sur 25 dans le lot témoin. **Le nombre de fièvre vitulaire est similaire avec l'apport de sels de calcium ou l'apport de poudre (Solbone).**

La référence 8 (thèse en allemand de Schloetrrer-Wiesser) concerne un essai préliminaire où les résultats montrent que l'apport de SG permet de maintenir une calcémie identique à celle obtenue par l'apport oral de sels de calcium, les 2 apports se faisant dès l'apparition de signes de mise-bas. **Aucune information sur la teneur plasmatique en 1,25 (OH)₂ D₃ n'est fournie, pas plus que la présence ou non de fièvre vitulaire.**

Dans un second essai terrain, 2 lots de vaches sélectionnées (n=25 vaches) sur la présence d'une fièvre vitulaire durant les précédentes lactations, ont été traitées entre J-3 à J-1 pré-partum, soit par un apport oral de sels de calcium (n=12) soit par un apport de 5 g de SG avec une libération équivalente à 250 µg de 1,25 (OH)₂ D₃ (n=13). La forme d'apport de SG est appelée « bolus » dans le résumé : il s'agit probablement de l'extrait standardisé de SG appelé Solbone (référence 6) et administré dans des gélules de gélatine. **Il ne s'agit donc probablement pas de la forme Green Bolus.**

La calcémie, la phosphatémie et la teneur en potassium du plasma ont été mesurées durant 72 heures post-partum, mais pas la teneur en 1,25 (OH)₂ D₃. **Les cas de fièvre vitulaire étaient similaires entre l'apport oral de sels de calcium (2 vaches/12) et l'apport de SG (2 vaches/13).** Une absence de différences pour les teneurs plasmatiques en calcium, phosphore et magnésium jusqu'à 72 heures post-partum, a été également observée entre les 2 groupes.

La référence 9 (Horst *et al.*, 2003, résumé de congrès) concerne l'apport de SG sous forme de bolus (gélules de gélatine). L'essai est réalisé chez 9 vaches multipares Jersey alimentées avec une ration à faible balance BACA avant vêlage : 5 vaches ont reçu 2 g à 3 g d'extraits de SG journalier sous forme de bolus à base de gélatine de 6 jours avant vêlage jusqu'à 14 jours post-partum. Un groupe témoin (4 vaches) ne reçoit pas de SG et ne développe pas de fièvre vitulaire, bien qu'étant en hypocalcémie (< 75 mg /l). La calcémie est plus élevée chez les vaches laitières recevant SG par rapport au groupe témoin. Toutes ces vaches laitières présentent ultérieurement une forte hypocalcémie, une

semaine après l'arrêt du traitement et une vache laitière présente une fièvre vitulaire. Cette référence montre la nécessité de mettre en place une stratégie de « phase withdrawal approach » consistant à réduire progressivement les doses de SG jusqu'à 21 jours post-partum pour stabiliser la calcémie. D'ailleurs, cette étude est reprise sommairement dans la référence 10 (Jorgnesen *et al.* 2003). **Ces données ne concernent pas la forme Green Bolus. Cet article ne donne pas d'informations sur la libération de l'équivalent de 1,25 (OH)₂ D₃ et ne permet pas de conclure quant à une réduction du risque de fièvre vitulaire, en raison du faible effectif d'animaux testés.**

La référence 12 (Verschaeve 2010) est le texte d'un brevet concernant la composition et la préparation du Green Bolus contenant de l'oxyde de Fer et du Panbonis (nom commercial de SG standardisé) et permettant potentiellement la libération quotidienne de 38 µg à 46 µg de 1,25 (OH)₂ D₃ glycosides, sur une période de 10 à 12 jours. L'administration en pré-partum (J-3 à J-1 avant vêlage) d'un bolus de 23,3 g contenant 460 à 550 µg de 1,25 (OH)₂ D₃ glycosides permet durant 10-12 jours, une stabilisation du calcium en post-partum chez les vaches traitées (n=7), non observée chez les vaches témoins (n=2). **Ces données montrent que l'apport de Green Bolus permet de stabiliser la calcémie post-partum, malgré le faible effectif d'animaux testés. Cependant, la référence ne fournit pas de données sur les fièvres vitulaires observées.**

La référence 13 est l'Annexe 38 du dossier soumis à l'Efsa intitulé « Green Bolus trial for prevention of milk fever ». Le Green Bolus de 70 g contient 23 g de Panbonis 20 soit 0,466 mg 1,25 (OH)₂ D₃ glycosides. Néanmoins, dans le dossier du pétitionnaire, cette quantité de 0,466 mg est convertie en UI (Unité Internationale) de vitamine D₃ sur la base de 1 mg Vit D₃ = 40x10³ UI, ce qui suggère que le produit permet un apport minimal de 18 600 UI/j. Cette valeur est probablement surestimée car seuls 90 % de l'activité vitamine D₃ sont attribuables aux métabolites glycosides (Efsa, 2015). Six vaches reçoivent de 1 à 3 bolus (équivalent 50 à 150 µg/j de 1,25 (OH)₂ D₃ glycosides sur 10 jours) vs 4 vaches témoins, avec un traitement en moyenne 5 jours avant vêlage. **Aucune vache du lot recevant le Green Bolus ou du lot témoin n'a présenté de fièvre vitulaire durant les 28 jours post-partum.** Aucun effet négatif concernant la santé des vaches laitières n'est observé même lorsque le nombre de bolus augmente. Chez les vaches recevant 1 bolus, la calcémie est accrue pendant les 3 premiers jours post-partum, mais s'abaisse en dessous de celle du lot témoin à J+7 post-partum. Cet effet disparaît quand les vaches recevant plusieurs bolus sont intégrées à l'analyse. La phosphatémie est également augmentée 3 jours post-partum chez les vaches laitières recevant le Green Bolus, les concentrations en phosphore revenant identiques à celles des témoins au bout de 7 jours. De façon surprenante, la concentration en 1,25 (OH)₂ D₃ est plus faible chez les vaches laitières recevant le Green Bolus entre J2 et J7 post-partum que chez les témoins, mais les données sont non directement quantifiables (exprimées en log). **Ces données montrent que le Green Bolus permet d'accroître la calcémie et la phosphatémie chez les vaches laitières 2 à 3 jours post-partum, mais induisent une diminution de 1,25 (OH)₂ D₃.**

