

Influence de différents régimes alimentaires sur le profil en acides gras des spermatozoïdes de taureaux d'insémination et leur impact sur la résistance à la congélation

Présenté par Kevin Delhasse

Promoteur : Prof. Yvan Larondelle (UCL/LIBST)

Lecteurs : Prof. Isabelle Donnay (UCL/LIBST)
Emilie Henrotte (AWÉ)

Mémoire de fin d'études présenté en vue de l'obtention
du diplôme de **Bioingénieur : sciences agronomiques**

Remerciements

Je voudrais d'abord remercier mon promoteur, Mr Yvan Larondelle pour ses conseils, ses encouragements et sa relecture qui m'ont grandement aidé.

Je tiens également à remercier chaleureusement Mme Isabelle Donnay, pour sa disponibilité permanente et ses précieux conseils.

Je suis reconnaissant envers Emilie Henrotte d'avoir accepté d'être membre du jury et pour le temps consacré à ce mémoire.

Un tout grand merci à Catherine Rasse qui a réalisé l'analyse statistique de mes données.

Merci à toute l'équipe de BNTE et tout spécialement à Eric Mignolet, Julie Mellery, Gilles Tinant et Mélusine Van Larebeke pour leurs réponses à mes questions lors des manipulations. Merci également aux autres étudiants de la BNTE pour l'entraide et le soutien. Ils m'ont permis de travailler dans une atmosphère amicale et constructive.

Enfin, je voudrais remercier ma famille de m'avoir soutenu tout au long de mes études et lors de la rédaction de ce mémoire. Je remercie particulièrement mes parents pour leurs relectures attentives.

Table des matières

Liste des abréviations	6
Avant-propos	7
Revue de la littérature	8
1. Le métabolisme des lipides chez les bovins	8
1.1 La classification des lipides et des acides gras	8
1.2 Les spécificités du métabolisme des ruminants	8
a) La biosynthèse de novo et la bioconversion des acides gras	9
b) La digestion ruminale des lipides alimentaires	10
c) La digestion et l'absorption post ruminale des lipides alimentaires	11
d) Le transport des lipides	12
2. La reproduction chez les taureaux	12
2.1 La spermatogenèse	12
a) Le testicule	12
b) La spermatogenèse	14
c) La barrière hémato-testiculaire	15
2.2 La maturation épидидymaire et la capacitation des spermatozoïdes	16
a) La maturation épидидymaire	16
b) La capacitation des spermatozoïdes	16
2.3 La fécondation	17
2.4 La congélation/décongélation de la semence pour l'insémination artificielle	17
2.5 Les spécificité des mâles BBB par rapport aux Holstein	18
a) La qualité de la semence BBB	18
b) La circonférence scrotale	19
3. Les acides gras dans les spermatozoïdes	20
3.1 La composition membranaire en acides gras des spermatozoïdes	20
3.2 Le lien entre la résistance à la congélation des spermatozoïdes et leurs acides gras membranaires	22
a) La fluidité membranaire	22
b) Le stress oxydatif des spermatozoïdes	24

Objectif	25
Matériel et méthodes	26
1. Détermination du profil en acides gras	26
1.1 Centrifugation	26
1.2 Extraction lipidique	26
1.3 Méthylation	27
1.4 Identification et quantification des esters méthyliques d'acides gras par chromatographie en phase gazeuse	28
2. Design expérimental	29
2.1 Conditions expérimentales	29
2.2 Échantillonnage	30
2.3 Régimes	31
3. Analyses statistiques	33
Résultats et discussions	34
1. La mise au point	34
1.1 Le test de répétabilité	34
1.2 Les acides gras non identifiés	35
1.3 Le profil en acides gras du plasma séminal	37
2. La quantification des acides gras	38
3. Les profils en acides gras des spermatozoïdes	40
3.1 La présentation des résultats	41
3.2 L'effet saison et l'effet régime sur les proportions de l'acide docosahexaénoïque	42
a) L'effet saison	42
b) L'effet régime	42
3.3 L'effet saison et l'effet régime sur les proportions de l'acide arachidonique	44
a) L'effet saison	44
b) L'effet régime	44
3.4 L'effet saison et l'effet régime sur les proportions des différentes classes d'acides gras	46
a) L'effet saison	46
b) L'effet régime	47

4. La qualité des spermatozoïdes après décongélation-----	49
4.1 L'effet saison et l'effet régime sur la qualité des spermatozoïdes après décongélation -----	49
a) L'effet saison -----	49
b) L'effet régime -----	50
4.2 L'effet des proportions en acide docosahexaénoïque, en acide arachidonique et celles des différentes classes d'acides gras sur la qualité des spermatozoïdes après décongélation -----	51
<i>Conclusions et perspectives-----</i>	54
<i>Bibliographie-----</i>	56
<i>Annexes -----</i>	65

Liste des abréviations

ALA	Alpha-linolenic acid (acide alpha-linolénique)
AA	Arachidonic acid (acide arachidonique)
AWÉ	Association Wallonne de l'Elevage
BBB	Blanc bleu belge
DHA	Docosahexaenoic acid (acide docosahexaénoïque)
DPA	Docosapentaenoic acid (acide docosapentaénoïque)
EPA	Eicosapentaenoic acid (acide eicosapentaénoïque)
FAME	Fatty acid methyl esters (esters méthyliques d'acides gras)
FAS	Fatty acid synthase (acide gras synthase)
FID	Flame ionization detector (détecteur à ionisation de flamme)
GLM	General linear model (Modèle linéaire général)
LA	Linoleic acid (acide linoléique)
MUFA	Monounsaturated fatty acid (acide gras monoinsaturé)
PUFA	Polyunsaturated fatty acid (acide gras polyinsaturé)
ROS	Reactive oxygen species (dérivés réactifs de l'oxygène)
SFA	Saturated fatty acid (acide gras saturé)
UFA	Unsaturated fatty acid (acide gras insaturé)
VEVI	VoederEenheid Vleesvee Intensief (valeur énergétique pour la production de viande)
XFA	X fatty acid (acide gras "X")

Avant-propos

En Belgique, deux races bovines prédominent : le Blanc Bleu Belge (BBB) pour la production de viande et la Holstein pour la production de lait. La race BBB atteint 55% du troupeau et 85% des races viandeuses (source : AWÉ). Cette race est uniquement présente en race pure en Belgique et dans le Nord de la France.

La moitié de la reproduction de ces BBB se fait par insémination artificielle avec de la semence congelée. Par son centre d'insémination, l'association wallonne de l'élevage (AWÉ) a fortement contribué à cette dynamique en Belgique et à l'étranger.

Actuellement, la production de paillettes d'insémination est en constante augmentation. Entre 2010 et 2016, la production de doses d'insémination à l'AWÉ est passée de 1 400 000 à 4 000 000 principalement causée par la demande à l'exportation. En effet, en 2016, environ 25% des doses produites par l'AWÉ ont été utilisées en Belgique, le reste étant destiné au croisement industriel consistant à l'insémination de vaches laitières afin d'obtenir des veaux de bonne conformation bouchère. Mais l'offre en doses d'insémination de BBB n'arrive plus à répondre à la demande.

Malheureusement, les taureaux BBB ont une production de spermatozoïdes inférieure aux autres races, à la fois quantitativement et qualitativement. On observe notamment une moins bonne résistance de leur semence à la congélation.

Ce mémoire est réalisé dans le cadre du projet Fertiwalim du pôle de compétitivité wallon Wagralim. Il est le fruit d'une collaboration entre le LIBST (UCL), le CRA-W et deux entreprises du secteur agricole (l'AWÉ pour la production de doses d'insémination et Dumoulin pour la production d'aliments pour bétail). Ce projet a pour but d'améliorer la qualité et la résistance à la congélation de la semence BBB en optimisant l'alimentation des taureaux. Ceci permettrait d'augmenter le nombre de doses produites par éjaculat de taureaux BBB, en réduisant le nombre de spermatozoïdes par dose, permettant ainsi de répondre à la demande actuelle.

Un essai alimentaire a été réalisé à l'AWÉ depuis avril 2017 et s'est terminé en janvier 2018 au cours duquel 5 régimes différents ont été testés sur 29 taureaux BBB et 8 taureaux Holstein. Mon mémoire a consisté à observer l'impact de ces régimes sur la composition en acides gras des spermatozoïdes BBB pour ensuite corréler ces compositions avec les paramètres de qualité de la semence (pré et post congélation).

Revue de la littérature

Cette revue de la littérature s'articulera en trois parties. La première présentera le métabolisme des lipides chez les bovins. La deuxième partie décrira la reproduction chez les taureaux. La troisième partie fera le lien entre la composition en acides gras membranaires et la résistance à la congélation des spermatozoïdes.

1. Le métabolisme des lipides chez les bovins

1.1 La classification des lipides et des acides gras

Les lipides peuvent être classés en deux grands groupes : les lipides saponifiables (constitués d'acide gras) et les lipides polyisopréniques non saponifiables. Nous allons uniquement nous intéresser aux lipides présents majoritairement au sein des spermatozoïdes. Étant donné un cytoplasme quasi inexistant, ces lipides proviennent principalement de la membrane plasmique des spermatozoïdes et des organites qu'ils contiennent (Shechter, 2000). On peut observer 2 groupes de lipides composant les membranes plasmiques de ces spermatozoïdes : les lipides simples et les lipides complexes. Parmi les lipides simples, on retrouve les acides gras et les stérols (cholestérol). Les lipides complexes regroupent quant à eux, les phosphoglycérides (phospholipides) (Murray et al., 1999).

Les acides gras sont constitués d'une fonction acide fixée sur une chaîne aliphatique. Ils sont nommés selon leur nombre d'atomes de carbone, le nombre et le positionnement des doubles liaisons et la nature de ces doubles liaisons (cis vs trans). Le groupe carboxyle et le groupe méthyle sont respectivement placés en début et en fin de chaîne carbonée.

Les acides gras sont classés en 3 catégories selon le degré d'insaturation de la chaîne carbonée : les acides gras saturés (SFA), monoinsaturés (MUFA) et polyinsaturés (PUFA) qui possèdent respectivement aucune, une et minimum deux doubles liaisons. Parmi les PUFA, on distingue deux catégories : les PUFA oméga 3 (n-3) et les PUFA oméga 6 (n-6). Ils possèdent respectivement leur première double liaison sur la 3^{ème} et la 6^{ème} liaison carbone-carbone en comptant à partir du groupement méthyle situé à l'extrémité de la chaîne carbonée (Glencross, 2009).

1.2 Les spécificités du métabolisme des ruminants

Les bovins possèdent un système digestif particulier constitué de trois pré-estomacs (rumen, réticulum et omasum) et d'un estomac vrai, glandulaire (abomasum). Ci-dessous, nous verrons la biosynthèse *de novo* et la bioconversion des acides gras mais également la digestion, l'absorption et le transport des lipides depuis l'arrivée des aliments dans le rumen, jusqu'à la fin de l'intestin grêle.

a) La biosynthèse de novo et la bioconversion des acides gras

La biosynthèse *de novo* des acides gras est réalisée dans le cytosol des hépatocytes du foie et des cellules du tissu adipeux. Elle est catalysée par un complexe enzymatique d'acide gras synthase (FAS) possédant un premier site de liaison pour l'acétyl-CoA et un deuxième pour le malonyl-CoA. Chez les ruminants, l'essentiel de l'acétyl-CoA dérive de l'acétate produit massivement dans le rumen. Peu d'acétyl-CoA dérive du catabolisme du glucose et des acides aminés étant donné la faible activité de l'ATP citrate lyase chez les ruminants. Le malonyl-CoA est obtenu par carboxylation de l'acétyl-CoA en présence d'ATP via l'acétyl-CoA carboxylase. Le malonyl-CoA est successivement ajouté à l'acétyl-CoA à l'aide de la FAS et du NADPH (équivalents réducteurs). Chaque ajout correspond à une élongation de la chaîne carbonée de deux carbones. La dernière étape consiste à séparer le FAS de l'acide gras formé à 16 carbones (acide palmitique). Les SFA possédant plus de 16 carbones et les MUFA (ex : C16:1, C18:1) seront synthétisés à partir de cet acide gras (Glencross, 2009).

Les mammifères ne possèdent pas de désaturase capable de placer une double liaison entre le C10 et le groupement méthyl terminal de la chaîne carbonée. Par conséquent, les bovins ne possèdent pas les $\Delta 12$ et $\Delta 15$ désaturases, enzymes permettant la conversion de l'acide oléique (C18:1 n-9) en acide linoléique (LA, C18:2 n-6) puis en acide alpha-linolénique (ALA, C18:3 n-3). Ces deux derniers acides gras sont considérés comme des acides gras essentiels, devant provenir de l'alimentation. Par la suite, ils seront successivement désaturés et allongés par les enzymes du bovin pour former des acides gras plus longs et plus insaturés (Fig.1).

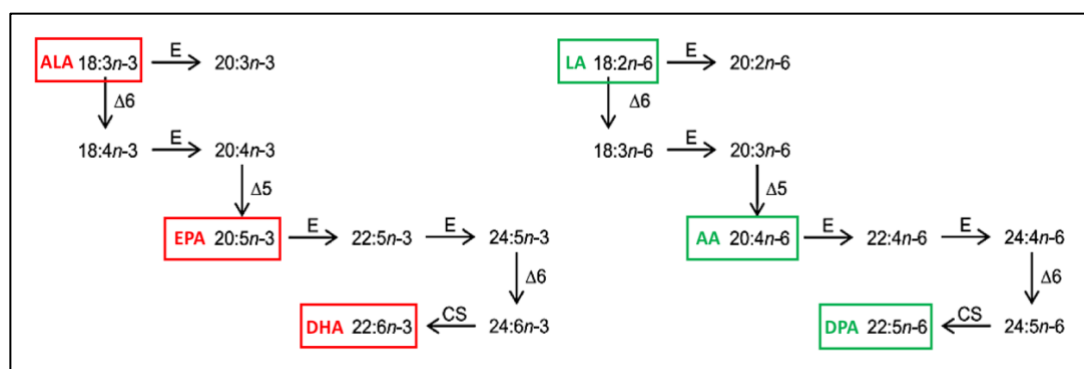


Figure 1 Les voies métaboliques de bioconversion des oméga3 et oméga6 (Debier, 2015)

ALA = acide alpha-linolénique, EPA = acide eicosapentaénoïque, DHA = acide docosahexaénoïque, LA = acide linoléique, AA = acide arachidonique, DPA = acide docosapentaénoïque Δ = désaturase, E = élongase et CS = chain-shortening

Prenons l'exemple de la bioconversion du ALA en acide docosahexaénoïque (DHA). Le ALA est d'abord désaturé ($\Delta 6$ désaturase) en C18:4 n-3. Ce dernier subit ensuite une élongation pour former le 20:4 n-3 pour être désaturé à son tour ($\Delta 5$ désaturase) et former l'acide eicosapentaénoïque (EPA) (20:5 n-3). L'EPA est ensuite transformé en DHA via une double élongation formant successivement le 22:5 n-3 et le 24:5 n-3, suivie d'une désaturation

($\Delta 6$ désaturase) pour former le 24:6 n-3 et enfin d'une étape de β -oxydation formant le DHA (22:6 n-3). La bioconversion du LA (18:2 n-6) en DPA (22:5 n-6) se fait de la même façon. Par conséquent, les deux voies de conversion du LA et du ALA en acides gras plus longs et plus insaturés, peuvent être en compétition étant donné qu'elles utilisent les mêmes enzymes. Il a été montré que les enzymes (désaturases et élongases) possèdent une plus grande affinité pour les acides de la voie n-3 (William, 2000).

b) La digestion ruminale des lipides alimentaires

Les acides gras présents dans l'alimentation des bovins sont généralement sous leur forme ester (triglycérides, glycolipides, phospholipides). Deux processus importants se déroulent dans le rumen : la lipolyse et la biohydrogénation des acides gras insaturés (UFA).

La lipolyse des triglycérides, des phospholipides et des glycolipides alimentaires est un processus rapide se déroulant dans le rumen du bovin. Elle est effectuée par les lipases, les phospholipases et les galactosidases des microorganismes en symbiose avec le bovin (10^{10} bactéries, 10^7 protozoaires et 10^6 champignons et levures par ml de jus de rumen). Les lipases bactériennes permettent notamment l'hydrolyse complète des triglycérides alimentaires. Les acides gras à longue chaîne de carbone vont être isomérisés et hydrogénés, tandis que le glycérol sera transformé en acides gras volatils (AGV). Ces AGV, principalement le propionate et le butyrate à partir du glycérol, mais aussi l'acétate si on considère l'ensemble des substrats fermentescibles, sont la source majeure d'énergie pour le bovin. Non utilisables par les microbes, ils sont absorbés au niveau du rumen afin d'éviter une diminution trop importante de son pH pouvant impacter négativement la population microbienne présente (Beam et al., 2000 ; Buccioni et al., 2012).

Les UFA libérés après l'hydrolyse des lipides alimentaires vont subir une biohydrogénation dans le rumen (processus isomérisant et saturant les acides gras) causée principalement par les bactéries (Buccioni et al., 2012). Ce processus implique plusieurs conversions successives des acides gras insaturés à 18 carbones, fournissant une multitude d'isomères d'acides gras également à 18 carbones (Ferlay et al., 2017). Une étude a constaté que le pourcentage de biohydrogénation pouvait varier en fonction du degré de saturation des acides gras. En effet, on observe respectivement pour l'acide oléique, le LA et le ALA une biohydrogénation d'environ 72, 86 et 92 %. En revanche, une diminution 10 à 30 % de ces pourcentages peut avoir lieu si les acides gras issus de l'alimentation sont protégés chimiquement ou physiquement contre les microorganismes du rumen (Scollan et al., 2001).

Malgré la multitude d'isomères, deux voies prédominantes de biohydrogénation existent. La première est la biohydrogénation de LA (C18:2 *cis9 cis12*) passant par l'isomère C18:2 *cis9 trans11* correspondant à l'acide ruménique, un acide linoléique conjugué (CLA), lequel est hydrogéné en acide vaccénique (C18:1 *trans11*) puis en acide stéarique (C18:0) (Bauman et al., 2003 ; Harvatine et al., 2009). La deuxième voie prédominante est la

biohydrogénation de ALA (C18:3 *cis9 cis12 cis15*), isomérisé en C18:3 *cis9 trans11 cis15* correspondant à l'acide alpha-linolénique conjugué (CLnA) suivi d'une triple hydrogénation passant par le C18:2 *trans11 cis15*, le C18:1 *trans11* pour arriver au C18:0 (Shingfield et al., 2014).

Certaines études ont observé une influence de l'alimentation sur la population bactérienne et par conséquent, sur la présence des différents isomères d'acides gras dans le rumen. En effet, lors d'une incubation *in vitro* du ALA avec des *Lactobacillus plantarum*, une augmentation de la teneur en C18:2 *trans10 cis15*, isomère du C18:2 *trans11 cis15*, a été observée (Kishino et al., 2003). De plus, des études ont constaté une augmentation de la teneur en C18:2 *trans11 cis13* et C18:2 *cis9 trans13* dans le duodénum des vaches ayant reçu une ration avec un supplément d'huile de lin (Loor et al., 2004 ; Loor et al., 2005). On constate également une plus grande présence des bactéries comme *Butyrivibrio proteoclasticum* et *Butyrivibrio fibrisolvens* (bactéries fibrolytiques) lorsque la ration donnée aux bovins est enrichie en fibres. Ces bactéries sont à l'origine de la formation des isomères *trans11* du LA dans le rumen. En revanche, on constate avec un régime enrichi en concentrés, une plus grande teneur en isomères *trans10* dans le rumen causé par la présence de bactéries comme *Propionibacterium acnes* et *Megasphaera elsdenii* (bactéries impliquées dans le métabolisme de l'acide lactique) (Buccioni et al., 2012).

c) La digestion et l'absorption post ruminale des lipides alimentaires

Les produits de la digestion des lipides rentrant dans l'abomasum (estomac vrai) sont composés d'environ 70 à 90 % d'acides gras libres non estérifiés. La partie restante correspond à des phospholipides, glycolipides, triglycérides et esters de cholestérol. Les lipides ne subissent pas de transformations dans l'abomasum. En revanche, son acidité va servir à dissocier les acides gras de leur protection chimique éventuelle. Si les matières grasses ingérées n'ont pas été traitées et protégées préalablement de la biohydrogénation dans le rumen, on retrouvera majoritairement des SFA et des MUFA dans l'abomasum (Toullec et al., 1995).