Deux publications récentes, non fournies dans le dossier du pétitionnaire, ont été identifiées par les experts :

- L'article de Ishi *et al.* (2015) est un essai terrain qui compare chez des vaches laitières (n=26) l'absence d'apport de SG à l'administration de 1,3g/j de SG (produit Panbonis à 20 ppm) pendant la période J-14 à J+3 post-partum, 2,6 g/j de SG pendant la période J-14 à J+3 post-partum et un apport unique de 35,8 g/j à J-3 avant vêlage.

Le suivi de la calcémie, de la phosphatémie et des concentrations plasmatiques de magnésium et de 1,25 (OH)₂D₃ est effectué durant la période J-15 à J+10 post-partum, avec un enregistrement des fièvres vitulaires. **L'apport de SG ne s'effectue pas sous la forme de Green Bolus.** Le jour de la mise-bas, la calcémie est plus élevée dans le groupe recevant 35,8 g de SG par rapport aux autres groupes, cette différence n'étant plus significative dès J+3 post-partum. La phosphatémie et la concentration plasmatique en magnésium ne sont pas affectées par les traitements en post-partum. Par comparaison au lot témoin (pas d'apport d'administration de SG), les lots recevant 1,3 ou 2,6 g/j de SG ont des concentrations plasmatiques en 1,25 (OH)₂ D₃ identiques, le lot recevant 35,8 g/j présentant une valeur significativement plus basse à 3j post-partum.

- L'article de Bachman *et al.* (2017) porte sur un essai terrain et compare chez des vaches multipares :

- ✓ Un apport de SG sous forme de bolus à libération immédiate associé à un bolus permettant une libération lente (n = 23, dose= 524 µg de 1,25 (OH)₂ D₃ (soit 21 000 UI de vitamine D₃ environ) en 1 fois, 72 h à 24 h avant mise-bas ;
- ✓ Un apport oral de calcium (n =25) ;
- ✓ Une absence d'apport (n=12).

Le suivi de la calcémie, de la phosphatémie, et de la concentration plasmatique de la 1,25 (OH)₂ D₃ est effectué pendant 7 j post-partum. **Cette forme de bolus ne correspond ni à la composition de Green Bolus ni à son principe d'administration.** En effet, Green Bolus est préconisé en un seul bolus exclusivement à libération lente, et sans « preloading » avec un bolus à libération instantanée tel qu'utilisé dans cet essai. Par ailleurs, la composition de Green Bolus fournie par le pétitionnaire diffère fortement de celle décrite dans cet essai, en particulier pour les agents liants. En comparaison des lots témoins ou recevant du calcium par voie orale, les vaches recevant le bolus ont une calcémie et une phosphatémie accrue jusqu'à 3 jours post-partum, les différences s'estompant ensuite ; les vaches recevant le bolus ont une concentration accrue en 1,25 (OH)₂ D₃ durant 1 j post-partum, les différences s'estompant également ensuite. Il est à noter que la fréquence de fièvre vitulaire est identique dans les 3 groupes, et qu'aucun autre effet négatif n'a été observé (mammites, déplacement de caillette, cétose et rétention placentaire). **Ces données montrent que ce bolus permet d'accroître les concentrations plasmatiques en calcium, phosphore et en 1,25 (OH)₂ D₃ après le vêlage mais sans effet sur les fièvres vitulaires.**

Tableau 1. Effet de l'apport de SG et de sa forme d'administration sur les réponses des concentrations plasmatiques en calcium (Ca), phosphore (P), magnésium (Mg) et 1,25 (OH)₂ D₃ et sur la fréquence des fièvres vitulaires chez la vache laitière (données du pétitionnaire)

| Référence | Apport de SG | | | | Paramètres d'études | | | | | Remarques |
|-------------------------------------|------------------|-------------|--|-----------------|---|-----------------------------|------------------------------|--|---------------------------------|--|
| | Forme | Quantité | Equivalent 1,25 (OH) ₂ D ₃ | Apport / MB [J] | Réponse Ca [Calcémie, mg/L] (Période d'étude) | Réponse P (Période d'étude) | Réponse Mg (Période d'étude) | Réponse [1,25 (OH) ₂ D ₃] (Période d'étude) | Fièvre vitulaire (cas/effectif) | |
| Herbonis, 2007 (Réf 06) | Feuilles broyées | 7,5 à 9 g/j | | [-5 à 0] | Baisse jusqu'à [40 mg/L] à J7 (0 à 9j PP) | | | | | Un graphique sans informations (nombre de vaches laitières, régime ?) Pas de groupe Témoin |
| | Feuilles broyées | 15 g x 2 | | [-3 et 0] | Stabilisation [110 mg/L] (0 à 9j PP) | | | | | Un graphique sans informations (nombre de vaches laitières, régime ?) Pas de groupe Témoin |
| | Poudre (Solbone) | 5 g/j | 250 µg | ? | | | | | 6/25 (Ca) 5/29 (sels de Ca) | Comparaison SG et sels de Ca |
| Schlötterer-Wiser 2008 (Réf 08) | Bolus Gélatine | 5 g x 1 | 250 µg | [-2] | SG = sels de calcium [82 mg/L vs 80 mg/L] (0 à 3j PP) | | | | 2/13 (SG) 2/12 (sels de Ca) | Etude terrain (n=25) Comparaison de SG et sels de Ca → Pas« d'adverse effect » |
| Horst <i>et al.</i> , 2003 (Réf 09) | Bolus gélatine | 2 à 3 g/j | | [-6 à +14] | SG vs Témoin: augmentation [89 mg/L vs 75 mg/L] (0 à 2j PP) | | | | 0/4 (Témoin) | BACA faible Hypocalcémie chez toutes les vaches laitières + une fièvre vitulaire 8 j post arrêt de SG |

Suite tableau 1

| Référence | Apport de SG | | | | Paramètres d'études | | | | | Remarques |
|--|----------------|------------------------|--|--|---|--|------------------------------|--|---------------------------------|---|
| | Forme | Quantité | Equivalent 1,25 (OH) ₂ D ₃ | Apport / MB [J] | Réponse Ca [Calcémie, mg/L] (Période d'étude) | Réponse P (Période d'étude) | Réponse Mg (Période d'étude) | Réponse [1,25 (OH) ₂ D ₃] (Période d'étude) | Fièvre vitulaire (cas/effectif) | |
| Horst <i>et al.</i> , 2003 (Réf 09) | Bolus gélatine | 2g/j 1g/j 0,5g/j | | [-7 à +5] [+8 à +14] [+15 à +21] | | | | | | Calcémie normale (14j post arrêt de SG) |
| Verschaeve, 2010 (Ref. 12) | Green bolus | 1 bolus | 50 µg/j sur 10 j | [-2 ou -1] | SG vs Témoin : augmentation [90mg/L vs 79 mg/L] (-2 à 1j PP) | | | | | Libération « lente » sur 10-12 j |
| Annexe 38 du dossier soumis à l'EFSA (Ref. 13) | Green bolus | 1 à 3 bolus | 50 à 150 µg/j sur 10 j | -5 | SG vs Témoin : augmentation [112 mg/L vs 85 mg/L] (0 à 2j PP) | SG vs Témoin : augmentation (0 à 2 j PP) | | SG vs Témoin : diminution [concentration en Log] (2 à 7 j PP) | 0/4 (Témoin) 0/6 (SG) | Réponses en fonction du nombre de bolus administrés. Effets très transitoires |

MB = Mise Bas, PP= post-partum, BACA = balance alimentaire cation-anion.

Tableau 2. Effet de l'apport de SG et de sa forme d'administration sur les réponses des concentrations plasmatiques en Ca, P, Mg, et 1,25 (OH)₂ D₃, et sur la fréquence des fièvres vitulaires chez la vache laitière (données bibliographiques). MB = Mise Bas, PP= post-partum, BACA = balance alimentaire cation-anion.

| Référence | Apport de SG | | | | Paramètres d'études | | | | | Remarques |
|----------------------------|---|-------------------------------|--|----------------------------------|--|--|--|---|---|--|
| | Forme | Quantité | Equivalent 1,25 (OH) ₂ D ₃ | Apport / MB [J] | Réponse Ca [Calcémie, mg/L] (Période d'étude) | Réponse P (Période d'étude) | Réponse Mg (Période d'étude) | Réponse [VitD ₃ , mUI/ml] (Période d'étude) | Fièvre vitulaire (cas / effectif) | |
| Roux <i>et al.</i> 1979 | Solution aqueuse | 35 g/j | ? | [-8 à -2] | SG vs Témoin : augmentation [120 mg/L vs 95 mg/L] (-8 à 3j PP) | SG vs Témoin : augmentation (-8 à 3j PP) | SG = Témoin | | | Ingestion 50 g Ca/j Baisse de Ca dès arrêt de SG Pas d'effet clinique |
| | Concentré | 35 g/j | | [-6 à -3] | SG vs Témoin : augmentation [105 mg/L vs 85 mg/L] (-6 à 3j PP) | SG vs Témoin augmentation (-6 à 3j PP) | SG vs Témoin : diminution (-2 à 3j PP) | | | Ingestion 80 g Ca/j Baisse de Ca dès arrêt de SG Pas d'effet clinique |
| Ishi <i>et al.</i> 2015 | Panbonis (Poudre) | 1,3 g/j 2,6 g/j 35,8 g x 1 | | [-14 à +3] [-14 à +3] [-3] | SG (1,2 g/j) = Témoin SG (35,8 g/j) vs Témoin: augmentation [89 mg/L vs 75 mg/L] (MB) | Témoin = SG (1,2g/j) = SG (35g/j) (0 à 10j PP) | Témoin = SG (1,2 g/j) = SG (35 g/j) (0 à 10j PP) | SG (35,8 g/j) vs Témoin diminution [1,8 vs 3,0] (3j PP) | 1/7 (Témoin) 1/6 (SG, 1g) 1/6 (SG, 2g) 0/7 (SG, 35g) | Essai Station (n = 26) Effets sur Ca uniquement le jour de la MB |
| Bachman <i>et al.</i> 2017 | Bolus à libération immédiate + Bolus à libération lente | | 524 µg /j *1 | [-2] | SG vs Témoin + sels de Ca: augmentation [112mg/L vs 92 mg/L] (0 à 3j PP) | SG vs Témoin + sels de Ca : diminution (0 à 3j PP) | | SG vs Témoin + sels Ca: augmentation [5,4 vs 1,8] (0 à 3j PP) | 0/23 (SG) 1/25 (sels de Ca) 0/12 (Témoin) | Etude terrain (n = 60) Comparaison à sels de Ca/Témoin Effet court : Vit D3 (1j), Ca (3j) |