Les produits de la digestion des lipides rentrant dans l'intestin grêle (duodénum) vont être émulsionnés au contact des sécrétions biliaires (sels biliaires, phospholipides, cholestérol). Cette émulsion permet de transférer les lipides adsorbés sur les particules alimentaires vers une phase micellaire soluble au contact de la bile et des enzymes pancréatiques (colipase, lipase, cholestérol estérase et phospholipase). Par la suite, des micelles mixtes formées par des sels biliaires et les produits de la digestion lipidique, vont entrer en contact étroit avec les microvillosités des cellules de l'intestin grêle (entérocytes), ceci afin de faciliter l'absorption de ces lipides dans le jéjunum de l'intestin grêle au travers de la membrane apicale de ces entérocytes. Cette absorption se fait par simple diffusion ou

via des transporteurs spécifiques. Les sels biliaires sont ensuite réabsorbés au niveau de l'iléon de l'intestin grêle (Bauchart, 1993 ; Doreau et al., 1994).

De nombreux facteurs influencent la digestibilité des acides gras (la nature de la matière grasse ingérée, le degré d'insaturation, la quantité et la fréquence de distribution de l'aliment) (Gonthier et al., 2004 ; Looor et al., 2004). Des études ont montré que plus le degré d'insaturation et la quantité de lipides ingérés augmentaient, plus la digestibilité des acides gras augmentait. De plus, il a été démontré que la digestibilité des acides gras (= 75-80 %) serait diminuée par la présence de cations divalents (ex : calcium) dans la ration (Doreau et al., 1994 ; Gonthier et al., 2004).

d) Le transport des lipides

Une fois l'absorption des lipides réalisée, on observe une « resynthèse » des triglycérides dans le réticulum endoplasmique des entérocytes mais également une « resynthèse » des esters de cholestérol et des phospholipides dans le cytosol de ces cellules. Les triglycérides, les esters de cholestérol et les phospholipides sont ensuite assemblés en lipoprotéines (chylomicrons) par liaison avec des apolipoprotéines. Les chylomicrons formés sont des complexes hydrosolubles, dont la partie périphérique est constituée par une monocouche hydrophile de phospholipides et d'apolipoprotéines, et dont le noyau central hydrophobe contient des lipides apolaires tels que les triglycérides et les esters de cholestérol. L'élaboration de ces chylomicrons est achevée dans l'appareil de Golgi des entérocytes. Ils sortiront de ces cellules par exocytose afin d'atteindre le réseau lymphatique (Bauchart, 1993).

2. La reproduction chez les taureaux

2.1 La spermatogenèse

La spermatogenèse est un processus se déroulant dans les tubes séminifères des testicules et décrivant la transformation des spermatogonies (cellules souches diploïdes) en spermatozoïdes (cellules haploïdes hautement différenciées) (Bonnes et al., 2011).

a) Le testicule

Le testicule (Fig.2) est enveloppé par un tissu conjonctif renfermant quelques fibres élastiques et musculaires, l'albuginée, qui s'invagine pour délimiter les lobules testiculaires. A l'intérieur de chaque lobule, on retrouve deux compartiments interdépendants : le tissu interstitiel et les tubes séminifères (Fig.3). Le tissu interstitiel est constitué de tissu conjonctif et contient notamment des vaisseaux lymphatiques et des cellules de Leydig situées le long des capillaires sanguins, assurant la sécrétion d'hormones mâles (Fawcett, 1973). Concernant

les tubes séminifères, deux types de cellules y résident : les cellules germinales aux différents stades de leur évolution et les cellules de Sertoli. Ces dernières reposent sur une lame basale en périphérie du tube séminifère et possèdent un cytoplasme s'étirant jusqu'à la lumière du tube tout en s'insinuant entre les cellules germinales. Les tubes séminifères se rejoignent tous pour former un réseau de canaux, le rete-testis se dirigeant vers la tête de l'épididyme (Saint-Dizier et al., 2014).

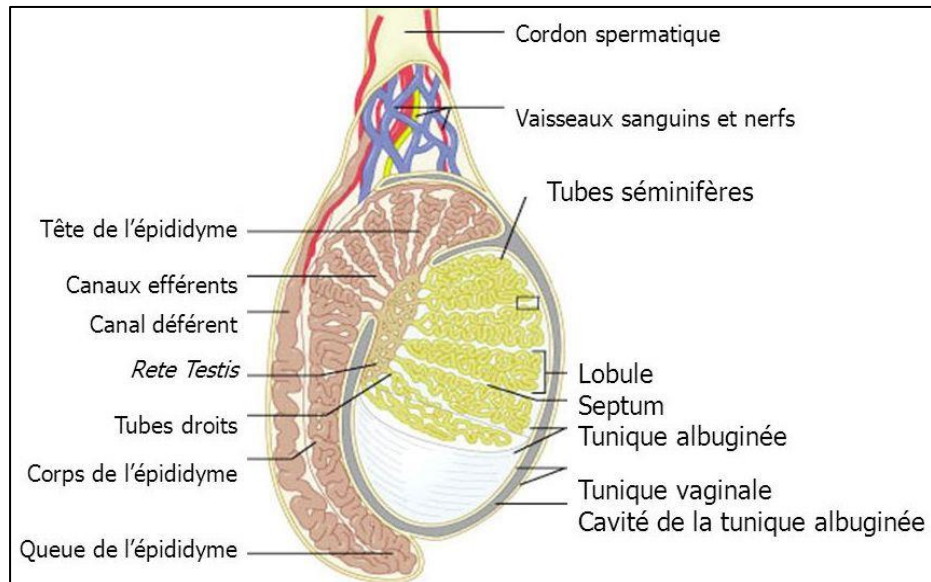


Figure 2 Schéma d'un testicule

Source : <http://slideplayer.fr/slide/3136372/>

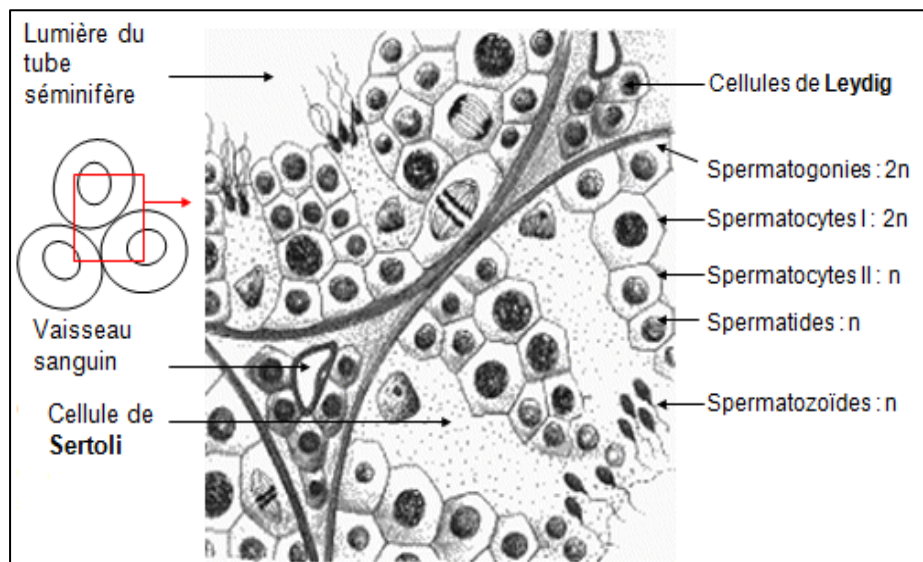


Figure 3 Schéma zoomé d'une coupe transversale dans un lobule testiculaire

Source : http://www.bio-top.net/Transmission_vie/5_gametogenese.htm

b) La spermatogenèse

La spermatogenèse est l'ensemble des processus de multiplication et de différenciation cellulaire des cellules germinales mâles se déroulant depuis la puberté dans les tubes séminifères des testicules (Fig.4). Elle est divisée en deux grandes parties (la spermatocytogenèse et la spermiogenèse) dans lesquelles, les cellules germinales passent par cinq stades cellulaires caractéristiques : les spermatogonies, les spermatocytes I et II, les spermatides et les spermatozoïdes. On les retrouve dans cet ordre au sein des tubes séminifères, depuis la lame basale située en périphérie vers la lumière centrale. La durée de la spermatogenèse, depuis la division des spermatogonies souches jusqu'à la libération des spermatozoïdes dans la lumière du tube séminifère est de 61 jours chez les taureaux (Bonnes et al., 2011).

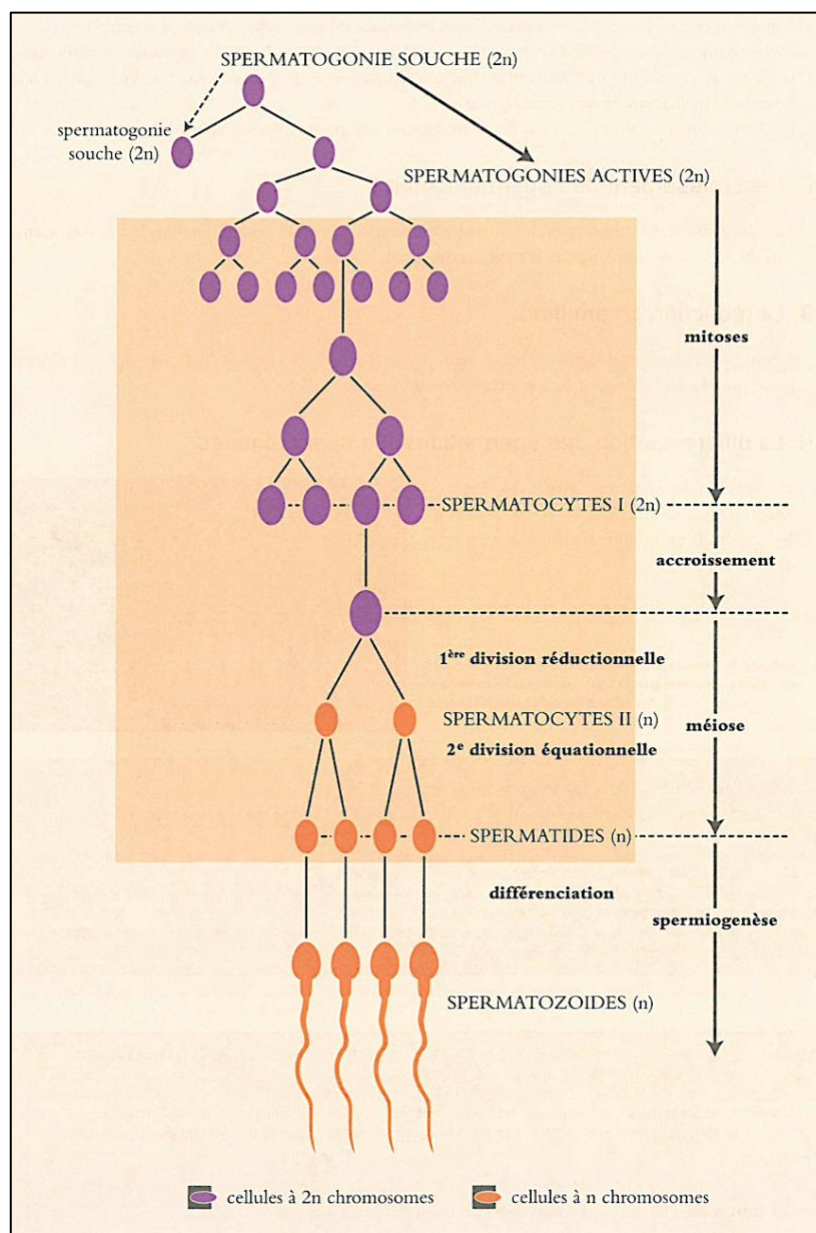


Figure 4 Les étapes de la spermatogenèse (Bonnes et al., 2011)

La spermatocytogenèse commence par la division mitotique d'une cellule souche en deux cellules souches filles dont une seule poursuivra la spermatogenèse. Cette multiplication des spermatogonies assure le renouvellement perpétuel des cellules souches tout en gardant une population constante de ces cellules dans les tubes séminifères. La deuxième cellule fille deviendra par conséquent, une spermatogonie souche d'un cycle suivant. Après quatre mitoses successives de la cellule souche fille, les spermatocytes I sont formés et subissent un important accroissement de taille principalement dû à la duplication de l'ADN. La méiose des spermatocytes I (cellules diploïdes) peut ensuite commencer. Chaque spermatocyte donne dans un premier temps deux spermatocytes II après une première division réductionnelle (cellules haploïdes) puis dans un deuxième temps, quatre spermatides (cellules haploïdes) après une deuxième division équationnelle. Il est à remarquer que depuis les divisions cellulaires des spermatogonies jusqu'à la formation des spermatides, la cytokinèse est incomplète, laissant les cellules connectées entre elles par des ponts cytoplasmiques (Saint-Dizier et al., 2014 ; Hyttel et al., 2010).

Au cours de la spermiogenèse, les spermatides dépourvues de toute capacité à se diviser, vont se transformer progressivement en spermatozoïdes en bordure de lumière du tube séminifère. Cette transformation est un processus complexe de différenciation cellulaire tant d'un point de vue morphologique que fonctionnel, donnant ainsi des spermatozoïdes mobiles hautement spécialisés. Ces spermatozoïdes obtenus sans divisions cellulaires, mesurent environ 50 à 80 μm de long et comportent trois parties principales : la tête, la pièce intermédiaire et le flagelle. La tête de forme ovoïde chez les taureaux, est essentiellement constituée du noyau à n chromosomes recouvert sur sa partie antérieure par l'acrosome. La pièce intermédiaire est composée essentiellement de cytoplasme et d'un filament axial entouré par une gaine mitochondriale en hélice. Cette gaine a pour but de fournir l'énergie nécessaire à la mobilité du spermatozoïde. Le flagelle, quant à lui, permet par ses mouvements, la mobilité des spermatozoïdes (Saint-Dizier et al., 2014 ; Hyttel et al., 2010).

c) La barrière hémato-testiculaire

Au cours de la spermatogenèse, une relation étroite existe entre les cellules germinales et les cellules de Sertoli. En effet, les cellules de Sertoli vont jouer un rôle de soutien, de nutrition et de régulation paracrine pour les spermatozoïdes. De plus, grâce à leurs jonctions serrées, elles forment la barrière hémato-testiculaire, isolant les spermatozoïdes de toute relation directe avec la circulation sanguine (França et al., 2013). Ceci implique la présence de transporteurs sur le tube séminifère afin de faire passer du sang vers l'intérieur de ceux-ci, les composés essentiels à la fabrication des spermatozoïdes, notamment les acides gras (Cheng et al., 2012). Ces transporteurs lipidiques ne sont actuellement pas très bien connus.

Il est à noter que dans ce mémoire, on parlera uniquement du profil en acides gras des spermatozoïdes. En revanche, celui du plasma séminal sera également déterminé afin

d'obtenir une information complémentaire. Dans ce cas-là, on ne parlera plus de lipide membranaire mais de lipide reflétant plus rapidement et plus fidèlement le régime alimentaire. En effet, les acides gras ne devant plus traverser cette barrière hémato-testiculaire, arrivent plus vite et probablement de manière moins sélective dans le liquide séminal.

2.2 La maturation épидидymaire et la capacitation des spermatozoïdes

A la sortie du testicule, les spermatozoïdes ne sont pas féconds. Ils vont subir des modifications grâce aux épithéliums et aux sécrétions des voies génitales mâles et femelles.

a) La maturation épидидymaire

La maturation épидидymaire se passe avant l'éjaculation à l'intérieur de l'épididyme dans lequel les spermatozoïdes cheminent pendant 10 à 15 jours (Bonnes et al., 2011). Cette étape permet aux spermatozoïdes d'acquérir leur capacité à se déplacer et à féconder l'ovocyte de la femelle. Leur mobilité (capacité à se mouvoir sur lui-même) et leur mobilité progressive (capacité à progresser de façon rectiligne) sont acquises respectivement dans le corps et la queue de l'épididyme (Gervasi et al., 2017).

Au cours de la maturation épидидymaire, on peut constater une diminution de la proportion des SFA au profit des UFA. Dans la majorité des cas, on peut observer une diminution de la proportion de l'acide palmitique (C16 : 0) au bénéfice d'une augmentation de certains PUFA, notamment l'acide arachidonique (AA), le DHA et le DPA n-6 (Rejraji et al., 2009).

Ce remodelage lipidique pourrait être dû à un échange direct avec des lipides provenant de vésicules lipidiques sécrétées par l'épithélium de l'épididyme (épидидymosomes). Jusqu'à présent, il n'y a pas eu d'étude mettant en évidence ces échanges entre les épидидymosomes et les spermatozoïdes. En revanche, cette hypothèse est appuyée par le fait que l'on observe durant le trajet dans l'épididyme, une évolution antiparallèle des compositions lipidiques membranaires des spermatozoïdes et des épидидymosomes (Rejraji et al., 2004 ; Rejraji et al., 2006 ; Saez et al., 2003).

b) La capacitation des spermatozoïdes

La capacitation des spermatozoïdes, indispensable à la fécondation, se passe après l'éjaculation, principalement dans l'oviducte de la femelle. Elle comprend toute une série de modifications membranaires portant essentiellement sur les lipides (Travert et al., 2009).

La perte du cholestérol membranaire (= stabilisateur membranaire) est une étape indispensable de la capacitation. Le cholestérol est un facteur anti-capacitant, permettant aux spermatozoïdes de survivre sans grands dommages lors de la remontée du tractus génital

femelle. Les sécrétions prostatiques sont la source la plus importante de cholestérol pour les spermatozoïdes (Park et al., 2011).

La perte progressive du cholestérol est réalisée à l'aide d'accepteurs de stérol (ex : l'albumine) provoquant une redistribution des lipides membranaires. La perte du cholestérol ou plutôt la diminution du rapport membranaire cholestérol/phospholipide, est un bon indicateur de la fluidité membranaire des spermatozoïdes (Coy et al, 2012). La redistribution membranaire entraînera l'hyperactivation des spermatozoïdes (mouvement désordonné et très rapide), signe de leur état de capacitation. De plus, elle permettra l'externalisation des récepteurs spermatiques jouant un rôle dans la liaison à la zone pellucide entourant l'ovocyte lors de la fécondation (Thibault, 2001).

2.3 La fécondation

Les spermatozoïdes, dans un état hyperactivé, rentrent en contact avec le complexe cumulo-ovocytaire (Saint-Dizier et al., 2014). Une fois arrivés à proximité de ce complexe, la fécondation peut commencer et se déroule en plusieurs étapes (Bromfield et al., 2013).

Les spermatozoïdes commencent par traverser le cumulus, matrice riche en acide hyaluronique, entourant la zone pellucide de l'ovocyte sur laquelle ils viennent se fixer (Kim et al., 2008 ; Witte et al., 2007). L'induction de la réaction acrosomique, déjà entamée lors de la traversée de la zone pellucide au contact avec l'acide hyaluronique (Sun et al., 2011), permet au spermatozoïde de traverser la zone pellucide (Bedford, 2008). Remarquons que seuls les spermatozoïdes capités au préalable, sont susceptibles de faire cette réaction acrosomique. Après avoir traversé la zone pellucide, le spermatozoïde atteint l'espace périvitellin pour ensuite adhérer et fusionner avec la membrane plasmique de l'ovocyte (Nixon et al., 2007). Afin d'éviter la polyspermie, un blocage de la membrane de l'ovocyte, lié à la dépolarisation de celle-ci lors de l'entrée du spermatozoïde, et un blocage au niveau de la zone pellucide empêchent la fixation d'autres spermatozoïdes (Avella et al., 2013). Chez le bovin, il faudra environ 3 heures entre le moment où le spermatozoïde s'est attaché à la zone pellucide et le début de la fusion avec l'ovocyte (Thibault, 2001).

2.4 La congélation/décongélation de la semence pour l'insémination artificielle

De nombreuses études ont pu démontrer que les processus de congélation/décongélation de la semence dans de l'azote liquide entraînaient des dommages sur les spermatozoïdes, notamment au niveau de leur structure, de leur fonction et de leur physiologie. En effet, ces études ont pu constater des changements négatifs dans la composition lipidique membranaire, dans l'acrosome et dans la mobilité des spermatozoïdes (Peris et al., 2007). Bien que les causes des dommages aux spermatozoïdes ne soient pas clairement établies, certaines hypothèses ont d'ores et déjà été mentionnées dans la

littérature. Certaines études mettent en avant la cause d'une formation intracellulaire de cristaux de glace, d'un stress osmotique (Guthrie et al., 2002), d'un stress chimique, d'un choc thermique lors de la congélation, d'une production excessive de dérivés réactifs de l'oxygène et d'une altération des antioxydants (Watson, 2000 ; Holt, 2011).

Afin de réduire au maximum les dommages causés sur les spermatozoïdes et de garder leur mobilité après la décongélation, la semence est diluée et équilibrée. Des cryoprotecteurs (toxiques à partir d'une certaine concentration) sont ainsi ajoutés en quantité optimale dans les paillettes (Medeiros et al., 2002).

Pour une décongélation optimale afin d'entraîner le moins possible de dommages sur les spermatozoïdes, il a été démontré qu'il faudrait réchauffer les paillettes rapidement en les plongeant dans de l'eau à 38°C pendant 30 s (Kolev, 2000). Ceci avant de placer la paillette dans un pistolet pour réaliser l'insémination artificielle.

L'insémination artificielle possède de nombreux avantages, notamment en termes de production, de sélection, de traçabilité et de qualité sanitaire. Le moment de l'insémination est très important pour avoir un taux de non-retour (pourcentage de femelles ne revenant pas en chaleur après la première insémination artificielle) le plus élevé possible (Bonnes et al., 2011). Le moment le plus favorable se situe dans la deuxième moitié des chaleurs, c'est à dire une demi-journée après l'apparition des chaleurs (Dudouet, 2014).

2.5 Les spécificité des mâles BBB par rapport aux Holstein

Depuis plusieurs années, la sélection des taureaux BBB est basée sur une musculature très élevée, avec une réduction de la taille des organes (Ansey et al., 1979). Cette sélection, basée sur la production de viande et non sur la fertilité des taureaux, a entraîné une diminution de la qualité *in vitro* de la semence de taureaux BBB (Hoflack et al., 2007). Cette qualité est inférieure à celle retrouvée chez d'autres races bovines, notamment celle de la race Holstein considérée comme le « golden standard » de référence dans ce projet (Hoflack et al., 2006a).

a) La qualité de la semence BBB

Les critères les plus couramment utilisés pour évaluer la qualité de la semence de taureau sont la mobilité, la mobilité progressive, la morphologie, la vitesse et la concentration en spermatozoïdes dans l'éjaculat (Hoflack et al., 2006a). Des études ont démontré une qualité de semence inférieure pour les taureaux BBB comparés aux Holstein.

Une étude a montré que les taureaux BBB possèdent une mobilité totale (± 60 %) et une mobilité progressive (± 56 %) des spermatozoïdes dans la semence fraîche, inférieures à celles des taureaux Holstein d'environ 20 % (Hoflack et al., 2007). Les spermatozoïdes BBB se déplacent également plus lentement que leurs homologues Holstein (Hoflack et al., 2006a).

La raison de ces différences se situe au niveau de la morphométrie de la tête des spermatozoïdes. En effet, la tête des spermatozoïdes BBB est plus courte et plus large, impactant l'hydrodynamisme et par conséquent, la vitesse des spermatozoïdes BBB. De plus, on constate un pourcentage de spermatozoïdes anormaux, d'un point de vue morphologique, plus important dans les éjaculats de taureaux BBB (47 %) comparé à ceux des Holstein (20 %) (Hoflack et al., 2007), impactant également la vitesse des spermatozoïdes BBB (Amann et al., 2000).

Afin de pallier cette diminution de la qualité du sperme de BBB, les paillettes d'insémination BBB sont plus concentrées en spermatozoïdes (25 millions de spermatozoïdes par dose d'insémination) comparées à celles des Holstein (15 millions de spermatozoïdes par dose d'insémination), ceci afin d'avoir des taux de survie et de qualité suffisants pour avoir un bon taux de gestation (Hoflack et al., 2006b).

b) La circonférence scrotale

Certaines études ont démontré que la circonférence scrotale testiculaire est un paramètre influençant indirectement la qualité de la semence de taureau (Hueston et al., 1988 ; Hanset, 2000). Une autre étude a démontré que quasiment la moitié (44 %) des taureaux BBB sur les 156 testés possédaient une circonférence scrotale inférieure au seuil acceptable déterminé par la société « Society for Theriogenology », contre seulement 18 % pour les taureaux Holstein. Cette différence notable serait due au fait que la race BBB est plus sujette à une dégénération de l'épithélium des tubes séminifères des testicules (Hoflack et al., 2006a).

Une étude complémentaire à celle réalisée en 2006 a pu montrer que la faible qualité du sperme de taureaux BBB comparée à celle des Holstein était causée par la dégénérescence testiculaire, cette dégénérescence testiculaire des taureaux BBB pouvant elle-même être causée par la grande sensibilité de ces taureaux aux stress environnementaux (ex : une température excédant 30°C, une soudaine augmentation/diminution des concentrés alimentaires, un changement de ferme). Sur les coupes de testicules de taureaux BBB (Fig.5) et Holstein (Fig.6), on remarque une plus grande dégénérescence de l'épithélium des tubes séminifères chez les BBB. De plus, malgré la présence d'une plus forte densité de tubes séminifères chez les taureaux BBB, on observe une diminution de leur diamètre par rapport aux Holstein. On retrouve également une plus grande quantité de tissu conjonctif (en bleu) dans le tissu interstitiel des testicules de BBB, empêchant un bon apport en nutriments du sang vers l'intérieur des tubes séminifères. Par conséquent, il a été démontré pour les taureaux BBB que cette dégénérescence testiculaire diminue la concentration et la mobilité des spermatozoïdes, tout en augmentant la proportion de spermatozoïdes morphologiquement anormaux (Hoflack et al., 2008).

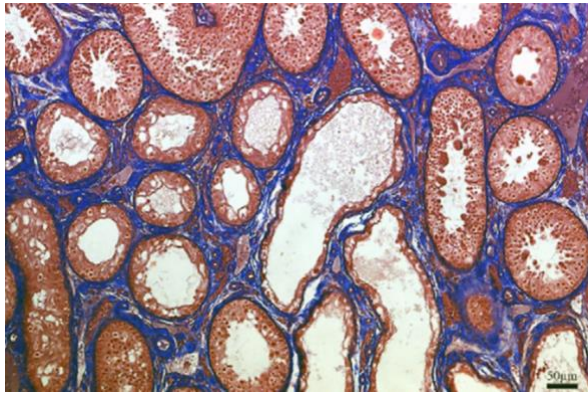


Figure 5 Coupe dans un testicule de taureau BBB (Hoflack et al, 2008)

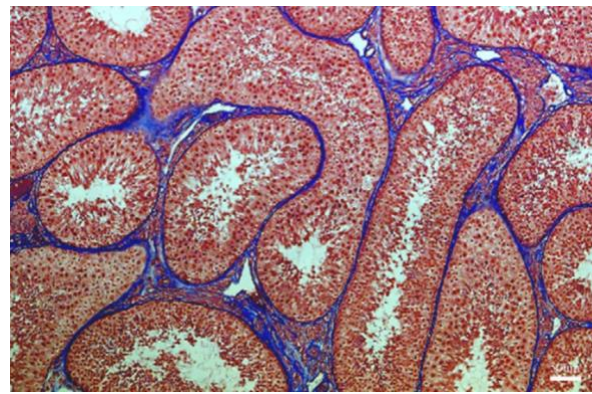


Figure 6 Coupe dans un testicule de taureau Holstein (Hoflack et al, 2008)

Le taux de consanguinité élevé pour la race BBB, en moyenne égal à 4,65 %, explique une partie de la dégénérescence testiculaire (Hanset et al, 2003 ; Hanset, 2006). Il a en effet été démontré que la consanguinité accrue des taureaux est corrélée avec une proportion plus importante de tubes séminifères anormaux (Carroll et al., 1970).

3. Les acides gras dans les spermatozoïdes

3.1 La composition membranaire en acides gras des spermatozoïdes

On trouve généralement très peu d'acides gras libres dans les membranes des spermatozoïdes. En revanche, on retrouve plutôt des phospholipides, molécules amphiphiles regroupant deux acides gras estérifiés liés aux deux groupements alcool d'une molécule de glycérol, le troisième groupement alcool étant lié à un groupe phosphate. Dans le Tableau 1 se trouvent les acides gras les plus souvent rencontrés dans les membranes des spermatozoïdes de mammifères.

Tableau 1 Noms et formules chimiques des acides gras les plus souvent rencontrés dans les membranes des spermatozoïdes (Murray et al., 1999)

Noms chimiques	Formules	Noms usuels
<u>Acides gras saturés</u>		
Tétradécanoïque	14 : 0	Myristique
Hexadécanoïque	16 : 0	Palmitique
Octodécanoïque	18 : 0	Stéarique
Eicosanoïque	20 : 0	Arachidique
Docosanoïque	22 : 0	Béhénique
Tétracosanoïque	24 : 0	Lignocérique
<u>Acides gras insaturés</u>		
Octadécénoïque	18 : 1n-9 (cis)	Oléique
Octadécadiénoïque	18 : 2n-6 (cis)	Linoléique
Octadécatriénoïque	18 : 3n-3	Alpha-linolénique
Octadécatriénoïque	18 : 3n-6	Gamma-linolénique
Eicosatetraénoïque	20 : 4n-6	Arachidonique
Eicosapentaénoïque	20 : 5n-3	Timnodonique ou EPA
Docosapentaénoïque	22 : 5n-3	Clupanodonique ou DPA
Docosahexaénoïque	22 : 6n-3	Cervonique ou DHA

EPA = acide eicosapentaénoïque, DPA = acide docosapentaénoïque, DHA = acide docosahexaénoïque

Les SFA dans la membrane du spermatozoïde sont majoritairement représentés par l'acide palmitique (C16:0) et l'acide stéarique (C18:0), quel que soit l'espèce étudiée et le stade de maturation des spermatozoïdes. On peut également trouver une grande proportion de PUFA dépassant souvent les proportions de C16:0 et de C18:0. Parmi ces PUFA à longue chaîne de carbone, on retrouve le plus fréquemment l'AA, le DPA et le DHA (Rejraji et al., 2009).

On remarque à travers différentes études réalisées il y a quelques années que la composition en PUFA des membranes des spermatozoïdes varie fortement d'une espèce à l'autre. En effet, contrairement aux membranes des spermatozoïdes de bouc contenant peu de DHA et de DPA (essentiellement constitués d'acide oléique, de LA et de AA) (Esmaelie et al., 2014 ; Fair et al., 2014 ; Rana et al., 1991), le DHA et le DPA représentent parfois plus de la moitié des acides gras membranaires des spermatozoïdes chez le verrat et le hamster (Awano et al., 1993 ; Castellano et al., 2010 ; Nikolopoulou et al., 1985). Quant aux membranes plasmiques des spermatozoïdes de rat, elles contiennent une grande proportion de DPA mais pas de DHA. De plus, on observe quelques particularités chez le rat. Les membranes des spermatozoïdes de rat sont très riches en acides oléique, LA et ALA. On y retrouve également des PUFA n-9 à longue chaîne tels que le 22:4 n-9, le 22:3 n-9, le 20:3 n-9 et le 24:4 n-9. Ces derniers seraient dérivés d'un MUFA n-9 : l'oléate (18 : 1n-9) (Hall et al., 1991 ; Avelaño et al., 1992). À l'inverse, on retrouve une grande quantité de DHA mais pas de DPA dans la membrane des spermatozoïdes de l'homme et du bélier (Alvarez et al., 1995 ; Ollero et al., 2000 ; Parks et al., 1985).

Chez les taureaux, on remarque une variabilité inter- et intra-race dans la composition en acides gras des spermatozoïdes, avec une variabilité inter-race plus prononcée (Wathes et al., 2007). On retrouve en moyenne dans un spermatozoïde de taureau : 40 % de SFA (presque exclusivement représentés par le C14:0, le C16:0 et le C18:0), 5 % de MUFA et 55 % de PUFA (exprimé en pourcentage des acides gras totaux identifiés). Au sein des PUFA, on retrouve majoritairement le DPA n-6 et le DHA. Ce dernier est l'acide gras le plus représenté dans les membranes des spermatozoïdes (35 % du total des acides gras) (Argov et al., 2013 ; Gürlér et al., 2015). On peut remarquer une différence dans la proportion d'AA et de DHA chez les taureaux BBB et les Holstein. En effet, on retrouve plus d'AA (3 % de différence) mais moins de DHA (10 % de différence) dans la semence de taureau BBB comparée à celle des Holstein (Kelso et al., 1997).

En 2007, une étude a pu observer une variation saisonnière de la composition en acides gras de la semence chez les taureaux Holstein. Ceci pourrait expliquer les différences de qualité de la semence en termes de mobilité entre l'hiver (50 %) et l'été (43 %). D'autres études ont pu montrer que la proportion de certains acides gras (C18:0, ALA, AA, EPA et DPA n-3) était constante tout au long de l'année tandis que la proportion de certains autres pouvait changer en fonction des saisons. En effet, on retrouve plus de PUFA en automne et en hiver

qu'au printemps et en été dans les spermatozoïdes. En revanche, c'est l'inverse pour les SFA. Cette grande proportion de PUFA en automne et en hiver est liée à une plus grande proportion de DHA à cette période de l'année probablement liée à la mise en pâture des taureaux depuis le printemps (Argov et al., 2007).

3.2 Le lien entre la résistance à la congélation des spermatozoïdes et leurs acides gras membranaires

a) La fluidité membranaire

La fluidité des membranes des spermatozoïdes dépend de la composition en lipides membranaires de ces cellules. Un bon indicateur de la fluidité membranaire des spermatozoïdes est le rapport SFA/PUFA. Plus ce rapport sera élevé, plus la fluidité sera faible. En effet, la longueur de la chaîne carbonée et le degré d'insaturation des acides gras agissent sur la température de transition des phospholipides et sur la fluidité des membranes (Wathes et al., 2007). Plus les chaînes carbonées des acides gras seront longues et le nombre d'insaturations (cis) des acides gras sera faible, plus la température de transition des phospholipides sera élevée. Par conséquent, une grande proportion de SFA à longue chaîne est un élément rigidifiant les membranes et diminuant leur fluidité (Shechter, 2000, Murphy et al., 2016).

A la suite du processus de congélation et de décongélation de la semence, le profil en acides gras des spermatozoïdes est modifié et on observe une augmentation du rapport SFA/PUFA. Ceci fait suite à une diminution des PUFA membranaires et particulièrement du DHA. Une étude a indiqué une diminution de 15 % du DHA sur le total des acides gras entre les semences fraîche et décongelée (Khoshvaght et al., 2016). Ces modifications du profil en acides gras peuvent conduire à une diminution de la survie et de la capacité de fécondation des spermatozoïdes (Martinez-Soto et al., 2013). Il a été montré que la cause de cette diminution en DHA serait l'augmentation des réactifs dérivés de l'oxygène (ROS) durant la cryopréservation de la semence (Blesbois et al., 1997).

Le DHA qui est l'acide gras le plus représenté dans les membranes des spermatozoïdes de taureaux, joue un rôle majeur sur la qualité in vitro de la semence et particulièrement sur la fluidité des membranes (Parks et al, 1992). Il agit également sur l'intégrité des membranes, la mobilité et la morphologie des spermatozoïdes (Gürler et al., 2015 ; Khoshvaght et al., 2016).

Sachant que la cryopréservation est à l'origine de la diminution de la teneur en PUFA dans les membranes des spermatozoïdes chez les taureaux, des études ont tenté d'augmenter la teneur en PUFA membranaires et particulièrement en DHA. La seule manière mise en évidence dans la littérature consiste à donner aux taureaux un régime alimentaire enrichi en PUFA n-3. Quelques études ont examiné les effets d'un tel régime sur la qualité du sperme de taureau (Gholami et al., 2010 ; Gürler et al., 2015 ; Khoshvaght et al., 2016 ; Moallem et al.

2015). Ces études ont fait remarquer qu'une augmentation des PUFA n-3 dans l'alimentation modifiait la composition en acides gras membranaires des spermatozoïdes, améliorait la qualité de la semence et pouvait conférer aux membranes une meilleure résistance aux dommages liés au processus de congélation (Sellem et al., 2015 ; Gholami et al., 2011).

Une étude réalisée en 2006 a indiqué qu'on pouvait améliorer les paramètres de qualité in vitro de la semence fraîche de Holstein en nourrissant les taureaux avec un régime enrichi en huile de poisson (0,5 % de la matière sèche du régime total) et par conséquent, en DHA. En revanche, cette étude n'a pas observé d'amélioration de la qualité in vitro de la semence ayant subi la congélation (Gholami et al., 2010). Il semblerait que la quantité de PUFA n-3 apportée par ce régime ne soit pas suffisante pour augmenter significativement la teneur en DHA membranaires afin de pallier sa perte lors de la cryopréservation. Cette quantité modifiant trop faiblement le profil en acides gras, elle ne permet probablement pas au DHA de protéger les spermatozoïdes pendant la congélation et la décongélation. Ceci pourrait expliquer pourquoi les paramètres de la qualité in vitro de la semence décongelée n'ont pas été augmentés (Khoshvaght et al., 2016).

Une étude réalisée en 2016 sur les taureaux Holstein a pu montrer qu'une alimentation enrichie en huile de poisson (1,2 % de la matière sèche du régime total) améliore à la fois la qualité de la semence fraîche mais également celle de la semence décongelée. Après 9 semaines de régime enrichi en PUFA n-3, la mobilité progressive, la viabilité et l'anormalité des spermatozoïdes ont été évaluées. Ces paramètres ont respectivement été modifiés de +5 %, +3 % et -5 % pour la semence fraîche et de +4 %, +7 % -3 % pour la semence décongelée. Cette amélioration qualitative était corrélée avec une proportion plus élevée de DHA membranaire (+10 %) par rapport aux taureaux ayant suivi le régime contrôle. En effet, une alimentation enrichie en huile de poisson augmente la proportion de DHA dans les membranes des spermatozoïdes. Après décongélation, la proportion de DHA reste plus élevée chez les taureaux nourris avec un supplément d'huile de poisson, comparée à cette proportion chez les taureaux nourris avec le régime contrôle (Khoshvaght et al., 2016).

Une étude de 2015 réalisée sur des taureaux Holstein a comparé les effets de deux régimes différents enrichis en PUFA n-3 sur le profil en acides gras des membranes des spermatozoïdes et sur la qualité de la semence avant et après congélation. La différence entre ces deux régimes se situait au niveau de leur source en PUFA n-3. L'une étant l'huile de graines de lin, enrichie en ALA (régime 1), et l'autre étant l'huile de poisson, enrichie en EPA et DHA (régime 2). Au niveau du profil en acides gras, une légère diminution de 3 % en DHA et une légère augmentation de 3 % en DPA n-6 ont été observées chez les taureaux ayant suivi le régime 1 par rapport à ceux ayant suivi le régime 2. Une légère amélioration de la qualité de la semence avant et après décongélation est notée pour les taureaux ayant suivi le régime 1 plutôt que le régime 2. En effet, la mobilité et la mobilité progressive des spermatozoïdes ont augmenté tous les deux de 5 % avant congélation et respectivement de 6% et 4% après

décongélation. Cette étude préconise donc de choisir un régime enrichi en PUFA n-3 provenant d'huile de lin pour modifier la composition en lipides membranaires des spermatozoïdes, dans un sens qui permette d'obtenir une meilleure qualité de semence après la cryopréservation (Moallem et al., 2015).

b) Le stress oxydatif des spermatozoïdes

Lors du processus de cryopréservation de la semence, les spermatozoïdes subissent un stress oxydatif particulièrement important causé par l'augmentation de la production des ROS et la diminution de la quantité d'antioxydants (Bilodeau et al., 2000). La grosse proportion de PUFA dans les membranes des spermatozoïdes les rend plus sensibles aux ROS, et par conséquent, à la peroxydation lipidique (Bansal et al., 2008). La peroxydation lipidique est une réaction en chaîne formant des peroxydes lipidiques et aboutissant à la formation d'aldéhydes cytotoxiques (Aitken, 1995). Des analyses de la semence ont montré que la production de ROS et l'apparition de peroxydes lipidiques augmentaient avec la congélation/décongélation de la semence. Ceci se passe dans les membranes des spermatozoïdes (Agarwal et al., 2005) mais également dans les mitochondries (Brouwers et al., 2003).

Des études ont pu montrer que les ROS jouent un rôle important dans la fertilité des spermatozoïdes. La production de ROS est un processus cellulaire normal mais qui peut être délétère lorsqu'il est trop intense. En effet, les ROS peuvent endommager l'ADN des spermatozoïdes, entraînant des conséquences sur le développement de l'embryon après la fécondation (Lewis et al., 2005). Ces ROS peuvent également affecter la mobilité et bloquer le métabolisme oxydatif du spermatozoïde. De plus, ils peuvent entraîner une altération de la fluidité membranaire, une perte de l'intégrité de la membrane, une perturbation de la perméabilité membranaire à certains ions et une modification de l'interaction « lipide-protéine » (Bailey et al., 2000 ; Baumber et al., 2000).

La présence d'une grande proportion de PUFA dans les membranes des spermatozoïdes de taureaux BBB nécessite des antioxydants efficaces pour se défendre contre les dommages liés aux ROS. Les antioxydants protégeant les spermatozoïdes proviennent du plasma séminal et, en plus faible quantité, du cytoplasme des cellules. Étant donné leur faible quantité, les enzymes antioxydantes ne peuvent pas empêcher les effets néfastes des ROS et de la peroxydation lipidique (Gürler et al., 2015). En revanche, il a été démontré que l'ajout d'antioxydants tels que la taurine et la cystéine lors de la dilution du sperme de taureau, augmente la protection des spermatozoïdes contre les effets délétères des ROS et permet d'améliorer leur mobilité et leur fertilité après la décongélation de la semence (Argarwal et al., 2005 ; Bilodeau et al., 2001 ; Sariözkan et al., 2009).