3.3.2. Efficacité du Green Bolus contenant la farine de SG

Pour démontrer l'efficacité du Green bolus, le pétitionnaire s'est appuyé sur plusieurs références bibliographiques (cf. paragraphe 3.3.1). Ainsi, il ressort des travaux de Verschaeve (2010) (référence 12) que l'efficacité de l'administration intraruminale du bolus sur la stabilisation post-partum du calcium plasmatique a été démontrée sur 7 vaches comparées à 2 animaux témoins (faible effectif d'animaux testés). Cependant, la référence ne fournit pas de données sur les fièvres vitulaires observées.

Dans la référence 13, il est montré une augmentation significative de la concentration plasmatique en calcium et en phosphore 2 à 3 jours post-partum en faveur des vaches qui ont reçu un à trois bolus. La concentration de magnésium plasmatique n'a pas été déterminée dans cette étude tout comme le BACA. En ce qui concerne les fièvres vitulaires, aucun animal (traité ou témoin) n'a développé cette pathologie.

L'étude de Bachmann *et al.* (2017) non fournie par le pétitionnaire montre que les taux sériques de calcium et de phosphore ont augmenté après le vêlage mais sans effet sur les fièvres vitulaires. La concentration de magnésium plasmatique était inchangée dans cette étude et le BACA n'a pas été étudié.

In fine, toutes ces études démontrent l'intérêt potentiel des extraits de SG pour augmenter ou stabiliser la concentration en calcium plasmatique ainsi que celle en phosphore après vêlage chez la vache laitière. Peu d'informations sont disponibles concernant l'effet des extraits de SG sur la concentration plasmatique en magnésium. **Concernant l'efficacité du green bolus contenant la farine de SG sur la fièvre vitulaire, il est impossible de conclure puisque les animaux témoins de ces études ne développent pas ou très peu cette pathologie.**

3.4. Réponses aux questions posées

Question 1 : Un aliment possédant les caractéristiques suivantes : Farine de *Solanum glaucophyllum*, administrée sous forme de bolus permettant une libération quotidienne de 1,25(OH)₂ Vit.D₃ glycoside permet-il d'atteindre l'objectif de réduction du risque de fièvre vitulaire ?

Il ressort de l'analyse des articles fournis dans le dossier du pétitionnaire, développé dans le paragraphe 3.3.1, les éléments suivants :

- Référence 6 : Cette référence ne fournit pas de données concernant la libération de 1,25 (OH)₂ D₃, permettant de conclure à un effet sur le risque de fièvre vitulaire. De plus, le nombre de fièvres vitulaires est similaire avec l'apport de sel de calcium ou l'apport de poudre (Solbone) ;
- Référence 8 : aucune information sur la teneur plasmatique en 1,25 (OH)₂ D₃ n'est fournie. Les cas de fièvre vitulaire étaient similaires entre l'apport oral de sels de calcium (2 vaches/12) et l'apport de SG (2 vaches/13) ;
- Référence 9 : cet article ne donne pas d'informations sur la libération de l'équivalent de 1,25 (OH)₂ D₃ et ne permet pas de conclure quant à une réduction du risque de fièvre vitulaire, en raison du faible effectif d'animaux testés ;

- Référence 12 : ces données montrent que l'apport de Green Bolus permet de stabiliser la calcémie post-partum, malgré le faible effectif d'animaux testés. Cependant, l'article ne fournit pas de données sur les fièvres vitulaires ;

- Référence 13 : aucune vache du lot recevant le Green Bolus ou du lot témoin n'a présenté de fièvre vitulaire durant les 28 jours post-partum ;

Par ailleurs, en conditions terrain (Bachmann *et al.* 2017, non fourni par le pétitionnaire) l'apport avant vêlage de SG sous forme de bolus à libération instantanée combiné à un bolus à libération lente augmente les taux sériques de calcium et de phosphore par rapport au niveau de base, durant 1 à 3 j post-partum par rapport au groupe témoin et au groupe traité avec des sels de calcium. Cependant, l'apport de SG n'induit pas de réduction des fièvres vitulaires par rapport aux autres traitements ; par ailleurs la taille de l'échantillon de l'étude était trop petite pour tirer une conclusion sur l'effet sur la prévention de la fièvre vitulaire.

Pour conclure, les données de la littérature fournies montrent que globalement, l'apport de SG avant vêlage permet une stabilisation ou une augmentation de la calcémie post-partum. Dans certains articles, le nombre d'animaux testés était faible et les données sur les fièvres vitulaires observées n'étaient pas renseignées. De plus, les teneurs de $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ n'étaient pas toujours mesurées (la référence 13 montre même une diminution de $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$). Qu'il s'agisse des données présentées dans le dossier ou de celles identifiées dans la littérature, l'hypocalcémie des animaux témoins (supérieure ou égale à 75 mg/l) n'était probablement pas suffisante pour déclencher une fièvre vitulaire.

Au vu de ces éléments, les experts considèrent que l'aliment à base de farine de *Solanum glaucophyllum*, administrée sous forme de bolus permettant une libération quotidienne de $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ glycosides, ne permet pas d'atteindre l'objectif de réduction du risque de fièvre vitulaire.