Objectif

Ce mémoire de fin d'études s'intègre dans le cadre du projet « Fertiwalim » dont l'objectif général est d'améliorer la résistance à la congélation de la semence BBB en jouant sur l'alimentation des taureaux. Ceci permettrait d'augmenter la production de doses d'insémination pour cette race de taureaux, en réduisant le nombre de spermatozoïdes par dose permettant ainsi de réaliser plus de paillettes par éjaculat. Cela permettrait de répondre à la demande grandissante du marché belge mais surtout international.

L'objectif de ce mémoire est tout d'abord de caractériser la composition en acides gras des spermatozoïdes de taureaux BBB ayant reçu des régimes alimentaires différents au cours d'un essai alimentaire pilote (pré-test alimentaire). Dans cet essai alimentaire, chaque taureau reçoit successivement trois des cinq régimes différents étudiés dans le projet Fertiwalim, à savoir des régimes enrichis soit en omega3, soit en antioxydants, soit en oligoéléments, soit dans l'ensemble de ces trois types de composés (all-in), sur une période allant d'avril 2017 à janvier 2018. Au terme de cette expérience, nous souhaitons corrélérer la composition en acides gras des spermatozoïdes avec les paramètres de qualité des spermatozoïdes après décongélation (mobilité et mobilité progressive).

Matériel et méthodes

Le matériel biologique utilisé consistait en spermatozoïdes de taureaux de race BBB et Holstein. Le lot de taureaux utilisé contenait 29 BBB et 8 Holstein. Les éjaculats complets ont tous été récoltés à l'AWÉ puis centrifugés à l'UCL afin de séparer les spermatozoïdes du plasma séminal.

Seuls les profils en acides gras des spermatozoïdes seront déterminés dans ce mémoire, tandis que ceux du liquide séminal seront effectués et analysés ultérieurement. En revanche, les protocoles expérimentaux permettant de déterminer le profil en acides gras des spermatozoïdes et du plasma séminal ont été mis au point et sont expliqués ci-dessous.

1. Détermination du profil en acides gras

1.1 Centrifugation

Toutes les manipulations consistant à séparer le plasma séminal des spermatozoïdes, ont été réalisées à 4°C. Par conséquent, les milieux de rinçage ont dû être refroidis à l'avance et nous avons dû travailler dans de la glace pilée.

Pour chaque prélèvement, 1 ml de l'éjaculat complet a été transféré (après homogénéisation douce) dans un tube (le restant de l'éjaculat a été conservé pour d'autres analyses). Ces tubes ont ensuite été centrifugés pendant 10 min à 800 g à une température de 4°C. Après cette première centrifugation, le surnageant (= plasma séminal) a été retiré pour ne garder que le culot de spermatozoïdes (le plasma séminal a été conservé pour d'autres analyses). Dans chaque tube, 800 µl de NaCl 0.9 % ont été ajoutés. Ensuite, ces tubes ont été homogénéisés à la main par 10 mouvements de « up&down » avant d'être centrifugés 10 min à 800 g à une température de 4°C. Après cette centrifugation, le surnageant a été retiré. Cette manipulation a été réalisée 2 fois au total. Tous les tubes contenant les culots de spermatozoïdes ont ensuite été conservés à -80°C jusqu'aux analyses.

1.2 Extraction lipidique

Les lipides ont été extraits des spermatozoïdes et du plasma séminal en suivant la méthode de Bligh & Dyer (1959) décrite ci-dessous. Le protocole d'extraction étant légèrement différent si on travaille avec des culots de spermatozoïdes ou avec du plasma séminal.

Pour réaliser l'extraction des lipides des spermatozoïdes, 150 mg de spermatozoïdes ont été solubilisés dans 800 µl d'eau milli-Q. Après ajout de billes de silice, les échantillons ont été placés dans un MagNA lyser (Roche Diagnostics, Mannheim, Allemagne) et homogénéisés

2 fois 30 s à une vitesse de 6000 rpm. Les tubes ont été refroidis entre les 2 homogénéisations. Les échantillons se trouvant dans les tubes pour MagNA lyser ont été transférés dans des tubes en verre Pyrex, puis rincés deux fois avec 1 ml de méthanol (AnalaR Normapur VWR, Fontenay-sous-Bois, France) afin de récupérer le maximum de spermatozoïdes pouvant rester sur les parois. Ces tubes en verre ont été homogénéisés au Vortex pendant 10 s et 1 ml de standard interne a été ajouté. Ce dernier était composé d'une solution d'acide nonadécanoïque (Sigma-Aldrich, Steinheim, Allemagne) dans le chloroforme (AnalaR Normapur VWR, Fontenay-sous-Bois, France) à une concentration de 40,3 mg / l. Après homogénéisation au Vortex pendant 2 minutes, 1 ml de chloroforme (AnalaR Normapur VWR, Fontenay-sous-Bois, France) et 1 ml d'eau milli-Q ont été ajoutés aux échantillons, suivis de 30 s d'homogénéisation au Vortex après chaque étape. Après addition de 3 gouttes d'éthanol (AnalaR Normapur VWR, Fontenay-sous-Bois, France), les émulsions ont été éliminées par une centrifugation de 10 min à 1690 g et à une température de 19°C. La phase aqueuse a été éliminée et 1,7 ml de la phase chloroformique contenant la matière grasse a été transférée dans un nouveau tube en verre Pyrex. A cette étape, les échantillons ont pu être conservés une nuit à -20°C à l'abri de la lumière.

Pour réaliser l'extraction des lipides du plasma séminal, on démarre avec 800 µl de plasma séminal auxquels on ne rajoute pas d'eau milli-Q. Le MagNa lyser n'a pas été utilisé pour le plasma séminal. La suite du protocole est le même que pour celui de l'extraction des lipides des spermatozoïdes hormis que les tubes ont été centrifugés 3 fois pendant 10 min à 1690 g et à 19°C après avoir ajouté les 3 gouttes d'éthanol (AnalaR Normapur VWR, Fontenay-sous-Bois, France). Après les 2 premières centrifugations, 240µl d'éthanol (AnalaR Normapur VWR, Fontenay-sous-Bois, France) ont été ajoutés dans chaque échantillon. Après chaque ajout de 240µl d'éthanol, les échantillons ont été placés pendant 5 min au bain à ultrasons.

1.3 Méthylation

Afin de déterminer le profil en acides gras par chromatographie en phase gazeuse, les acides gras contenus dans la matière grasse ont dû être transformés en esters méthyliques (FAME). Pour se faire, les échantillons ont été soumis à la méthylation catalysée par une base (KOH) puis par un acide (HCl).

La méthylation des acides gras provenant des spermatozoïdes commence par une évaporation du chloroforme sous flux d'azote, à une température de 30°C. Ensuite, une méthylation basique a été réalisée par l'addition de 1 ml de KOH 0,1 M (Sigma-Aldrich, Seelze, Allemagne) dans du méthanol (AnalaR Normapur VWR, Fontenay-sous-Bois, France), suivi d'une incubation à 70°C pendant 1 h. Les échantillons ont été homogénéisés au Vortex pendant 30 s après 5, 25 et 45 min d'incubation. Cette première étape a été suivie d'une méthylation acide par addition de 0,4 ml de HCl 1,2N (Sigma-Aldrich, Steinheim, Allemagne) dans du méthanol (AnalaR Normapur VWR, Fontenay-sous-Bois, France). Les tubes ont été

homogénéisés au Vortex pendant 30 s avant d'être incubés à 70°C pendant 15 min. Après addition de 2 ml de n-hexane (AnalaR Normapur VWR, Fontenay-sous-Bois, France) et d'1 ml d'eau milli-Q, les échantillons ont été homogénéisés au Vortex pendant 30 s. Une centrifugation à 1170 g pendant 5 min à température ambiante a permis la séparation des phases aqueuse et hexanique. 720 µl de la phase hexanique supérieure ont été transférés dans des vials (VWR international, Leuven, Belgique). Dans chaque vial, 80 µl de standard d'injection ont été ajoutés. Ce dernier était composé d'une solution d'acide undécanoïque (Sigma-Aldrich, Steinheim, Allemagne) dans le n-hexane (AnalaR Normapur VWR, Fontenay-sous-Bois, France) à une concentration de 496 mg / l. Ces vials ont été injectés dans un chromatographe en phase gazeuse.

La méthylation des acides gras provenant du plasma séminal a été réalisée de la même manière que vue précédemment pour les spermatozoïdes. En revanche, les volumes des réactifs ajoutés ont tous été diminués de moitié. En effet, 0,5 ml de KOH/méthanol, 0,2 ml d'HCl/méthanol, 1 ml de n-hexane et 0,5 ml d'eau milli-Q ont été rajoutés.

1.4 Identification et quantification des esters méthyliques d'acides gras par chromatographie en phase gazeuse

La séparation des différents FAME a été réalisée par une chromatographie en phase gazeuse. Le chromatographe utilisé, ThermoQuest Trace 2000 (Milan, Italie), est équipé d'une colonne capillaire RT 2560 (100m x 0,25mm, 0,2 µm, Restek, USA), d'un injecteur oncolumn et d'un détecteur à ionisation de flamme (FID). Ce FID est maintenu à une température constante de 255°C. La pression de l'hydrogène (= gaz vecteur) (Air liquide, Liège, Belgique) était de 200 kPa. Le programme de température est détaillé dans le Tableau 2.

Tableau 2 Programme de température du chromatographe en phase gazeuse pour la séparation des méthylesters d'acides gras

Pente de température (°C / min)	Palier de température (°C)	Temps au palier (min)
/	80	/
25	175	25
10	205	10
5	210	3
5	215	5
10	230	25
20	80	/

Un standard de calibration contenant 43 FAME a été injecté afin de permettre l'identification et la quantification des FAME présents dans les échantillons. Chaque chromatogramme correspondant à chaque échantillon a été analysé avec le logiciel Chromquest, en comparant les temps de rétention au standard de calibration. De plus, l'intégration de chaque pic a été vérifiée et réajustée si nécessaire.

Les acides gras représentés par des pics correspondant à un rapport signal sur bruit inférieur à 3, ont été considérés comme non détectables. Si ce rapport était compris entre 3 et 10, les acides gras étaient considérés comme détectables mais non quantifiables.

2. Design expérimental

2.1 Conditions expérimentales

Un test alimentaire avec 5 rations (Tableau 3) a été mis en place dans une taillerie de l'AWÉ depuis le 13 avril 2017 et s'est terminé en janvier 2018. Pour le projet Fertiwalim, il s'agit en fait d'un pré-test, pour lequel tous les taureaux ne reçoivent pas tous les régimes (test exploratoire). Les rations ont été données durant 2 périodes (d'avril 2017 à septembre 2017 et d'octobre 2017 à janvier 2018) séparées par une transition de 1 mois (période de « wash-out ») (Tableau 4). Ce mois placé après la première période de l'essai alimentaire avait pour vocation d'alimenter les taureaux avec un régime contrôle afin de ne pas fausser les résultats liés au deuxième régime. Cela a également permis de déterminer la meilleure option à tester lors de la deuxième phase. Seulement 3 rations ont pu être testées sur les taureaux Holstein en raison du nombre limité d'individus de cette race à l'AWÉ. L'ensemble des taureaux étaient présents sur le site de collecte et mis dans des conditions d'alimentation similaires (régime contrôle) 2 mois avant le début de l'essai (février 2017).

Tableau 3 Les différentes rations utilisées lors du test alimentaire sur les taureaux

Ration	Spécificité
A	Omega3
B	Antioxydants
C	Oligoéléments
D	All-in (omega3-antioxydants-oligoéléments)
Ctrl	Contrôle

Tableau 4 Taureaux participants au test alimentaire avec leurs rations reçues durant celui-ci

BBB = Blanc bleu belge

		Avant avril	Avril à septembre	Septembre	Octobre à janvier
	race	ration	ration	ration	ration
1	BBB	Ctrl	A	Ctrl	B
2	BBB	Ctrl	A	Ctrl	B
3	BBB	Ctrl	A	Ctrl	B
4	BBB	Ctrl	A	Ctrl	B
5	BBB	Ctrl	A	Ctrl	B
6	BBB	Ctrl	A	Ctrl	B
7	BBB	Ctrl	B	Ctrl	A
8	BBB	Ctrl	B	Ctrl	A
9	BBB	Ctrl	B	Ctrl	A
10	BBB	Ctrl	B	Ctrl	A
11	BBB	Ctrl	B	Ctrl	A
12	BBB	Ctrl	B	Ctrl	A
13	BBB	Ctrl	C	Ctrl	Ctrl
14	BBB	Ctrl	C	Ctrl	Ctrl
15	BBB	Ctrl	C	Ctrl	Ctrl
16	BBB	Ctrl	C	Ctrl	Ctrl
17	BBB	Ctrl	C	Ctrl	Ctrl
18	BBB	Ctrl	C	Ctrl	Ctrl
19	BBB	Ctrl	Ctrl	Ctrl	D
20	BBB	Ctrl	Ctrl	Ctrl	D
22	BBB	Ctrl	Ctrl	Ctrl	D
23	BBB	Ctrl	Ctrl	Ctrl	D
24	BBB	Ctrl	Ctrl	Ctrl	D
26	BBB	Ctrl	Ctrl	Ctrl	D
27	BBB	Ctrl	D	Ctrl	C
28	BBB	Ctrl	D	Ctrl	C
29	BBB	Ctrl	D	Ctrl	C
30	BBB	Ctrl	D	Ctrl	C
31	BBB	Ctrl	D	Ctrl	C
35	Holstein	Ctrl	A	Ctrl	Ctrl
36	Holstein	Ctrl	Ctrl	Ctrl	D
37	Holstein	Ctrl	Ctrl	Ctrl	D
38	Holstein	Ctrl	Ctrl	Ctrl	D
39	Holstein	Ctrl	Ctrl	Ctrl	D
40	Holstein	Ctrl	D	Ctrl	A
41	Holstein	Ctrl	D	Ctrl	A
42	Holstein	Ctrl	D	Ctrl	A

2.2 Échantillonnage

La récolte des éjaculats a été effectuée par des bouviers travaillant à l'AWÉ. La méthode consiste à placer un vagin artificiel, maintenu à une température équivalente à celle d'un vagin de vache, sur la verge du taureau en érection et ce, juste avant l'éjaculation. La

semence étant recueillie dans un petit tube au bout du vagin artificiel. Cette méthode utilisée a pour but de se rapprocher le plus possible des conditions naturelles.

Durant le test alimentaire, les éjaculats ont été récoltés à 5 moments différents :

- P1 = Avril 2017
- P2 = Juin 2017
- P3 = Septembre 2017
- P4 = Novembre 2017
- P5 = Janvier 2018

La qualité de la semence (qualité in vitro, statut oxydatif et acides gras) a été évaluée lors de ces prélèvements pour chaque aliment testé au niveau des partenaires du projet Fertiwalim (AWÉ et UCL). Les analyses d'acides gras ont uniquement été réalisées sur les prélèvements d'avril 2017 (P1), de septembre 2017 (P3) et de janvier 2018 (P5). Ces prélèvements correspondent respectivement au régime contrôle, au 1er régime spécifique et au 2ème régime spécifique. Pour chaque récolte d'éjaculats, tous les échantillons ont été placés à une température de 4°C et ramenés à l'UCL afin de séparer le plasma séminal des spermatozoïdes.

2.3 Régimes

Chaque taureau a été nourri individuellement au seau, une fois par jour en début d'après-midi (vers 13-14h) tous les jours de la semaine. Les BBB ont reçu entre 10 et 12 kg de concentrés (quantité reçue en fonction de leur poids vif). Ils ont également eu accès à du foin et à de l'herbe quand le temps le permettait. La pâture correspondait à ± 5 ares par taureau et était disponible de mars à octobre. Les Holstein ont reçu 3,5 kg de concentré et ont eu un complément de foin. La formulation a été adaptée à leur prise alimentaire au moment du P3 ; avant cela, ils avaient les mêmes rations que les BBB. En revanche, les Holstein n'ont pas eu accès à la pâture.

Chaque taureau a été nourri avec 3 concentrés différents parmi les 5 concentrés testés dans ce test alimentaire exploratoire et développés sous forme de mix par l'entreprise Dumoulin. Hormis le régime contrôle, trois régimes ont été enrichis respectivement en omega3, en antioxydants et en oligoéléments, un cinquième régime a été enrichi à la fois en omega3, en antioxydants et en oligoéléments. La composition des 5 concentrés utilisés est indiquée dans le Tableau 5.

Le concentré contrôle a été élaboré afin de répondre au mieux aux besoins des animaux d'un point de vue des apports en protéines, en énergie, en fibres mais également en vitamines et minéraux, sans ajouter en trop grosse quantité les nutriments d'intérêt ayant un effet plus ou moins direct sur la fertilité des taureaux. Remarquons que les omega3 et 6 de la

matière grasse proviennent respectivement des graines de lin et du tamisage de flocons de maïs (riches en germes de maïs).

Tableau 5 Composition des différents concentrés (g/kg de matière sèche) utilisés lors du test alimentaire sur les taureaux

	Omega3	Antioxydants	Oligoéléments	All-in	Contrôle
Nutriments	Concentration (g/kg)	Concentration (g/kg)	Concentration (g/kg)	Concentration (g/kg)	Concentration (g/kg)
VEVI	1070	1019	1027	1065	1022
Protéines brutes	158	159	160	155	159
Amidon	118	128	129	117	135
Sucres	75	66	67	73	64
Matière grasse (Omega3)	50 (14)	43 (3,7)	43 (3,7)	52 (13,5)	41 (3,7)
Cellulose	120	119	120	117	120
Zn	0,140	0,150	0,185	0,175	0,150
Cu	0,031	0,031	0,039	0,040	0,031
Se	0,0008	0,0010	0,0008	0,0010	0,0008
I	0,0038	0,0034	0,0049	0,0053	0,0034
Vitamine E	0,160	0,049	0,050	0,146	0,050
β-carotène	0	0,047	0	0,047	0

VEVI = VoederEenheid Vleesvee Intensief (= valeur énergétique pour la production de viande)

Le concentré enrichi en omega3 correspond au concentré contrôle (90%) supplémenté par 10% d'un extrudé riche en graines de lin (Linamix). Afin d'éviter une peroxydation lipidique trop importante, le Linamix contenait des teneurs importantes en vitamine E, ce qui explique une teneur en vitamine E plus élevée comparée à celle du concentré contrôle (160 vs 50 mg/kg).

Le concentré enrichi en antioxydants correspond au concentré contrôle dont 30 % des matières premières ont été granulées avec les antioxydants d'intérêt. Les teneurs en β-carotène (47 vs 0 mg/kg) et en sélénium (1 vs 0,8 mg/kg) sont plus élevées comparées à celles du concentré contrôle.

Le concentré enrichi en oligoéléments correspond au concentré contrôle dont 30 % des matières premières ont été granulées avec des oligoéléments chélatés et de l'iodate de calcium. Les valeurs nutritionnelles de ce concentré sont très proches de celles du concentré contrôle hormis les teneurs en zinc (185 vs 150 mg/kg), en cuivre (39 vs 31 mg/kg) et en iode (4,9 vs 3,4 mg/kg) qui ont été augmentées.

Le concentré All-in, enrichi en omega3, en antioxydants et en oligoéléments, combine l'ensemble des caractéristiques des 3 concentrés spécifiques vus précédemment.

3. Analyses statistiques

En raison du nombre limité de taureaux Holstein, l'analyse statistique a été réalisée uniquement sur les données des taureaux BBB. Pour ce faire, le logiciel SAS a été utilisé.

Le jeu de données pour les taureaux BBB, en lien avec le design expérimental vu précédemment, possède de multiples particularités. En effet, nous avons un jeu de données répétées, à savoir que la détermination du profil en acides gras des spermatozoïdes pour un même taureau, a été réalisée à trois moments différents, sur une période allant d'avril 2017 à janvier 2018. Les données, pour un même taureau, ne sont donc pas indépendantes les unes des autres. De plus, le profil en acides gras des spermatozoïdes au moment du P1 (= prélèvement après un même régime suivi pendant deux mois par tous les taureaux du test alimentaire) est propre à chaque taureau et sera considéré comme une « baseline ». Nous partons du principe que la variation des données en P3 et P5 comporte une part liée à chaque taureau. Par conséquent, cette « baseline » permet de corriger l'effet taureaux.

Le modèle mixte est le modèle idéal qui aurait pu permettre de tester en une seule fois l'effet régime et l'effet saison. Malheureusement, la structure des données ne permet pas l'analyse de celles-ci par un modèle mixte. En effet, nous n'avons pas un plan correctement balancé (ex : si nous regardons par groupe de taureaux, le régime A est associé avec le régime B mais n'est jamais associé avec les autres régimes).

Un modèle linéaire général (GLM) à un facteur fixe (la saison ou le régime) a été utilisé pour réaliser les analyses statistiques des données qui n'ont pas été transformées. Par conséquent, deux analyses statistiques ont été réalisées, l'une par régime et l'autre par prélèvement. Dans un premier temps, les proportions des différents acides gras présents dans les spermatozoïdes de BBB ont été analysées par régime (ctrl ou A ou B ou C ou D) afin de déterminer un éventuel effet saison par régime. Si l'hypothèse nulle (= pas de différences entre prélèvements) était rejetée ($p\text{-valeur} < 0,05$), cela signifierait la présence d'un effet saison pour un certain régime. En revanche, si l'hypothèse nulle n'était pas rejetée ($p\text{-valeur} > 0,05$), cela signifierait qu'il n'y aurait pas d'effet saison. Dans un deuxième temps, les proportions ont été analysées par prélèvements (P3 et P5) dans le but de déterminer un éventuel effet régime. Si l'hypothèse nulle (= pas de différences entre régimes) était rejetée ($p\text{-valeur} < 0,05$), un test de comparaisons multiples (test de Tukey) serait effectué pour déterminer si oui ou non, un régime serait différent d'un autre. Si l'hypothèse nulle n'était pas rejetée ($p\text{-valeur} > 0,05$), cela voudrait dire qu'il n'y aurait pas d'effet régime.

Résultats et discussions

L'objectif de ce mémoire est dans un premier temps de caractériser la composition en acides gras des spermatozoïdes de taureaux BBB ayant reçu des régimes alimentaires différents sur une période allant d'avril 2017 à janvier 2018. Dans un deuxième temps, l'objectif est de corrélérer la composition en acides gras des spermatozoïdes avec les paramètres de qualité de ces mêmes spermatozoïdes après décongélation (mobilité et mobilité progressive).

1. La mise au point

1.1 Le test de répétabilité

En raison des différentes analyses devant être réalisées sur les spermatozoïdes issus d'un même éjaculat, une faible quantité de spermatozoïdes (entre 100 et 150 mg) était destinée à la détermination des profils en acides gras. Cette faible quantité ne permettant pas de réaliser des répliques, un test de répétabilité a été effectué en amont de l'analyse des échantillons du test alimentaire.

Le test de répétabilité a été effectué sur des échantillons de spermatozoïdes issus d'éjaculats de deux taureaux BBB et de deux taureaux Holstein ne participant pas au test alimentaire. Chaque analyse a été effectuée dans son entièreté une seconde fois afin de comparer deux à deux les pourcentages des différents acides gras provenant des spermatozoïdes issus du même éjaculat de taureau.

Les Figures ci-dessous reprennent les acides gras les plus présents dans les spermatozoïdes. Elles représentent le pourcentage de C14:0, C16:0 et C18:0 (Fig.7) le pourcentage de LA, AA et DPA n-3 (Fig.8) et le pourcentage de DHA (Fig.9) sur le total des acides gras identifiés. Les taureaux n°1 et 2 sont des BBB, les taureaux n°3 et 4 sont des Holstein. On peut constater une très faible variabilité entre les deux répliques (A et B). En effet, on observe en moyenne une variabilité inférieure à 2 % entre les répliques, ce qui nous indique la bonne répétabilité des analyses. Ce test de répétabilité étant concluant, cela a permis de travailler sans répliques lors de l'analyse des échantillons provenant des taureaux ayant suivi le test alimentaire.

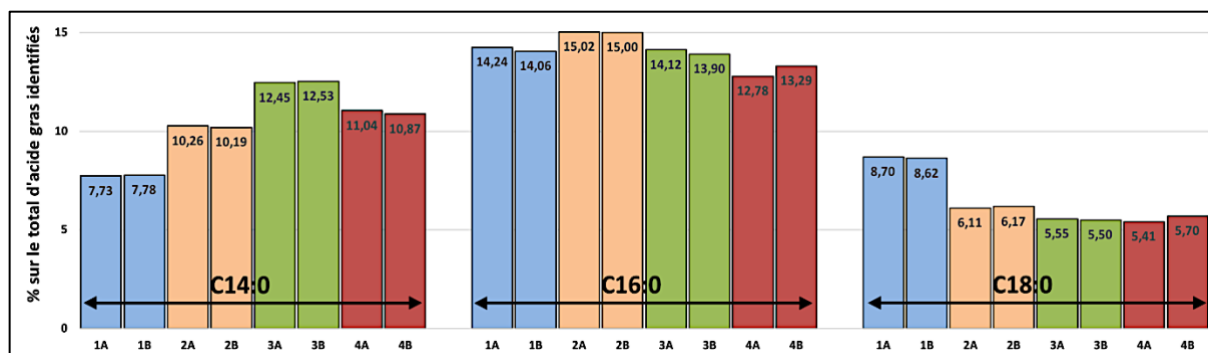


Figure 7 Teneurs en acides myristique (C14:0), palmitique (C16:0) et stéarique (C18:0) (en pourcents des acides gras totaux identifiés) dans les échantillons de spermatozoïdes de taureaux BBB (n°1 et 2) et Holstein (n°3 et 4) analysés deux fois (A et B)

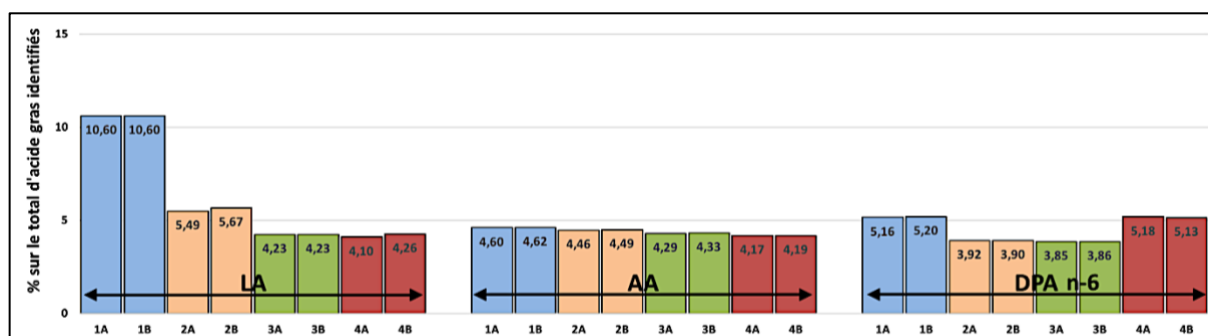


Figure 8 Teneurs en acides linoléique (LA), arachidonique (AA) et docosapentaénoïque omega6 (DPA n-6) (en pourcents des acides gras totaux identifiés) dans les échantillons de spermatozoïdes de taureaux BBB (n°1 et 2) et Holstein (n°3 et 4) analysés deux fois (A et B)

LA = acide linoléique, AA = acide arachidonique, DPA n-6 = acide docosapentaénoïque omega6

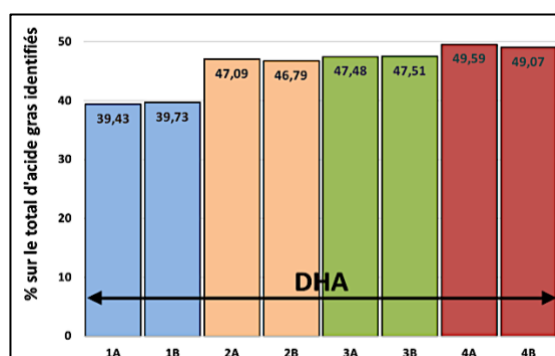
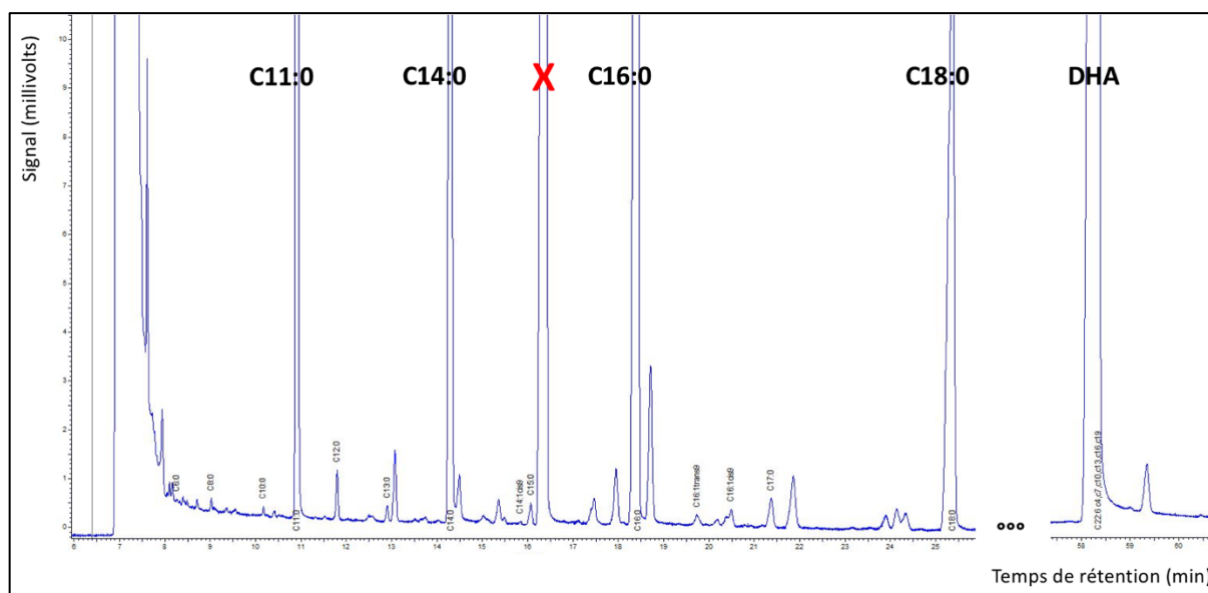


Figure 9 Teneurs en acide docosahexaénoïque (DHA) (en pourcents des acides gras totaux identifiés) dans les échantillons de spermatozoïdes de taureaux BBB (n°1 et 2) et Holstein (n°3 et 4) analysés deux fois (A et B)
DHA = acide docosahexaénoïque

1.2 Les acides gras non identifiés

Après la préparation et le passage en chromatographie en phase gazeuse des 111 échantillons (37 taureaux avec 3 prélèvements par taureau), les chromatogrammes ont été analysés (Fig.10). Chaque pic représente un acide gras. La surface sous chaque pic est proportionnelle à la concentration de l'acide gras dans l'échantillon (quantité en mg d'acides

gras par ml de solution injectée). Plus les nombres de carbones et de désaturations de l'acide gras augmentent, plus l'acide gras est retenu dans la colonne de la chromatographie en phase gazeuse.



La proportion de cet acide gras « X » dans l'échantillon a été déterminée par rapport au pic du C16:0 se trouvant dans le même échantillon. Pour ce faire, une règle de trois a été réalisée. En connaissant l'aire sous le pic du C16:0 correspondant à une quantité en mg d'acide gras par ml de solution injectée (hexane), nous pouvons déterminer la quantité de cet acide gras « X » dans l'échantillon sur base de l'aire sous son pic qui est connue. On parlera d'équivalent de C16:0 c'est à dire que si cet acide gras « X » avait été du C16:0, on aurait eu la quantité déterminée par la règle de trois citée précédemment.

En tenant compte de son temps de rétention (16min20s), nous pouvons d'ores et déjà avancer quelques hypothèses concernant la structure de cet acide gras « X » non identifié, largement présent dans les échantillons de spermatozoïdes. Compte tenu du fait que le temps de rétention augmente avec l'augmentation du nombre de carbones et de désaturations de l'acide gras, le pic de l'acide gras « X » situé avant celui du C16:0, nous laisse supposer qu'il s'agit d'un acide gras avec moins de 16 carbones. De surcroît, sortant juste après le C15:0, il est très peu probable qu'il soit composé de 15 carbones et d'une ou plusieurs désaturations. En effet, si on compare les temps de rétention entre le C14:0 et le C14:1 *cis9* ou encore ceux entre le C16:0 et le C16:1 *cis9*, nous constatons une différence beaucoup plus importante (environ 1min30s) par rapport à la différence des temps de rétention entre le C15:0 et l'acide gras « X » (environ 20s). Sur base de l'ensemble de ces considérations, nous avançons l'hypothèse que l'acide gras « X » contienne une chaîne carbonée composée de 14 carbones avec une ou plusieurs désaturations ou bien qu'il s'agisse d'un acide gras branché à 15 carbones (iso ou antéiso) d'origine bactérienne.

Ce chromatogramme type (Fig.10) présente les 5 acides gras majeurs dans les spermatozoïdes : le C14:0, l'acide gras « X », le C16:0, le C18:0 et le DHA. On constate un pic important sortant après 10min 50s, correspondant au C11:0 qui est un acide gras non présent dans les spermatozoïdes. Cet acide gras a été rajouté lors de l'analyse et correspond au standard d'injection permettant de vérifier l'exactitude des volumes injectés et de corriger les erreurs potentielles. Il n'est pas pris en compte dans les profils en acides gras.

A la suite de cette mise au point et pour le reste de ce mémoire, il a été décidé que la teneur en acides gras des spermatozoïdes sera uniquement exprimée en pourcentage sur le total des acides gras identifiés. Lorsque l'on parlera de « total des acides gras identifiés », cela reprendra les acides gras déterminés à l'aide du standard de calibration (43 acides gras), mais également l'acide gras « X » dont on ne connaît pas l'identité. Les acides gras seront répartis en quatre classes : SFA, MUFA, PUFA et XFA, cette dernière classe reprenant uniquement l'acide gras « X ».

1.3 Le profil en acides gras du plasma séminal

Lors de la mise au point, différents dosages du plasma séminal ont été réalisés sur des échantillons provenant de taureaux BBB et Holstein n'entrant pas dans le test alimentaire. Pour un même taureau, on constate le même genre de profil en acides gras entre les spermatozoïdes (Fig.10) et le plasma séminal (Fig.11). En effet, tout comme dans les spermatozoïdes, on remarque la présence de 5 acides gras majeurs : le C14:0, l'acide gras « X », le C16:0, le C18:0 et le DHA. Le C11:0 est rajouté lors de l'analyse et le DHA est l'acide gras le plus présent dans le liquide séminal.

La mise au point du protocole expérimental permettant de déterminer le profil en acides gras du plasma séminal est expliqué dans la section Matériel et Méthodes. En revanche,

le liquide séminal issu de taureaux ayant participé au test alimentaire sera analysé ultérieurement en raison du manque de temps. Par conséquent, nous nous sommes concentrés dans ce mémoire sur les dosages des spermatozoïdes de taureaux ayant participé au test alimentaire.

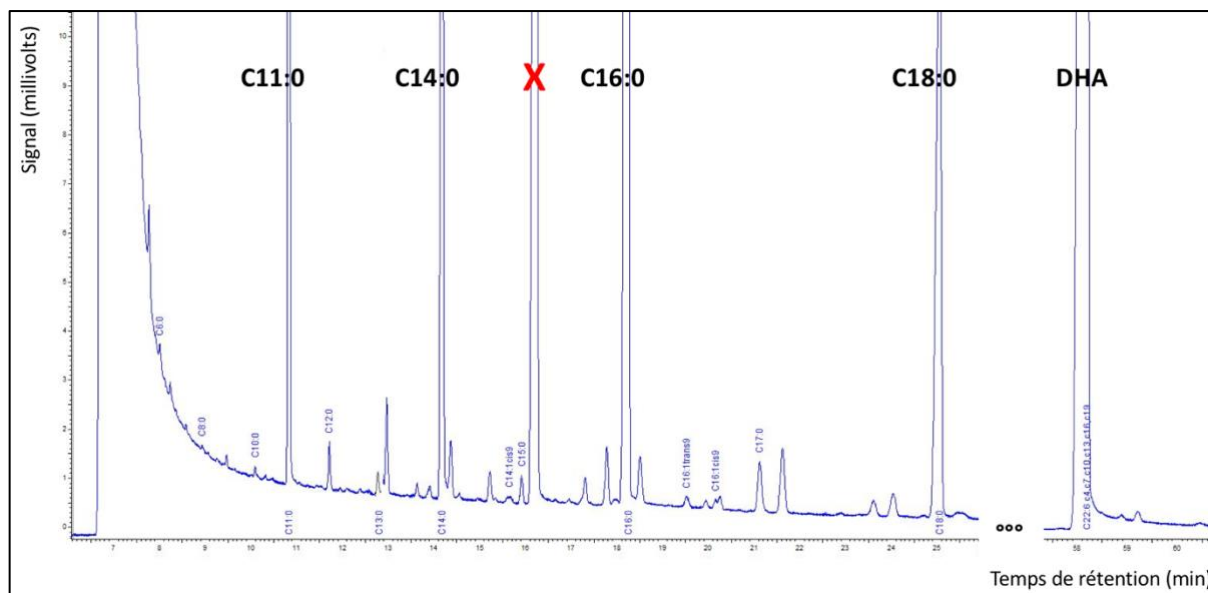


Figure 11 Fractions d'un chromatogramme d'acides gras obtenu à partir d'un échantillon de plasma séminal d'un taureau BBB
DHA = acide docosahexaénoïque

2. La quantification des acides gras

La quantification des acides gras dans les spermatozoïdes de taureau n'a malheureusement pas pu être réalisée dans ce mémoire. En effet, nous pouvons constater une grande différence en comparant les Figures 12 et 13 ci-dessous. Ces deux figures correspondent respectivement à la quantité d'acides gras par gramme de spermatozoïdes et par milliard de spermatozoïdes pour les 37 taureaux du test alimentaire lors du prélèvement d'avril 2017. Il aurait pourtant été logique d'observer les mêmes tendances quantitatives sur les Figures 12 et 13 malgré l'expression différente de ces résultats (quantité vs nombre de spermatozoïdes). L'absence de corrélation indique que la quantification des spermatozoïdes par grammes et/ou par nombre n'est pas robuste. En définitive, aucune corrélation n'a pu être établie entre ces deux types de quantifications, aussi bien pour le prélèvement d'avril 2017 que pour ceux de septembre 2017 et de janvier 2018.

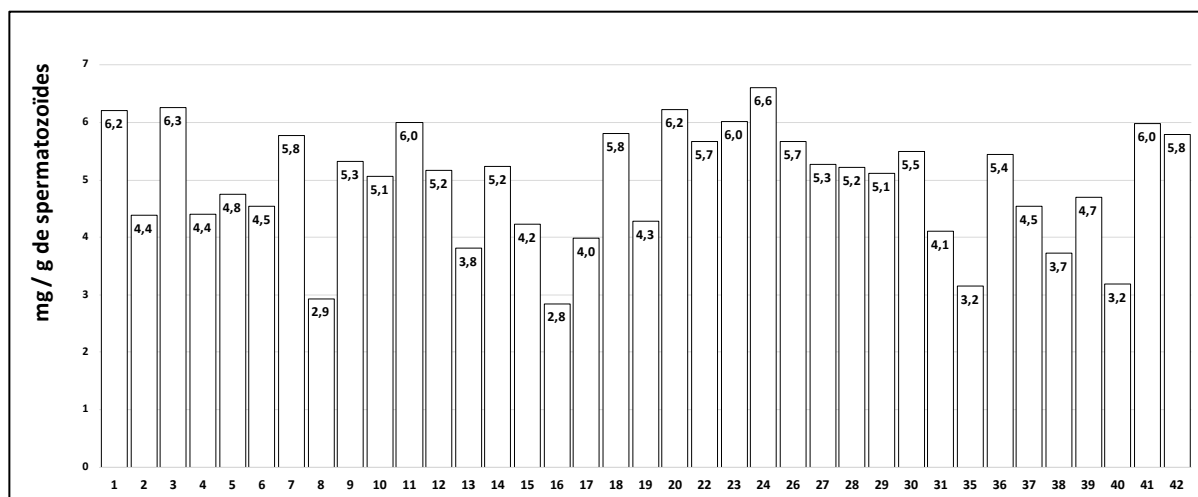


Figure 12 Quantité d'acides gras (en milligrammes d'acides gras par gramme de spermatozoïdes) dans les échantillons des 37 taureaux du test alimentaire lors du prélèvement d'avril 2017

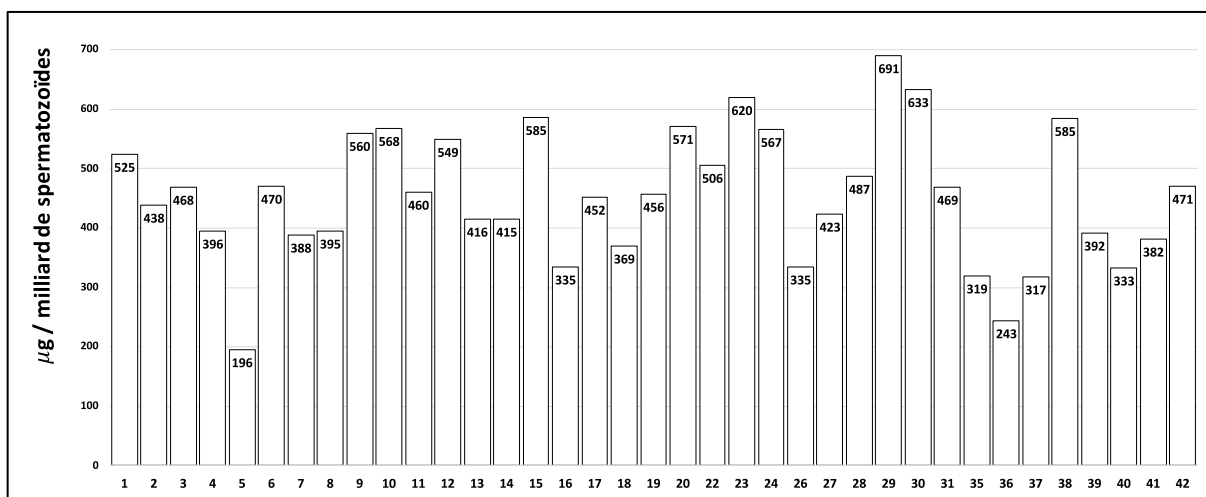


Figure 13 Quantité d'acides gras (en microgrammes d'acides gras par milliard de spermatozoïdes) dans les échantillons des 37 taureaux du test alimentaire lors du prélèvement d'avril 2017

Au niveau de la détermination des masses exactes de spermatozoïdes utilisées pour les prises d'essai, le problème vient probablement des variations importantes de masse des tubes vides (une moyenne de 990 mg avec un écart-type de ± 20 mg a été déterminée pour 10 tubes vides similaires à ceux utilisés dans l'expérience), alors qu'une valeur moyenne a été utilisée pour retirer la masse des tubes vides de la masse mesurée des tubes contenant les culots de spermatozoïdes. Pour être plus précis, il aurait été nécessaire de peser chaque tube vide spécifiquement.