Question 2 : « la durée d'utilisation recommandée est-elle pertinente et adaptée à l'ONP visé ? »

Il est impossible de répondre à cette question car d'une part, la démonstration d'un effet sur les fièvres vitulaires n'est pas apportée (cf. question 1) et d'autre part, les études ont été réalisées avec un nombre faible d'animaux. Une utilisation d'un Green bolus moins de 24h avant le vêlage pourrait potentiellement augmenter ou maintenir une concentration plasmatique stable (non diminuée) de calcium et de phosphore sans affecter celle du magnésium. Aucune donnée n'est disponible sur la fièvre vitulaire.

Questions 3 : Les autres dispositions prévues, concernant les exigences générales concernant le produit, relatives à l'utilisation du bolus, sont-elles pertinentes et adaptées à l'objectif nutritionnel visé ?

1^{ère} disposition: "Application in the form of a bolus allows a daily release of around 38-46 $\mu\text{g/day}$ of $1,25(\text{OH})_2\text{-VitD}_3$ -glycoside over 10-12 days. A bolus may contain up to 20% iron in an inert, non-bioavailable form, in order to increase its density".

✓ Concernant la dose de $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ glycosides libérée par le bolus sur 10 jours :

Les seules données utilisables sont celles du pétitionnaire (dossier technique et référence 12). La référence 12 (Verschaeve 2010) fournit les données de variation de masse d'un bolus (Green

Bolus) pendant 14 jours après l'introduction dans le rumen. Après une phase initiale d'augmentation de la masse pendant 4 jours, la masse décroît linéairement pendant 6 jours puis subit une accélération de dégradation entre 10 jours et 14 jours après introduction. En admettant que la disparition de la masse soit linéaire pendant 12 jours (peu probable, biphasique probablement), et que la libération de 1,25 (OH)₂ D₃ glycosides se fasse au prorata de la disparition de la masse de bolus (72,6 g en 10 ou 12 jours en ayant pris en compte l'accroissement de poids entre J0 et J4 sinon l'estimation est incorrecte), pour un bolus contenant initialement 23 g de Panbonis (forme commerciale de SG à 20 ppm) soit 0,466 mg de 1,25 (OH)₂ D₃ glycosides, une libération de 38 à 46 µg/j de glycoside peut être calculée. Cette valeur aurait dû être validée par un dosage longitudinal de la 1,25 (OH)₂ D₃ glycosides dans le bolus à différents temps, mais le pétitionnaire argumente l'infaisabilité de tels dosages sur des quantités très faibles.

- ✓ Concernant la composition du bolus (teneur en Fer non biologiquement utilisable) :

Cette affirmation est validée par l'annexe 12.

- ✓ Concernant l'effet sur la concentration plasmatique de 1,25 (OH)₂ D₃ et le risque de surdosage :

Les données fournies dans le dossier concernant les variations de la teneur en 1,25 (OH)₂ D₃ plasmatique après traitement par SG (sous différentes formes d'apport) sont peu nombreuses (cf. tableau 1) et elles ont été complétées par celles du tableau 2. Ces données sont hétérogènes dans la variation induite par SG : la présentation sous forme de Green Bolus administrée 5 jours avant la mise-bas, peut réduire la concentration plasmatique de 1,25 (OH)₂ D₃ entre 2 et 7 jours post-partum, en accord avec les données de Ishi *et al.* (2015) avec du SG sous forme de poudre (1 x 35,8 g/j, 3 j avant la mise-bas). A l'inverse, les données de Bachmann *et al.* (2017) montrent que l'apport de SG sous forme de bolus à libération lente permet un accroissement élevé de la concentration plasmatique en 1,25 (OH)₂ D₃, 3 jours post-partum, jusqu'à 135 pg/ml (vs 46 pg/ml pour le groupe témoin). Par ailleurs, les données ultérieurement fournies par le pétitionnaire¹⁴ montrent que la concentration plasmatique en 1,25 (OH)₂ D₃ présente une allure biphasique liée à la diffusion de la vitamine D₃ du bolus avec des valeurs maximales de 80 pg/ml. Ces données (Bachman *et al.* 2017 ; dossier du pétitionnaire) sont très en dessous des concentrations plasmatiques de 1,25 (OH)₂ D₃ comprises entre 500 et 800 pg/ml, obtenues lors de traitement intramusculaire par 300 µg/j de 1,25 (OH)₂ D₃ (Kim *et al.*, 2011) pour prévenir la fièvre de lait.

2^{ème} disposition: Indications d'étiquetage

Concernant l'administration simultanée d'autres sources de vitamine D, le pétitionnaire recommande de ne pas apporter d'autres sources. Cette recommandation n'est pas étayée en l'absence de justification d'équivalence entre les teneurs en vitamine D₃ et en calcitriol.

Question 4 : La présentation sous forme de bolus (formulation retardante très concentrée) est-elle adaptée à l'ONP visé ? Ce mode d'administration est-il plus avantageux qu'un aliment complémentaire ajouté à la ration quotidienne et fournissant un apport équivalent en 1,25(OH)₂-D₃ glycoside ?

¹⁴ EMMA responses to the letters of the German Department of Consumer Protection and Food Security (BVL) of 18 December 2017

- *Concernant l'adaptation de la présentation de 1,25 (OH)₂ D₃ glycosides sous forme de bolus à l'ONP :*

Seules les données de la référence 13 (Green Bolus) et celles de Bachman *et al.* 2017, (autre type de bolus que Green Bolus) permettent d'argumenter cette question. Si l'ONP est pris dans son expression la plus stricte « Réduction du risque de fièvre vitulaire », les données de la référence 13 montrent que l'apport de Green Bolus n'est pas efficace pour réduire la fréquence des fièvres vitulaires (cf. tableau 1) puisqu'aucune fièvre vitulaire n'est observable dans le lot témoin. Il faut néanmoins noter que les effectifs d'animaux sont faibles dans cette étude (nombre d'animaux par lot = 10). Concernant l'essai de Bachman *et al.* 2017, (cf. tableau 2), un plus grand nombre de vaches laitières est utilisé (nombre total = 60), mais là encore, aucun effet n'est observable en terme de réduction de fièvre vitulaire, puisqu'il n'y en a pas dans le groupe témoin. Il n'est donc pas possible de se prononcer sur ce point quand on se limite à l'acception stricte de l'ONP.

Il faut par ailleurs noter qu'aucun des documents fournis par le pétitionnaire (à l'exception de la référence 9) ni dans les références récentes issues de la recherche bibliographique ne mentionne la valeur de la BACA des rations, dont le rôle sur les fièvres vitulaires est largement déterminant (cf. paragraphe 3.1.1). A ce titre, afin de se prononcer sur la réduction du risque de fièvre vitulaire, seul un essai combinant de façon factorielle le niveau de BACA (bas vs haut afin de favoriser l'apparition de fièvres vitulaires), et l'apport de Green Bolus vs Témoin vs un apport de 1,25 (OH)₂ D₃ glycosides équivalent de celui de Green Bolus, permettrait de répondre précisément à cette question.

- *Ce mode d'administration est-il plus avantageux qu'un aliment complémentaire ajouté à la ration quotidienne et fournissant un apport équivalent en 1,25 (OH)₂ D₃ glycosides ?*

Au vu de l'argumentaire développé, les experts ne peuvent pas se positionner sur cette question, dès lors qu'il n'y a pas eu une démonstration de l'efficacité du bolus, sachant que le dossier du pétitionnaire ne fournit pas d'essais comparant cette forme d'aliment à un aliment complémentaire classique.

3.5. Autres commentaires du CES ALAN

Le CES ALAN a débattu de la sécurité de la plante *Solanum glaucophyllum*.

Dans le produit proposé, le contenu de 1,25 (OH)₂ D₃ glycosides est standardisé et a été contrôlé par LC-MS/MS¹⁵ (Efsa 2015). Après hydrolyse, on trouve environ 10 mg de 1,25 (OH)₂ D₃/kg de poudre de feuille [7,8-13]. Les teneurs en cholécalférol et en 25(OH)-cholécalférol sont très faibles (<0,050-0,084 mg/kg et < 0,28 mg/kg respectivement). La plante et le produit contiennent donc essentiellement du calcitriol sous formes libre et glycosylée (sur les positions 1, 3 et 25, avec un à 12 hexoses sur chaque position). Ainsi, plusieurs problèmes peuvent être soulevés :

- Quelle est la biodisponibilité du calcitriol et des glycosides de calcitriol contenus dans SG ? Même chez le ruminant on peut imaginer qu'il existe des différences en fonction des glucosidases de la flore digestive ;
- Quelle est la clairance de ces formes ?
- Quelle est l'activité globale de ces formes ?

¹⁵ Liquid chromatography (LC) ; mass spectrometry (MS)

La plupart des études alimentaires en matière de sécurité ont été conduites avec du cholécalciférol car c'est la forme habituelle servant à compléter les rations et, d'ailleurs, seule la vitamine D₃ (cholécalciférol) est un additif en alimentation animale.

Le CES ALAN observe que le fait d'administrer du calcitriol directement à l'animal le détourne de tous les systèmes de régulation habituels de la vitamine D₃ dans l'organisme, d'où une incertitude quant à la toxicité du calcitriol.

Le CES ALAN constate également une absence de données scientifiques permettant d'établir une correspondance entre une quantité de calcitriol glycosylée et des Unités Internationales en vitamine D₃.

Néanmoins, le pétitionnaire, en proposant de compléter les rations des bovins, soit avec de la vitamine D₃, soit avec des feuilles de SG, a pu fournir un rapport entre une teneur de 1,25(OH)₂ D₃ glycosides et des UI (Unité Internationale) de vitamine D₃ (cf. tableau ci-dessous).

Cependant, cette équivalence n'est pas argumentée dans le dossier du pétitionnaire.

| | Ajout vitamine D ₃ dans l'aliment (UI/kg aliment) | Ajout vitamine D ₃ dans l'aliment (µg/kg aliment) | Ajout de feuilles de SG (mg/kg aliment) | Ajout de calcitriol (µg/kg aliment) |
|--------------------|--|--|---|-------------------------------------|
| Ruminants (Bovins) | 2 000 à 3 000 | 50 à 75 | 50 à 100 | 0,5 - 1 |

Note : Le pétitionnaire considère donc que 1 g de feuilles de SG a une activité équivalente à 10 µg de 1,25 (OH)₂-D₃ et que le calcitriol a une activité 100 fois supérieure à celle de la vitamine D₃.

En considérant une ingestion de 20 kg de MS par vache et par jour, la dose ingérée recommandée par le pétitionnaire est donc de 10 à 20 µg de calcitriol par jour, ce qui correspond à la dose de 1000 à 1500 µg de vitamine D₃.

Par ailleurs, selon l'avis de l'Efsa de 2015, la sécurité de la plante *Solanum glaucophyllum* administrée à des teneurs permettant la prévention contre la fièvre vitulaire chez des vaches laitières, n'a pas été établie.