Quant à la détermination du nombre exact de spermatozoïdes utilisés pour les prises d'essai, l'imprécision est également non négligeable étant donné les pertes lors de leur transfert dans les tubes spécifiques du MagNA lyser (Roche Diagnostics, Mannheim, Allemagne) après leur dispersion dans 800 µl d'eau milli-Q, et lors de leur transfert ultérieur vers les tubes Pyrex pour réaliser la suite de l'extraction lipidique.

3. Les profils en acides gras des spermatozoïdes

Les profils en acides gras des spermatozoïdes de taureaux BBB et Holstein en fonction des différents régimes reçus (P1, P3 et P5), se trouvent en annexe (Annexes 1 à 6). Les acides gras sont exprimés en pourcentage sur le total des acides gras identifiés. On remarque la présence de 5 acides gras majeurs : le C18:0, le C14:0, le C16:0, l'acide gras « X » et le DHA, cités dans l'ordre croissant de leur présence au sein des spermatozoïdes. Quelques exceptions peuvent être constatées chez certains taureaux où la proportion de C18:0 est plus importante que celle du C14:0.

Sur les 43 acides gras du standard de calibration, 15 acides gras sont en-dessous de la limite de détection dans les spermatozoïdes (Tab.6). On constate notamment que l'acide ruménique, le CLA majoritaire issu de la biohydrogénation dans le rumen causée principalement par les bactéries, fait partie de cette liste.

Le transfert de l'acide ruménique présent dans le rumen vers les spermatozoïdes des taureaux n'a pas lieu alors qu'il est réalisé vers le lait des vaches. Deux hypothèses peuvent être mentionnées quant à ce non transfert vers les spermatozoïdes. Le rumen étant moins efficace chez les taureaux que chez les vaches, la production d'acides conjugués tel que l'acide ruménique serait moins importante. De plus, les transporteurs spécifiques situés au niveau de la barrière hémato-testiculaire permettant le passage des acides gras du sang vers l'intérieur du tube séminifère (Cheng et al., 2012) ne seraient pas capables de transporter les acides gras cités dans le Tableau 6 et notamment l'acide ruménique.

Tableau 6 Les acides gras non présents dans les spermatozoïdes mais présents dans le standard de calibration

SFA	MUFA	PUFA
C6:0	C14:1 <i>c9</i>	C18:2 <i>t9,t12</i>
C8:0	C16:1 <i>t9</i>	C18:2 <i>c9t11</i> (CLA)
C11:0	C18:1 <i>t9</i>	C18:3 <i>c6,c9,c12</i>
C19:0	C18:1 <i>t11</i>	C18:4 <i>c6,c9,c12,c15</i>
C24:0	C24:1 <i>c15</i>	C20:4 <i>c8,c11,c14,c17</i>

SFA = acides gras saturés, MUFA = acides gras monoinsaturés, PUFA = acides gras polyinsaturés, CLA = acide linoléique conjugué

Dans la suite de ce chapitre « Résultats et Discussions », nous nous focaliserons uniquement sur deux acides gras. L'un étant un omega3 (DHA) et l'autre étant un omega6 (AA). Il nous semblait important d'analyser individuellement les proportions en DHA des autres omega3 étant donné qu'il améliore la fluidité membranaire des spermatozoïdes. De plus, il est l'acide gras le plus présent dans les spermatozoïdes des taureaux (Argov et al., 2013 ; Gürler et al., 2015). Il nous semblait également important d'analyser individuellement

les proportions en AA indépendamment des autres omega6. En effet, l'AA (C20:4 n-6) fait partie des deux acides gras omega6 les plus présents dans les spermatozoïdes de taureaux (l'autre étant le DPA n-6). De plus, il joue un rôle important dans les réactions inflammatoires via notamment la synthèse de prostaglandines.

Une anomalie est survenue dans la détermination du profil en acides gras du taureau n°13 en P1, après avoir suivi le régime contrôle. En effet, la proportion de AA était égale à 13,30 %. Or cette proportion est en moyenne égale à 3 % chez tous les autres taureaux (BBB et Holstein), peu importe le prélèvement (P1, P3 et P5) et les régimes suivis. De plus, la proportion de AA pour le taureau n°13 en P3 et P5 correspond à la moyenne citée précédemment. Par conséquent, cette anomalie diminuant les proportions des autres acides gras et classes d'acides gras, a été corrigée afin de pas avoir de statistiques faussées par cette valeur. Pour ce faire, la proportion anormale de AA % du taureau n°13 a été remplacée par la moyenne de celles des taureaux n°14 à 18 en P1 (taureaux ayant reçu les mêmes régimes que le n°13 tout au long du test alimentaire). Cette moyenne est égale à 3,19 % (Annexe 1).

3.1 La présentation des résultats

Dans un premier temps, les proportions en DHA, en AA et celles des différentes classes d'acides gras dans les spermatozoïdes de BBB seront analysées par régime (ctrl ou A ou B ou C ou D), ceci afin de déterminer un éventuel effet saison. Pour rappel, P3 correspond au prélèvement des éjaculats en septembre 2017, après le premier régime spécifique et P5 correspond au prélèvement de janvier 2018, après le deuxième régime spécifique. Afin de visualiser graphiquement l'effet saison sur les proportions, deux graphes seront comparés. Le premier graphe correspondra au groupe de 6 taureaux (n°1 à 6) ayant suivi la ration A puis B, respectivement en P3 et en P5. Le deuxième graphe correspondra au groupe de 6 taureaux (n°7 à 12) ayant suivi la ration B puis A, respectivement en P3 et en P5. La dynamique temporelle des proportions pour les autres groupes de taureaux BBB (n°13 à 18, n°19 à 26 et n°27 à 31) se trouve en annexe (Annexe 7 à 22). Étant donné que l'on ne retrouve pas de couples inversés comme pour les deux premiers groupes cités précédemment, on ne saurait pas les comparer visuellement. De plus, en raison du nombre limité de taureaux Holstein dans le protocole expérimental, on ne pourrait pas tirer de conclusions visuelles à ce stade.

Dans un second temps, les proportions seront analysées soit en regroupant, soit en séparant les deux prélèvements (P3 et P5) correspondants à un même régime, dans le but de déterminer un éventuel effet régime. Afin de visualiser graphiquement l'effet régime, un graphique sera présenté sous forme de box plot. Les box plot reprenant les proportions en fonction des différents régimes pour les taureaux Holstein, sont placés en annexe (Annexe 23 à 25). En effet, hormis les box plot pour le DHA sur lequel on constate une grande différence avec ceux des BBB, les autres ne seront pas analysés en raison du nombre limité de taureaux Holstein dans le protocole expérimental.

3.2 L'effet saison et l'effet régime sur les proportions de l'acide docosahexaénoïque

a) L'effet saison

Avec l'analyse par régime pour les deux premiers groupes de taureaux (n°1 à 6 et n°7 à 12) ayant suivi les régimes A et B dans un ordre inversé (Fig.14), on peut déterminer visuellement s'il y a un effet saison. En l'occurrence, il semblerait qu'il n'y ait pas d'effet saison sur les proportions en DHA pour les régimes A et B. En effet, on observe visuellement une légère diminution d'environ 5 % en DHA entre P3 et P5 sur la gauche de la Figure 14. A l'inverse, on remarque une légère augmentation d'environ 5 % en DHA entre P3 et P5 sur la droite de la Figure 14.

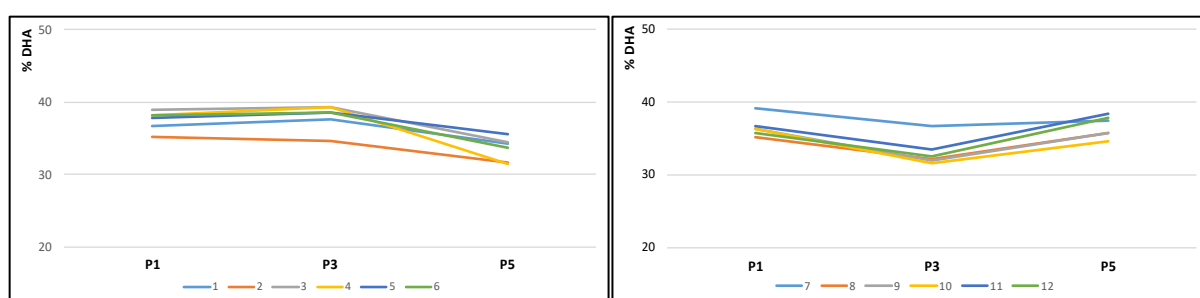


Figure 14 Proportions en acide docosahexaénoïque (DHA) dans les spermatozoïdes de BBB, après le régime A en P3 et le régime B en P5 (gauche), après le régime B en P3 et le régime A en P5 (droite)
Les concentrés sont définis au Tableau 5. DHA = acide docosahexaénoïque

Au niveau statistique, aucune différence significative entre prélèvements (P3 et P5) n'a pu être constatée sur les proportions en DHA dans les spermatozoïdes pour les régimes contrôle, A, B, C et D. Par conséquent, il n'y a aucun effet saison sur les proportions en DHA pour chacun des régimes : contrôle (p-valeur = 0,5525), omega3 (p-valeur = 0,4308), antioxydants (p-valeur = 0,6609), oligoéléments (p-valeur = 0,4777) et all-in (p-valeur = 0,2907).

b) L'effet régime

Si nous analysons les proportions en DHA en fonction des différents régimes (sans tenir compte qu'il y ait eu deux prélèvements, en P3 et en P5) nous pouvons observer visuellement un effet régime sur ces proportions (Fig.15). En effet, il semblerait qu'il y ait une différence entre les régimes suivant : omega3 (A) vs contrôle (ctrl), omega3 (A) vs antioxydants (B), omega3 (A) vs oligoéléments (C), all-in (D) vs contrôle (ctrl), all-in (D) vs antioxydants (B), all-in (D) vs oligoéléments (C).

Il est intéressant d'observer qu'il existe pour un même régime, une proportion moyenne en DHA plus élevée dans les spermatozoïdes de taureaux Holstein comparée à celle des spermatozoïdes de taureaux BBB (Fig.15). En effet, on observe respectivement une

moyenne en DHA dans les spermatozoïdes de Holstein égale à 39 %, 41 % et 39 % pour les régimes contrôle, omega3 et all-in contre 33 %, 37 % et 36 % de DHA dans les spermatozoïdes de BBB. En revanche, cette information demande à être confirmée par d'autres analyses sur les taureaux Holstein étant donné leur nombre limité dans ce protocole expérimental.

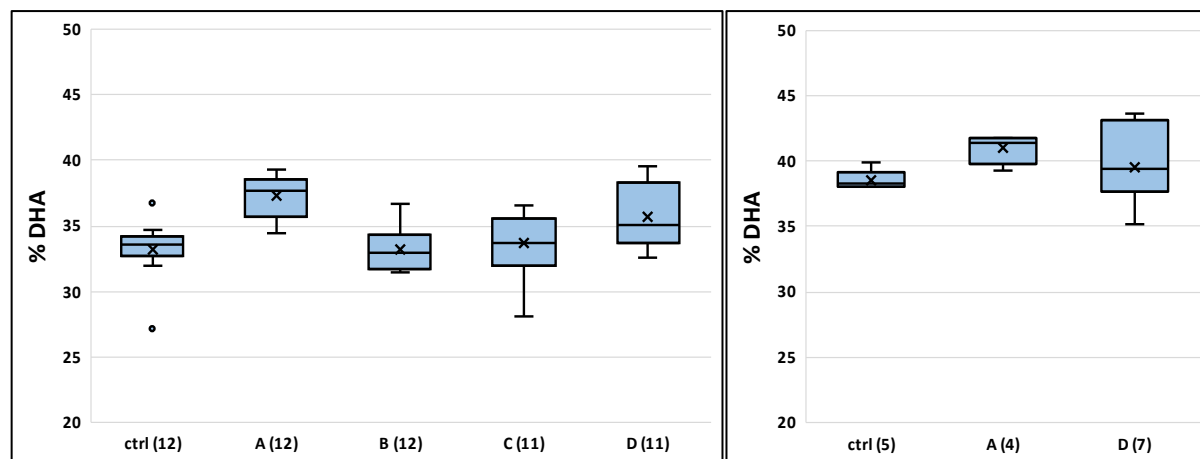


Figure 15 Proportions en acide docosahexaénoïque (DHA) dans les spermatozoïdes (gauche) et dans le plasma séminal (droite) de taureaux BBB pour les deux prélèvements cumulés (P3 et P5)
Les concentrés sont définis au Tableau 5. Le nombre de taureaux par régime est indiqué entre parenthèses. DHA = acide docosahexaénoïque

Avec l'analyse par prélèvement, on constate pour les échantillons analysés en P3, un effet régime sur la proportion en DHA dans les spermatozoïdes de BBB (p-valeur = 0,0001). En effet, il y a des différences significatives entre les régimes suivants : A vs contrôle (p-valeur = 0,0002), A vs B (p-valeur = 0,0021), A vs C (p-valeur = 0,0145) et D vs contrôle (p-valeur = 0,0096). On constate également pour les échantillons analysés en P5, un effet régime sur la proportion en DHA dans les spermatozoïdes de BBB (p-valeur = 0,0038). En effet, il y a des différences significatives entre les régimes suivants : A vs contrôle (p-valeur = 0,0080), A vs B (p-valeur = 0,0060) et A vs C (p-valeur = 0,0241).

Compte tenu du fait qu'il n'y ait pas d'effet saison sur la proportion en DHA quel que soit le régime, on peut déduire des résultats qu'un régime enrichi en omega3, plus particulièrement en ALA, augmente la proportion en DHA dans les spermatozoïdes de BBB. En effet, les ALA vont successivement être désaturés et allongés pour former des acides gras omega3 plus longs et plus insaturés, notamment le DHA. Les régimes enrichis en antioxydants et en oligoéléments n'influencent pas la proportion de DHA dans les spermatozoïdes de taureaux BBB. En revanche, les antioxydants et les oligoéléments ajoutés à un régime enrichi en omega3, tendent à diminuer l'augmentation des proportions en DHA dans les spermatozoïdes de BBB sans que l'effet soit significatif.

3.3 L'effet saison et l'effet régime sur les proportions de l'acide arachidonique

a) L'effet saison

La Figure 16 montrant la dynamique saisonnière des proportions en AA par régime (A et B), est plus compliquée à interpréter visuellement. En effet, hormis quelques taureaux, il y a une sorte de constance au niveau des proportions en AA entre P3 et P5, ce qui peut laisser penser qu'il n'y ait pas d'effet saison sur ces proportions pour les régimes A et B.

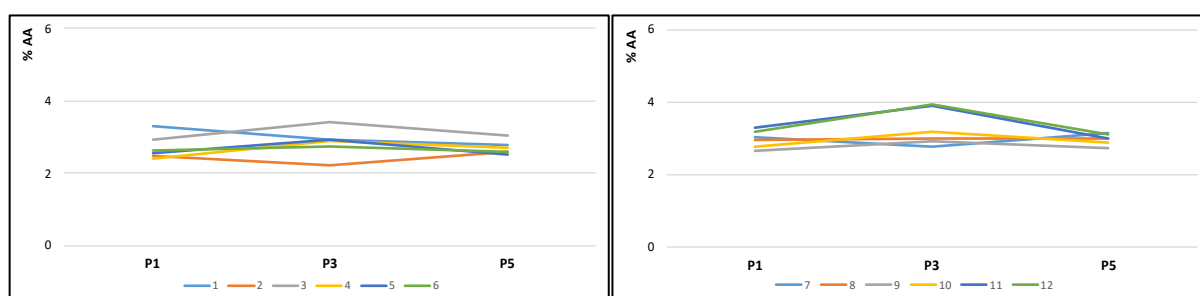


Figure 16 Proportions en acide arachidonique (AA) dans les spermatozoïdes de BBB, après le régime A en P3 et le régime B en P5 (gauche), après le régime B en P3 et le régime A en P5 (droite)
Les concentrés sont définis au Tableau 5. AA = acide arachidonique

Au niveau statistique, tout comme pour le DHA, les analyses par régime permettent de ne constater aucun effet saison sur les proportions en AA dans les spermatozoïdes de BBB. Par conséquent, aucune différence significative entre prélèvements (P3 et P5) n'a pu être constatée sur les proportions en AA pour l'ensemble des régimes : contrôle (p-valeur = 0,5525), omega3 (p-valeur = 0,4308), antioxydants (p-valeur = 0,6609), oligoéléments (p-valeur = 0,4777) et all-in (p-valeur = 0,2907).

b) L'effet régime

L'analyse rassemblant les proportions en AA (sans tenir compte qu'il y ait deux prélèvements en P3 et P5) en fonction des différents régimes, ne nous permet pas d'observer visuellement un effet régime sur ces proportions. On remarque une constance dans les proportions en AA pour chacun des régimes (± 3 %) (Fig.17).

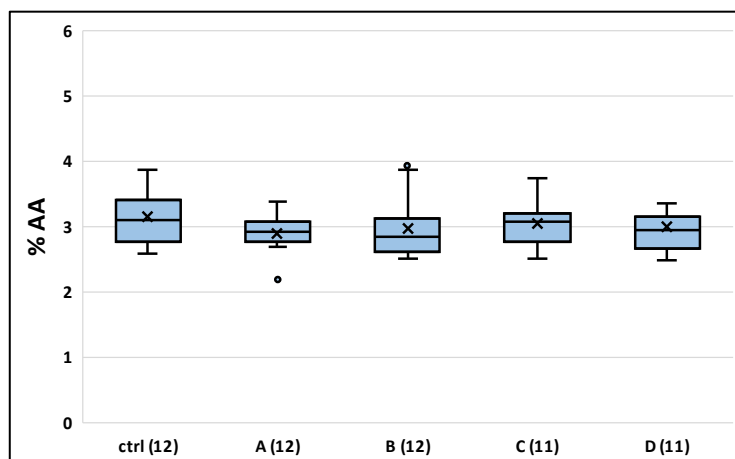


Figure 17 Proportions en acide arachidonique (AA) dans les spermatozoïdes de BBB pour les deux prélèvements cumulés (P3 et P5)
Les concentrés sont définis au Tableau 5. Le nombre de taureaux par régime est indiqué entre parenthèses. AA = acide arachidonique

Concernant l'analyse par prélèvement, on ne constate aucun effet régime sur la proportion en AA dans les spermatozoïdes de BBB pour les échantillons analysés en P3 et en P5 (p-valeur = 0,6949 et p-valeur = 0,5441 respectivement).

En tenant compte du fait qu'il n'y ait pas d'effet saison sur la proportion en AA quel que soit le régime, on peut dire que les régimes enrichis en antioxydants ou en oligoéléments n'ont pas d'impacts sur la proportion en AA dans les spermatozoïdes de taureaux. De plus, l'AA (C20:4 n-6) étant un acide gras omega6, il est tout à fait normal de ne pas observer d'augmentation de sa proportion après un régime enrichi en omega3. Il est encore plus normal de visualiser une très légère baisse de la proportion en AA pour le régime omega3 ou le régime all-in par rapport aux autres régimes, même si les différences ne sont pas significatives d'un point de vue statistique. Si les résultats étaient significatifs, cela confirmerait qu'il existe bien deux voies métaboliques de bioconversion des acides gras. En effet, étant donné que ce sont les mêmes enzymes qui réalisent la bioconversion du ALA et du LA en acides gras plus longs et plus insaturés, l'ajout supplémentaire de ALA dans l'alimentation des taureaux provoquerait une compétition entre les deux voies de bioconversion (William, 2000). Dans le cas d'un régime enrichi en omega3, les enzymes favoriseraient la voie de bioconversion des omega3 au dépend de celle des omega6. Ceci impliquerait qu'après un régime enrichi en omega3, on pourrait retrouver une proportion légèrement plus élevée en omega3 et une proportion légèrement diminuée en omega6 dans les spermatozoïdes.