Ainsi, en matière de toxicité pour l'animal, le CES Alan dispose donc des éléments suivants :

- Une absence de données scientifiques permettant d'évaluer la sécurité du produit par comparaison à la sécurité de la vitamine D₃ ;
- Corroborée par l'avis de l'Efsa qui précise que la sécurité du produit n'est pas établie ;
- Cependant, les études terrains, dans le dossier du pétitionnaire, ne relèvent pas d'effet toxique de cette plante aux doses administrées chez les vaches laitières.
- Enfin, la publication de Vieira-Neto *et al.* (2017), qui concerne l'administration de calcitriol par voie injectable (jusqu'à 300 µg), n'a pas démontré d'effets négatifs chez ces animaux.

Le CES ALAN conclut donc que si les études de terrain ne révèlent pas d'effet toxique aux doses administrées per os chez les vaches laitières, la sécurité du produit pour l'animal n'a pas été démontrée scientifiquement jusqu'à présent.

Enfin, la poudre de feuille de SG contient des glycoalcaloïdes toxiques, de la solanine et de la chaconine. Même si l'Efsa rapporte des quantités faibles (chacun des deux en LC-MS/MS < 10 mg/kg), ce point mériterait d'être débattu, d'autant plus que le fabricant n'annonce que des quantités inférieures à 1000 mg de glycoalcaloïdes par kg de produit (Efsa, 2015). Il conviendrait que le fabricant confirme que le produit contienne moins de 10 mg/kg de chacun des deux glycoalcaloïdes.

3.6. Conclusions du CES ALAN

Le dossier du pétitionnaire ne permet pas d'argumenter quant à l'efficacité du bolus sur la réduction du risque de fièvre vitulaire chez les vaches laitières. Si le produit permet de stabiliser ou d'augmenter la calcémie dans la majorité des cas, les données présentées ne permettent pas de montrer une association avec la réduction des fièvres vitulaires. Dans ces conditions, il est impossible de se prononcer sur la période d'administration d'un tel produit.

En ce qui concerne la sécurité pour l'animal, si les études de terrain reprises dans le dossier du pétitionnaire ne révèlent pas d'effet toxique aux doses administrées per os chez les vaches laitières, la sécurité du produit pour l'animal n'a pas été démontrée scientifiquement jusqu'à présent.

4. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS DE L'AGENCE

L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail endosse les conclusions du CES « Alimentation animale ».

Dr Roger Genet

MOTS-CLES

Objectif nutritionnel particulier, fièvre vitulaire, vache laitière, *Solanum glaucophyllum*, bolus, alimentation animale.

Particular nutritional purpose, milk fever, dairy cow, *Solanum glaucophyllum*, bolus, animal feedingstuffs.

BIBLIOGRAPHIE

- Allen, DG, DP Anderson, LB Jeffcott, KE Quesenberry, OM Radostitis, PT Reeves et AM Wolf. 2008. *Le manuel vétérinaire Merck. Troisième édition française : Editions d'Après*. Traduit par. Edité.
- Aubadie-Ladrix, M. 2005. "Abord pratique d'une fièvre vitulaire chez la vache." *Le point vétérinaire* 257:40-42.
- Bachmann, Heinrich, Michael Lanz, Susanne Kehrlé, Wolfgang Bittner, Annick Toggenburger, Georg A Mathis et Walter Rambeck. 2017. "Effects of a sustained release formulation of 1, 25-dihydroxyvitamin D3-glycosides for milk fever prevention on serum 1, 25-dihydroxyvitamin D3, calcium and phosphorus in dairy cows." *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 173:301-307.
- Block, E. 1984. "Manipulating dietary anions and cations for prepartum dairy cows to reduce incidence of milk fever." *Journal of dairy science* 67 (12):2939-2948.
- Campero, Carlos Manuel et E Odriozola. 1990. "A case of solanum malacoxylon toxicity in pigs." *Veterinary and human toxicology* 32 (3):238-239.
- Chamberlin, WG, JR Middleton, JN Spain, GC Johnson, MR Ellersieck et P Pithua. 2013. "Subclinical hypocalcemia, plasma biochemical parameters, lipid metabolism, postpartum disease, and fertility in postparturient dairy cows." *Journal of dairy science* 96 (11):7001-7013.
- DeGaris, PJ et IJ Lean. 2008. "Milk fever in dairy cows: A review of pathophysiology and control principles." *The Veterinary Journal* 176 (1):58-69.
- Dougherty, SA, SA Center et DA Dzanic. 1990. "Salmon calcitonin as adjunct treatment for vitamin D toxicosis in a dog." *Journal of the American Veterinary Medical Association* 196 (8):1269-1272.
- EFSA. 2015. "Scientific Opinion on the safety of Solanum glaucophyllum standardised leaves as feed material." *EFSA Journal* 13 (1):3967.
- Eisenberg, SWF, L Ravesloot, AP Koets et W Grünberg. 2019. "Effect of dietary phosphorus deprivation on leukocyte function in transition cows." *Journal of dairy science* 102 (2):1559-1570.
- Ender, F, IW Dishington et A Helgebostad. 1971. "Calcium balance studies in dairy cows under experimental induction and prevention of hypocalcaemic paresis puerperalis: The solution of the aetiology and the prevention of milk fever by dietary means." *Zeitschrift fuer Tierphysiologie Tierernaehrung und Futtermittelkunde* 28 (1-5):233-256.
- Gaynor, PJ, FJ Mueller, JK Miller, N Ramsey, JP Goff et RL Horst. 1989. "Parturient hypocalcemia in Jersey cows fed alfalfa haylage-based diets with different cation to anion ratios." *Journal of dairy science* 72 (10):2525-2531.
- Goff, JP. 2008. "The monitoring, prevention, and treatment of milk fever and subclinical hypocalcemia in dairy cows." *The Veterinary Journal* 176 (1):50-57.
- Goff, JP et RL Horst. 1997. "Effects of the addition of potassium or sodium, but not calcium, to prepartum rations on milk fever in dairy cows." *Journal of dairy science* 80 (1):176-186.

- Goff, JP, RL Horst, FJ Mueller, JK Miller, GA Kiess et HH Dowlen. 1991. "Addition of chloride to a prepartal diet high in cations increases 1, 25-dihydroxyvitamin D response to hypocalcemia preventing milk fever." *Journal of dairy science* 74 (11):3863-3871.
- Goings, RL, NL Jacobson, DC Beitz, ET Littledike et KD Wiggers. 1974. "Prevention of parturient paresis by a prepartum, calcium-deficient diet." *Journal of dairy science* 57 (10):1184-1188.
- Horst, RL, JP Goff et TA Reinhardt. 2003. "Role of vitamin D in calcium homeostasis and its use in prevention of bovine periparturient paresis." *ACTA VETERINARIA SCANDINAVICA SUPPLEMENTUM* 97:35-50.
- Horst, RL, JP Goff, TA Reinhardt et DR Buxton. 1997. "Strategies for preventing milk fever in dairy cattle." *Journal of dairy science* 80 (7):1269-1280.
- Hove, K et T Kristiansen. 1982. "Prevention of parturient hypocalcemia: effect of a single oral dose of 1, 25-dihydroxyvitamin D3." *Journal of dairy science* 65 (10):1934-1940.
- Ishii, Junichiro, Akifumi Uramoto, Yoshikazu Nagao et Hisaya Goto. 2015. "Feeding *Solanum glaucophyllum* to preparturient multiparous cows prevents postparturient hypocalcemia." *Animal Science Journal* 86 (10):869-877.
- Kronqvist, C, U Emanuelson, R Spörndly et K Holtenius. 2011. "Effects of prepartum dietary calcium level on calcium and magnesium metabolism in periparturient dairy cows." *Journal of dairy science* 94 (3):1365-1373.
- Lean, IJ, PJ DeGaris, DM McNeil et E Block. 2006. "Hypocalcemia in dairy cows: meta-analysis and dietary cation anion difference theory revisited." *Journal of dairy science* 89 (2):669-684.
- Leno, BM, SE LaCount, CM Ryan, D Briggs, M Crombie et TR Overton. 2017. "The effect of source of supplemental dietary calcium and magnesium in the peripartum period, and level of dietary magnesium postpartum, on mineral status, performance, and energy metabolites in multiparous Holstein cows." *Journal of dairy science* 100 (9):7183-7197.
- Martín-Tereso, J et H Martens. 2014. "Calcium and magnesium physiology and nutrition in relation to the prevention of milk fever and tetany (dietary management of macrominerals in preventing disease)." *Veterinary Clinics: Food Animal Practice* 30 (3):643-670.
- Mello, JRB. 2003. "Calcinosis—calcinogenic plants." *Toxicon* 41 (1):1-12.
- Moore, SJ, MJ VandeHaar, BK Sharma, TE Pilbeam, DK Beede, HF Bucholtz, JS Liesman, RL Horst et JP Goff. 2000. "Effects of altering dietary cation-anion difference on calcium and energy metabolism in peripartum cows." *Journal of dairy science* 83 (9):2095-2104.
- Morrow, C. 2001. "Cholecalciferol poisoning." *Veterinary Medicine*. 96 905911.
- Neves, RC, BM Leno, T Stokol, TR Overton et JAA McArt. 2017. "Risk factors associated with postpartum subclinical hypocalcemia in dairy cows." *Journal of dairy science* 100 (5):3796-3804.
- Oetzel, GR, JD Olson, CR Curtis et MJ Fettman. 1988. "Ammonium chloride and ammonium sulfate for prevention of parturient paresis in dairy cows." *Journal of dairy science* 71 (12):3302-3309.

- Pehrson, B, C Svensson, I Gruvaeus et M Virkki. 1999. "The influence of acidic diets on the acid-base balance of dry cows and the effect of fertilization on the mineral content of grass." *Journal of dairy science* 82 (6):1310-1316.
- Puche, RC, ME Locatto, JL Ferretti, MC Fernandez, MB Orsatti et JL Valenti. 1976. "The effects of long term feeding of *Solanum glaucophyllum* to growing rats on Ca, Mg, P and bone metabolism." *Calcified tissue research* 20 (1):105-119.
- Schelcher, F, G Foucras, G Meyer et JF Valarcher. 2002. "Traitement des hypocalcémies chez la vache laitière." *Le point vétérinaire* 225:56-62.
- Shappell, Nancy W, Joseph H Herbein, Leonard J Deftos et Robert J Aiello. 1987. "Effects of dietary calcium and age on parathyroid hormone, calcitonin and serum and milk minerals in the periparturient dairy cow." *The Journal of nutrition* 117 (1):201-207.
- Sørensen, JT, S Østergaard, H Houe et J Hindhede. 2002. "Expert opinions of strategies for milk fever control." *Preventive veterinary medicine* 55 (1):69-78.
- Thilsing-Hansen, T, RJ Jørgensen et Søren Østergaard. 2002. "Milk fever control principles: a review." *Acta Veterinaria Scandinavica* 43 (1):1.
- Venjakob, PL, S Borchardt et W Heuwieser. 2017. "Hypocalcemia—Cow-level prevalence and preventive strategies in German dairy herds." *Journal of dairy science* 100 (11):9258-9266.
- Yamagishi, N, M Miyazaki et Y Naito. 2006. "The expression of genes for transepithelial calcium-transporting proteins in the bovine duodenum." *The Veterinary Journal* 171 (2):363-366