3.4 L'effet saison et l'effet régime sur les proportions des différentes classes d'acides gras

a) L'effet saison

L'analyse par régime permet de constater visuellement un effet saison sur les proportions en MUFA (Fig.19) et en XFA (Fig.21) pour les régimes A et B. Il est difficile de déterminer visuellement un éventuel effet saison pour la proportion en SFA (Fig.18) et en PUFA (Fig.20) en raison notamment d'une variabilité plus élevée entre taureaux pour ces deux classes d'acides gras.

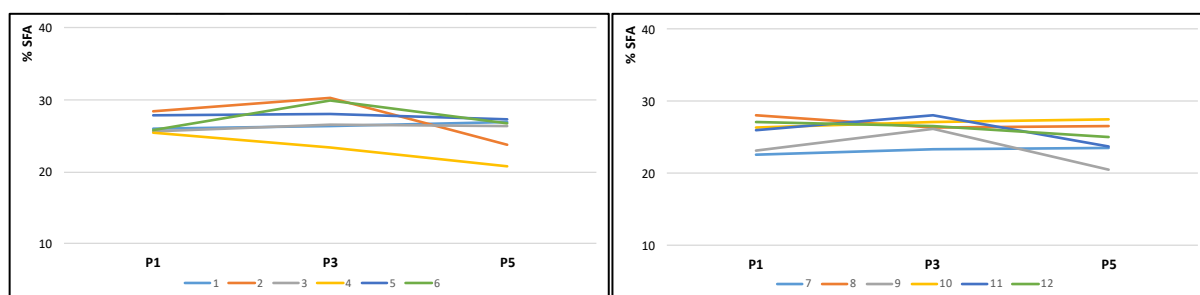


Figure 18 Proportions en acides gras saturés (SFA) dans les spermatozoïdes de BBB, après le régime A en P3 et le régime B en P5 (gauche), après le régime B en P3 et le régime A en P5 (droite)
Les concentrés sont définis au Tableau 5. SFA = acides gras saturés

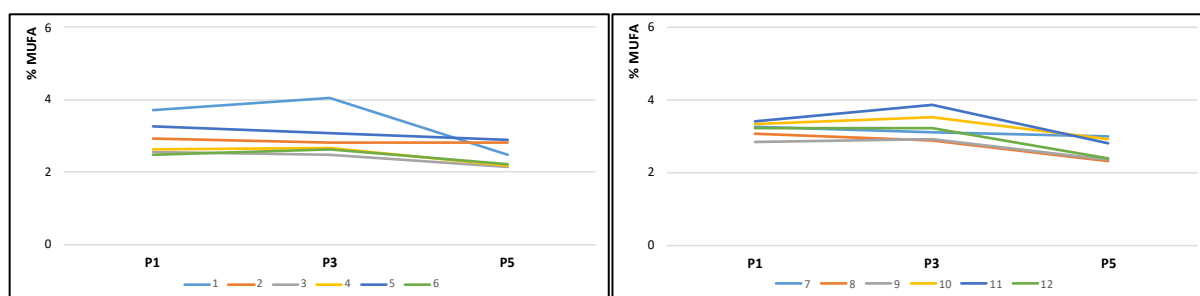


Figure 19 Proportions en acides gras monoinsaturés (MUFA) dans les spermatozoïdes de BBB, après le régime A en P3 et le régime B en P5 (gauche), après le régime B en P3 et le régime A en P5 (droite)
Les concentrés sont définis au Tableau 5. MUFA = acides gras monoinsaturés

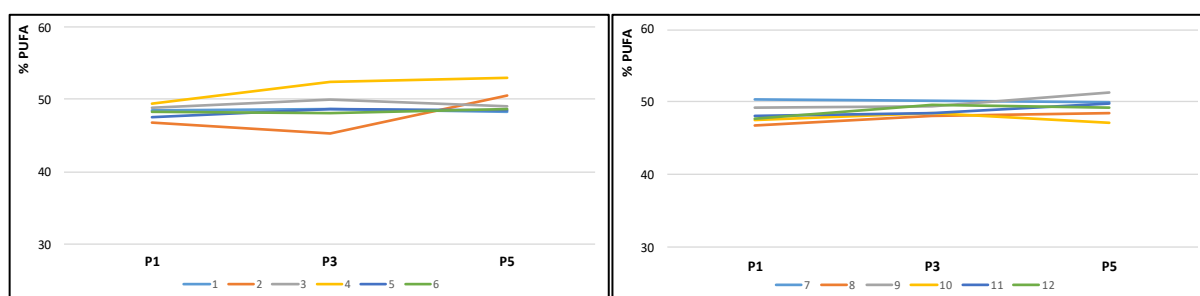


Figure 20 Proportions en acides gras polyinsaturés (PUFA) dans les spermatozoïdes de BBB, après le régime A en P3 et le régime B en P5 (gauche), après le régime B en P3 et le régime A en P5 (droite)
Les concentrés sont définis au Tableau 5. PUFA = acides gras polyinsaturés

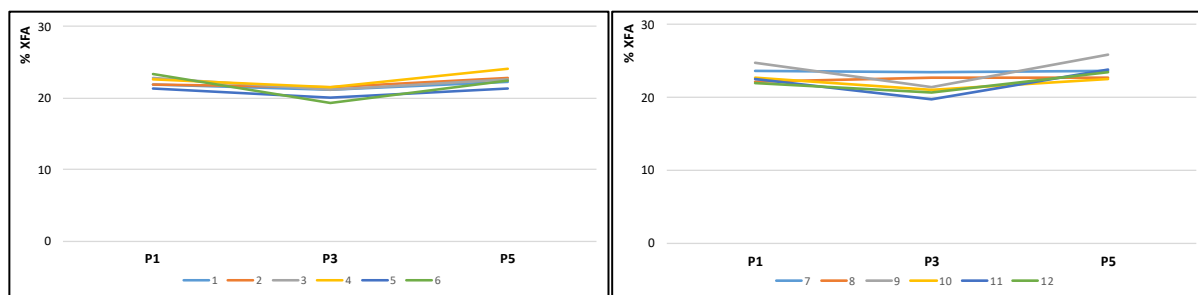


Figure 21 Proportions en acide gras « X » (XFA) dans les spermatozoïdes de BBB, après le régime A en P3 et le régime B en P5 (gauche), après le régime B en P3 et le régime A en P5 (droite)
Les concentrés sont définis au Tableau 5. XFA = acide gras « X »

Au niveau statistique, on constate un effet saison sur les proportions en SFA dans les spermatozoïdes de BBB seulement pour le régime contrôle (p-valeur = 0,0077). En revanche, on ne constate aucun effet saison pour les autres régimes : A (p-valeur = 0,1089), B (p-valeur = 0,3287), C (p-valeur = 0,2341) et D (p-valeur = 0,8132).

Pour les proportions en MUFA dans les spermatozoïdes de BBB, on constate un effet saison pour les régimes suivants : A (p-valeur = 0,0015), B (p-valeur = 0,0048) et contrôle (p-valeur = 0,0008). En revanche, on constate aucun effet saison pour les régimes C (p-valeur = 0,0764) et D (p-valeur = 0,0604).

Concernant les proportions en PUFA dans les spermatozoïdes de BBB, on ne constate aucun effet saison pour l'ensemble des régimes testés : contrôle (p-valeur = 0,0969), A (p-valeur = 0,6031) et B (p-valeur = 0,4572), C (p-valeur = 0,2889) et D (p-valeur = 0,7937).

Pour les proportions en XFA dans les spermatozoïdes de BBB, on constate un effet saison pour les régimes suivants : contrôle (p-valeur = 0,0021), A (p-valeur = 0,0025) et C (p-valeur = 0,0088). En revanche, on ne constate aucun effet saison pour les régimes B (p-valeur = 0,0749) et D (p-valeur = 0,1401).

b) L'effet régime

Si nous analysons ensemble, les proportions des différentes classes d'acides gras dans les spermatozoïdes de BBB, en P3 et P5, en fonction des différents régimes, nous pouvons observer visuellement quelques tendances (Fig.22). Il semblerait qu'il y ait une différence biologique des proportions pour les régimes A et B par rapport aux régimes contrôle, C et D. En effet, on constate visuellement pour les régimes A et B une légère diminution des proportions de SFA et de MUFA par rapport aux autres régimes, ce qui va de pair avec une légère augmentation des proportions en PUFA et XFA.

On retrouve en moyenne dans les spermatozoïdes de taureaux BBB : 26 % de SFA, 3 % de MUFA, 49 % de PUFA et 22 % de XFA (pourcentage exprimé en pourcentage des acides gras identifiés totaux).

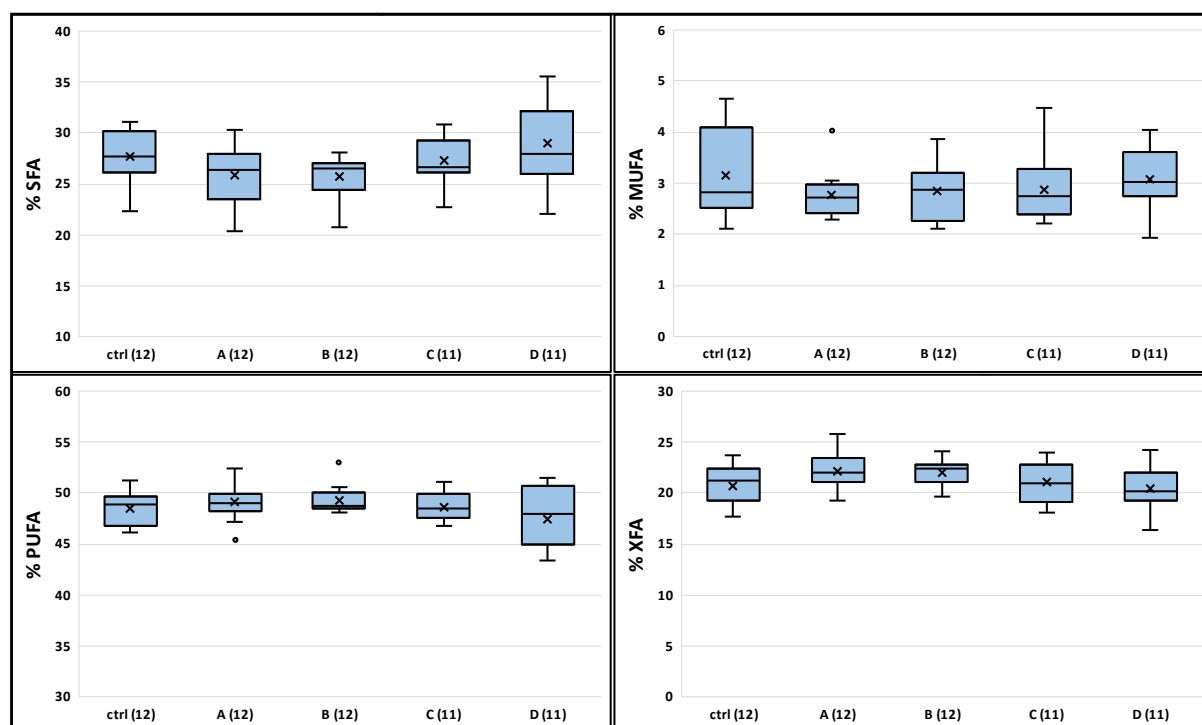


Figure 22 Proportions des différentes classes d'acides gras dans les spermatozoïdes de BBB pour les deux prélèvements cumulés (P3 et P5)

Les concentrés sont définis au Tableau 5. Le nombre de taureaux par régime est indiqué entre parenthèses.

SFA = acides gras saturés, MUFA = acides gras monoinsaturés, PUFA = acides gras polyinsaturés, XFA = acide gras « X »

Concernant l'analyse par prélèvement, on ne constate statistiquement pour les échantillons analysés en P3 et P5 aucun effet régime sur la proportion de SFA (p-valeur = 0,3310 et p-valeur = 0,0600 respectivement), de MUFA (p-valeur = 0,1871 et p-valeur = 0,7740 respectivement) et de PUFA (p-valeur = 0,6151 et p-valeur = 0,0935 respectivement) dans les spermatozoïdes de BBB. On n'observe également aucun effet régime sur la proportion de XFA pour les échantillons analysés en P3 (p-valeur = 0,2993). En revanche, on constate pour les échantillons analysés en P5, un effet régime sur la proportion de XFA (p-valeur = 0,0355) dans les spermatozoïdes de BBB. En effet, il y a notamment des différences significatives entre les régimes A et D (p-valeur = 0,0383).

Seul le régime D ne comporte aucun effet saison pour l'ensemble des différentes classes d'acides gras. Par conséquent, en raison de l'effet saison qui interfère avec l'effet régime, l'interprétation des résultats ci-dessous est à prendre avec circonspection. Pour éviter cet effet saison, il aurait fallu avoir un protocole expérimental plus robuste. En effet, en augmentant le nombre de taureaux par régime et en réalisant un carré latin dans lequel chaque taureau est son propre contrôle, on pourrait annuler l'effet saison et augmenter la puissance statistique.

Même si statistiquement il n'y a pas de différences significatives, on visualise des différences dans les proportions des différentes classes d'acides gras pour les régimes A et B

par rapport aux autres régimes. En effet, il semblerait qu'un régime enrichi en omega3 ou en antioxydants, augmenterait légèrement la proportion de PUFA et de XFA dans les spermatozoïdes de BBB. L'augmentation de la proportion en PUFA avec un régime enrichi en omega3 semble concorder avec notre première constatation. En effet, un supplément en ALA dans l'alimentation des taureaux BBB permettrait d'augmenter la présence d'omega3, plus longs et plus insaturés, dans leurs spermatozoïdes. Cette augmentation en omega3 ferait par conséquent, augmenter la proportion de PUFA dans les spermatozoïdes et diminuerait la proportion de SFA. Par conséquent, nourrir des taureaux avec un régime enrichi en omega3 permettrait une diminution moins forte de la proportion en PUFA des spermatozoïdes, liée la cryopréservation et aux ROS (Khoshvaght et al., 2016). En revanche, il semble surprenant qu'un régime enrichi en antioxydants augmente la proportion en PUFA étant donné que nous n'avons constaté précédemment aucun effet de ce régime sur la proportion en DHA et en AA. Il est difficile de tirer des conclusions concernant l'augmentation visuelle de la proportion en XFA avec un régime enrichi en omega3 ou en antioxydants, étant donné que nous ne connaissons pas la structure de cet acide gras non identifié.

4. La qualité des spermatozoïdes après décongélation

4.1 L'effet saison et l'effet régime sur la qualité des spermatozoïdes après décongélation

Les paramètres testés pour évaluer la qualité des spermatozoïdes sont la mobilité et la mobilité progressive après décongélation des spermatozoïdes de taureaux BBB. On constate logiquement que la mobilité ($\pm 55\%$) est plus élevée que la mobilité progressive ($\pm 25\%$) d'environ 30 % en moyenne (Fig.25)

a) L'effet saison

Avec l'analyse par régime, on observe visuellement de fortes variations au niveau de la mobilité entre taureaux d'un même groupe et à une période bien définie (Fig.23). C'est également le cas mais dans une moindre mesure pour la mobilité progressive (Fig.24). Par conséquent, il paraît difficile de déterminer visuellement un effet saison éventuel pour les régimes A et B.

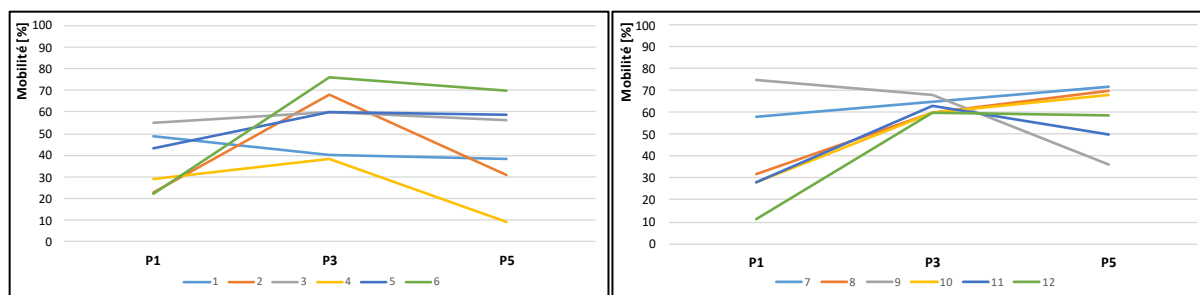


Figure 23 Mobilité post décongélation des spermatozoïdes de BBB, après le régime A en P3 et le régime B en P5 (gauche), après le régime B en P3 et le régime A en P5 (droite)
Les concentrés sont définis au Tableau 5.

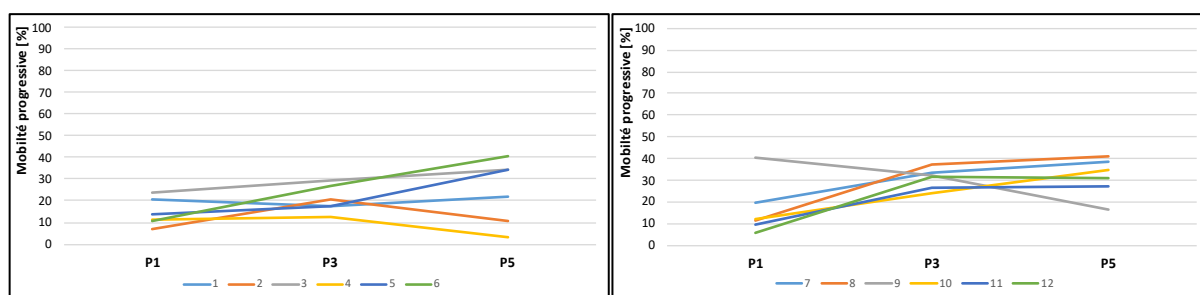


Figure 24 Mobilité progressive post décongélation des spermatozoïdes de BBB, après le régime A en P3 et le régime B en P5 (gauche), après le régime B en P3 et le régime A en P5 (droite)
Les concentrés sont définis au Tableau 5.

Au niveau statistique, aucune différence significative entre prélèvements (P3 et P5) n'a pu être constatée sur la mobilité des spermatozoïdes BBB pour chacun des régimes. Par conséquent, il n'y a pas d'effet saison sur la mobilité pour les 5 régimes : contrôle (p-valeur = 0,8025), A (p-valeur = 0,7503), B (p-valeur = 0,0823), C (p-valeur = 0,3822) et D (p-valeur = 0,1473).

On ne constate aucun effet saison sur la mobilité progressive des spermatozoïdes BBB pour les régimes suivant : contrôle (p-valeur = 0,7008), B (p-valeur = 0,3770), C (p-valeur = 0,1976) et D (p-valeur = 0,2808). En revanche, un effet saison a pu être constaté sur la mobilité progressive pour le régime A (p-valeur = 0,0323).

b) L'effet régime

La Figure 25 représente la mobilité et la mobilité progressive en fonction des différents régimes, sans tenir compte qu'il y ait deux prélèvements (P3 et P5). Nous ne pouvons visuellement observer aucun effet régime sur la mobilité. En revanche, il semblerait qu'il y ait une légère différence de mobilité progressive entre les régimes suivants : B vs C, B vs D, A vs C et A vs D, ces deux derniers dans une moindre mesure.

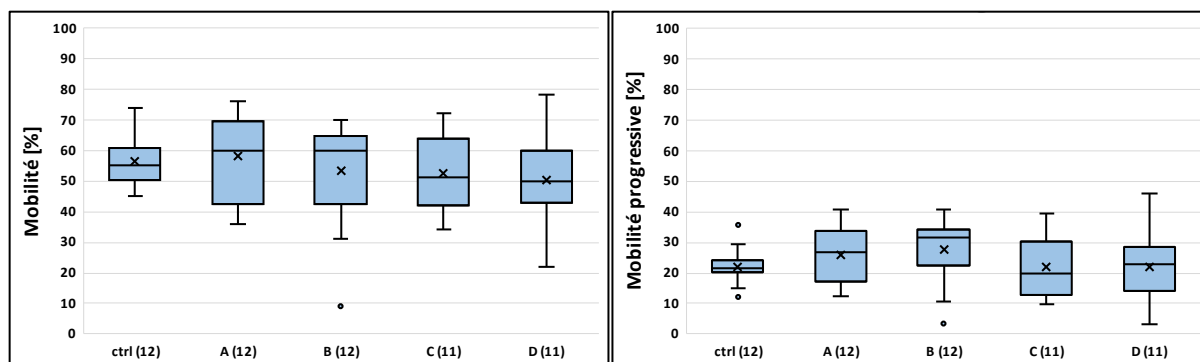


Figure 25 Mobilité (gauche) et mobilité progressive (droite) des spermatozoïdes de BBB pour les deux prélèvements cumulés (P3 et P5)

Avec l'analyse par prélèvement, on ne constate aucun effet régime sur la mobilité après décongélation des spermatozoïdes de BBB pour les échantillons analysés en P3 et en P5 (p -valeur = 0,0586 et p -valeur = 0,2784 respectivement). En revanche, on constate pour les échantillons analysés en P3, un effet régime sur la mobilité progressive après décongélation (p -valeur = 0,0028). En effet, il y a des différences significatives entre les régimes suivants : B vs C (p -valeur = 0,0075) et B vs D (p -valeur = 0,0036). Pour les échantillons analysés en P5, on ne constate aucun effet régime sur la mobilité progressive (p -valeur = 0,5164).

En tenant compte qu'il n'y ait pas d'effet saison sur la mobilité après décongélation quel que soit le régime et pas d'effet saison sur la mobilité progressive après décongélation pour les régimes contrôle, B, C et D, nous pouvons tirer certaines conclusions. D'après plusieurs études, l'ajout d'antioxydants lors de la dilution des spermatozoïdes augmenterait leur protection contre les effets délétères des ROS. Il permettrait notamment d'améliorer la mobilité et la mobilité progressive des spermatozoïdes après décongélation (Bilodeau et al., 2001 ; Sariözkan et al., 2009). En revanche, nous avons pu mettre en évidence que nourrir des taureaux avec un supplément en antioxydants n'améliorerait pas la mobilité après décongélation. A l'inverse, un régime enrichi uniquement en antioxydants, améliorerait la mobilité progressive des spermatozoïdes après décongélation (vérifié en P3). Cependant, l'ajout d'omega3 et d'oligoéléments dans un régime enrichi en antioxydants, contrecarrerait l'effet positif apporté par les antioxydants seuls, au niveau de la mobilité progressive.

4.2 L'effet des proportions en acide docosahexaénoïque, en acide arachidonique et celles des différentes classes d'acides gras sur la qualité des spermatozoïdes après décongélation

Des corrélations ont été effectuées par saison afin d'évaluer un éventuel effet des proportions en AA, en DHA et des différentes classes d'acides gras sur la mobilité et la mobilité progressive des spermatozoïdes après décongélation. Nous n'observons aucune corrélation entre les acides gras (AA et DHA) et les paramètres de la qualité des spermatozoïdes après décongélation, ceci aussi bien en P3 (Fig.26) qu'en P5 (Fig.27).

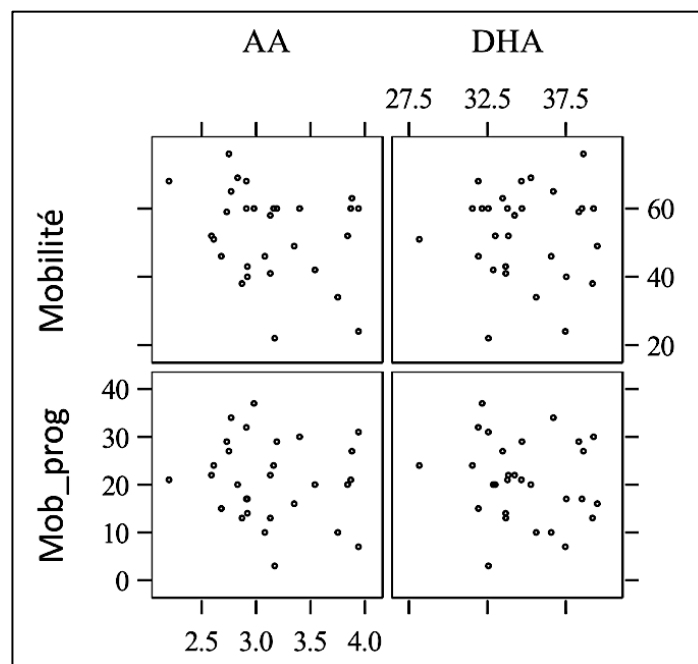


Figure 26 Corrélations entre les proportions d'acides gras (acide arachidonique et acide docosahexaénoïque) et les paramètres de qualité des spermatozoïdes après décongélation en P3

AA = acide arachidonique, DHA = acide docosahexaénoïque, mob_prog = mobilité progressive

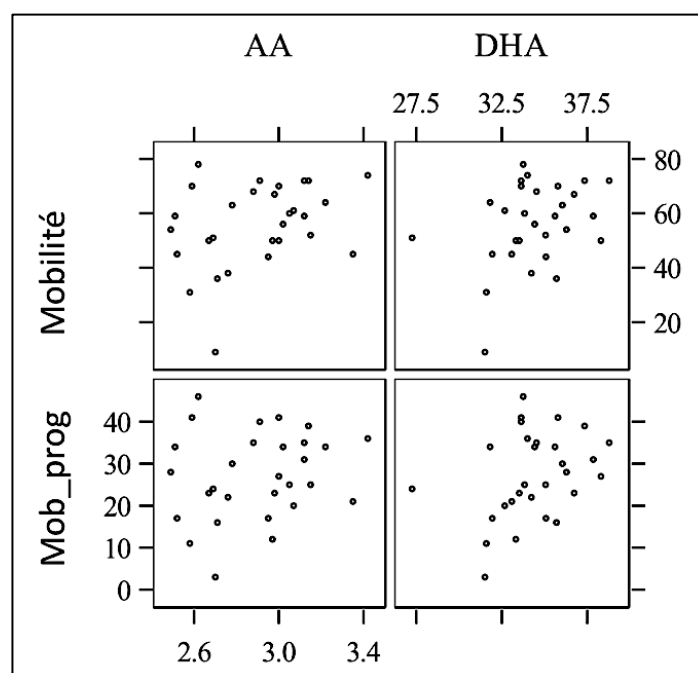


Figure 27 Corrélations entre les proportions d'acides gras (acide arachidonique et acide docosahexaénoïque) et les paramètres de qualité des spermatozoïdes après décongélation en P5

AA = acide arachidonique, DHA = acide docosahexaénoïque, mob_prog = mobilité progressive

De même, nous n'observons aucune corrélation entre les différentes classes d'acides gras (SFA, MUFA, PUFA et XFA) et les paramètres de la qualité des spermatozoïdes après décongélation (mobilité et mobilité progressive). On le constate aussi bien en P3 (Fig.28) qu'en P5 (Fig.29).

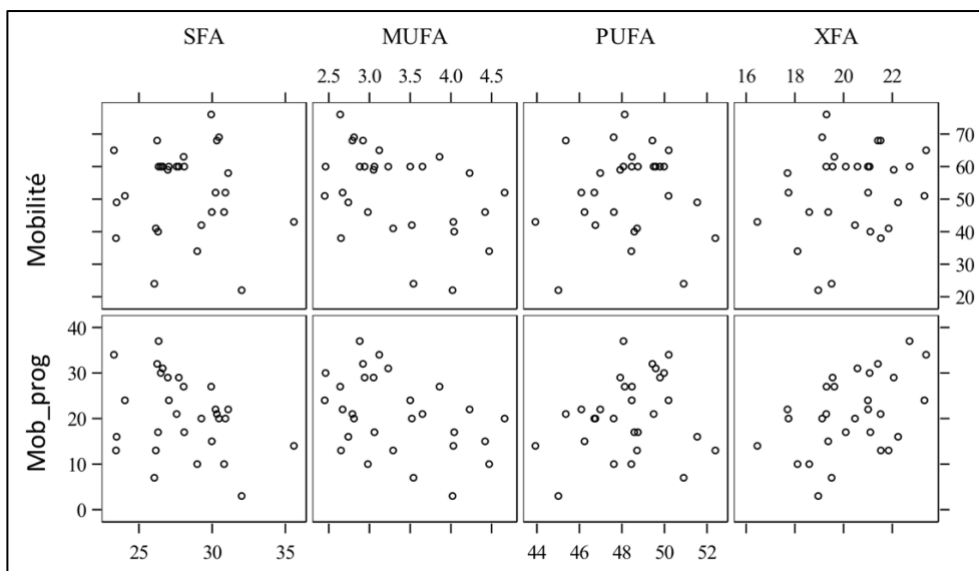


Figure 28 Corrélations entre les proportions des différentes classes d'acides gras et les paramètres de qualité des spermatozoïdes après décongélation en P3

SFA = acides gras saturés, MUFA = acides gras monoinsaturés, PUFA = acides gras polyinsaturés, XFA = acide gras « X », mob_prog = mobilité progressive

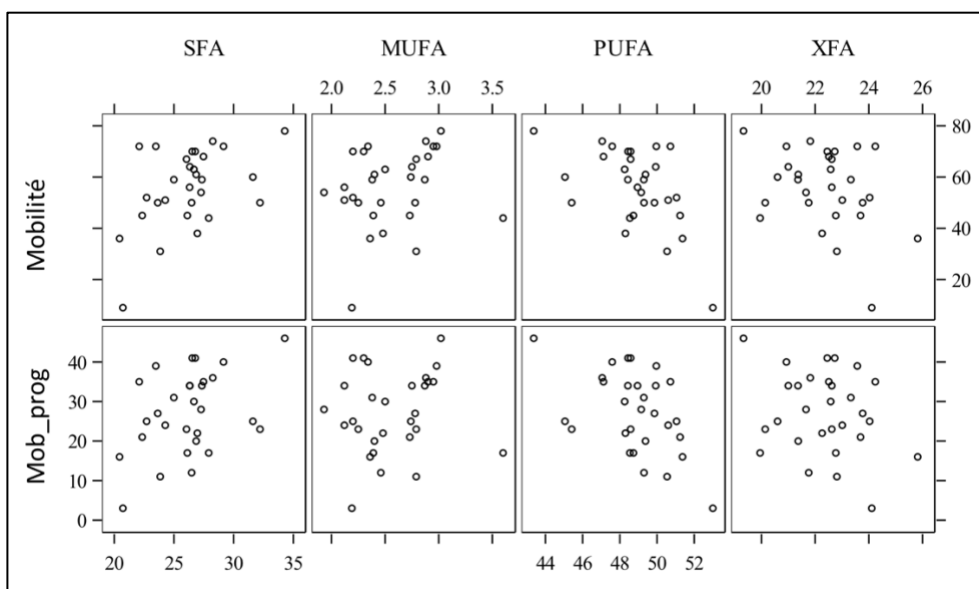


Figure 29 Corrélations entre les proportions des différentes classes d'acides gras et les paramètres de qualité des spermatozoïdes après décongélation en P5

SFA = acides gras saturés, MUFA = acides gras monoinsaturés, PUFA = acides gras polyinsaturés, XFA = acide gras « X », mob_prog = mobilité progressive

Conclusions et perspectives

L'objectif de ce mémoire était de caractériser la composition en acides gras des spermatozoïdes de taureaux BBB ayant reçu des régimes alimentaires différents. L'objectif était également d'observer l'impact de la composition en acides gras des spermatozoïdes sur les paramètres de qualité des spermatozoïdes après décongélation (mobilité et mobilité progressive).

Chaque taureau a reçu 3 concentrés parmi les 5 concentrés testés (omega 3, antioxydants, oligoéléments, all-in = omega 3-antioxydants-oligoéléments et un contrôle) sur une période allant d'avril 2017 à janvier 2018. Les analyses d'acides gras ont été réalisées sur les prélèvements d'avril 2017 (P1), de septembre 2017 (P3) et de janvier 2018 (P5). Ces prélèvements correspondent respectivement au régime contrôle, au 1^{er} régime spécifique et au 2^{ème} régime spécifique. Seulement 3 régimes (A, B et un contrôle) ont pu être testés sur les taureaux Holstein en raison du nombre limité d'individus de cette race à l'AWÉ. Pour cette raison, les profils en acides gras pour les Holstein n'ont pas été examinés dans ce mémoire.

Les profils en acides gras des spermatozoïdes de taureaux BBB ont été modifiés par le régime enrichi en omega3. Cela confirme que la composition en acides gras des spermatozoïdes dépend du régime alimentaire donné aux taureaux. En effet, la proportion en DHA augmente dans les spermatozoïdes de taureaux BBB lorsque la teneur en omega3 (ALA) augmente dans le régime. Ces modifications dans le profil en acides gras sont rendues possibles grâce au bon métabolisme de bioconversion de l'acide ALA dans les taureaux et au bon transfert vers les spermatozoïdes. En revanche, les antioxydants et les oligoéléments ajoutés à un régime enrichi en omega3, tendent à diminuer l'augmentation des proportions en DHA dans les spermatozoïdes de BBB. On ne constate aucun effet régime sur la proportion en AA dans les spermatozoïdes de BBB.

Même si les résultats ne sont pas significatifs d'un point de vue statistique, il semblerait que le régime enrichi en omega3 et celui enrichi en antioxydants diminueraient légèrement les proportions de SFA et de MUFA. A contrario, une légère augmentation des proportions en PUFA et XFA serait observée. Malheureusement, il est impossible de tirer des conclusions étant donné que l'effet saison est très marqué sur les proportions des différentes classes d'acides gras.

Les 5 régimes testés dans ce mémoire n'auraient eu aucun effet sur la mobilité après décongélation des spermatozoïdes de taureaux BBB. En revanche, le régime enrichi uniquement en antioxydants améliorerait la mobilité progressive après décongélation. Cependant, on a pu constater que l'ajout simultané d'omega3 et d'oligoéléments dans un régime enrichi en antioxydants, contrecarrerait l'effet positif apporté par les antioxydants

seuls, au niveau de la mobilité progressive. De plus, aucun effet des proportions en DHA, en AA et celles des différentes classes d'acides gras n'a pu être observé sur la qualité des spermatozoïdes après décongélation (mobilité et mobilité progressive).

Même si pour certaines constatations, aucune différence statistique n'a pu être mentionnée, certaines différences biologiques ont pu être visuellement constatées. Dès lors, d'autres études sont nécessaires afin d'augmenter la puissance statistique des tests réalisés. Il convient de mettre au point un design expérimental plus robuste (carré latin) dans lequel chaque animal devient son propre contrôle et où l'effet saison est annulé, ceci afin d'éviter l'interférence entre l'effet saison et l'effet régime. De plus, augmenter le nombre de taureaux par régime permettrait également d'augmenter la puissance statistique. Par conséquent, d'autres investigations sont nécessaires afin d'objectiver l'impact de l'alimentation des taureaux sur la qualité des spermatozoïdes de BBB.

Bibliographie

- Agarwal, A., Prabakaran, S. A., & Said, T. M. (2005). Prevention of oxidative stress injury to sperm. *Journal of Andrology*, 26(6), 654-660. doi:10.2164/jandrol.05016
- Aitken, R-J. (1995). Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. *Reproduction, Fertility and Development*, 7(4), 659-668. doi:10.1071/RD9950659
- Alvarez, J. G., & Storey, B. T. (1995). Differential incorporation of fatty acids into and peroxidative loss of fatty acids from phospholipids of human spermatozoa. *Molecular Reproduction and Development*, 42(3), 334-346. doi:10.1002/mrd.1080420311
- Amann, R. P., Seidel Jr., G. E., & Mortimer, R. G. (2000). Fertilizing potential in vitro of semen from young beef bulls containing a high or low percentage of sperm with a proximal droplet. *Theriogenology*, 54(9), 1499-1515. doi:10.1016/S0093-691X(00)00470-2
- Ansary, M., & Hanset, R. (1979). Anatomical, physiological and biochemical differences between conventional and double-musced cattle in the belgian blue and white breed. *Livestock Production Science*, 6(1), 5-13. doi:10.1016/0301-6226(79)90027-7
- Argov, N., Sklan, D., Zeron, Y., & Roth, Z. (2007). Association between seasonal changes in fatty-acid composition, expression of VLDL receptor and bovine sperm quality. *Theriogenology*, 67(4), 878-885. doi:10.1016/j.theriogenology.2006.10.018
- Argov-Argaman, N., Mahgrefthe, K., Zeron, Y., & Roth, Z. (2013). Variation in lipid profiles within semen compartments-the bovine model of aging. *Theriogenology*, 80(7), 712-721. doi:10.1016/j.theriogenology.2013.05.024
- Aveldano, M. I., Rotstein, N. P., & Vermouth, N. T. (1992). Lipid remodelling during epididymal maturation of rat spermatozoa. enrichment in plasmenylcholines containing long-chain polyenoic fatty acids of the n-9 series. *Biochemical Journal*, 283(1), 235-241. doi:10.1042/bj2830235
- Avella, M. A., Xiong, B., & Dean, J. (2013). The molecular basis of gamete recognition in mice and humans. *Molecular Human Reproduction*, 19(5), 279-289. doi:10.1093/molehr/gat004
- Awano, M., Kawaguchi, A., & Mohri, H. (1993). Lipid composition of hamster epididymal spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, 99(2), 375-383. doi:10.1530/jrf.0.0990375

- Bailey, J. L., Bilodeau, J. -, & Cormier, N. (2000). Minireview: Semen cryopreservation in domestic animals: A damaging and capacitating phenomenon. *Journal of Andrology*, 21(1), 1-7. Retrieved from www.scopus.com
- Bansal, A. K., & Bilaspuri, G. S. (2008). Oxidative stress alters membrane sulfhydryl status, lipid and phospholipid contents of crossbred cattle bull spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 104(2-4), 398-404. doi:10.1016/j.anireprosci.2007.06.017
- Bauchart, D. (1993). Lipid absorption and transport in ruminants. *Journal of Dairy Science*, 76(12), 3864-3881. doi:10.3168/jds.S0022-0302(93)77728-0
- Bauman, D. E., & Griinari, J. M. (2003). *Nutritional regulation of milk fat synthesis* doi:10.1146/annurev.nutr.23.011702.073408 Retrieved from www.scopus.com
- Baumber, J., Ball, B. A., Gravance, C. G., Medina, V., & Davies-Morel, M. C. G. (2000). The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential, and membrane lipid peroxidation. *Journal of Andrology*, 21(6), 895-902. Retrieved from www.scopus.com
- Beam, T. M., Jenkins, T. C., Moate, P. J., Kohn, R. A., & Palmquist, D. L. (2000). Effects of amount and source of fat on the rates of lipolysis and biohydrogenation of fatty acids in ruminal contents. *Journal of Dairy Science*, 83(11), 2564-2573. doi:10.3168/jds.S0022-0302(00)75149-6
- Bedford, J. M. (2008). Puzzles of mammalian fertilization - and beyond. *International Journal of Developmental Biology*, 52(5-6), 415-426. doi:10.1387/ijdb.072551jb
- Bilodeau, J., Blanchette, S., Gagnon, C., & Sirard, M. -. (2001). Thiols prevent H₂O₂-mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. *Theriogenology*, 56(2), 275-286. doi:10.1016/S0093-691X(01)00562-3
- Bilodeau, J., Chatterjee, S., Sirard, M. -, & Gagnon, C. (2000). Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. *Molecular Reproduction and Development*, 55(3), 282-288. doi:10.1002/(SICI)1098-2795(200003)55:3<282::AID-MRD6>3.0.CO;2-7
- Blesbois, E., Lessire, M., Grasseau, I., Hallouis, J. M., & Hermier, D. (1997). Effect of dietary fat on the fatty acid composition and fertilizing ability of fowl semen. *Biology of Reproduction*, 56(5), 1216-1220. doi:10.1095/biolreprod56.5.1216
- Bonnes, G., Desclaude, J., Drogoul, C., Gadoud, R., Jussiau, R., Le Loc'h, A., Montméas, L., Robin, G. (2011). *Reproduction des animaux d'élevage*. 2ème éd. Dijon : Éducagri. 407p

- Bromfield, E. G., & Nixon, B. (2013). The function of chaperone proteins in the assemblage of protein complexes involved in gamete adhesion and fusion processes. *Reproduction*, 145(2), R31-R42. doi:10.1530/REP-12-0316
- Brouwers, J. F. H. M., & Gadella, B. M. (2003). In situ detection and localization of lipid peroxidation in individual bovine sperm cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 35(11), 1382-1391. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2003.08.010
- Buccioni, A., Decandia, M., Minieri, S., Molle, G., & Cabiddu, A. (2012). Lipid metabolism in the rumen: New insights on lipolysis and biohydrogenation with an emphasis on the role of endogenous plant factors. *Animal Feed Science and Technology*, 174(1-2), 1-25. doi:10.1016/j.anifeedsci.2012.02.009
- Carroll, E. J., & Ball, L. (1970). Testicular changes as affected by mating systems in beef cattle. *American Journal of Veterinary Research*, 31(2), 241-254. Retrieved from www.scopus.com
- Castellano, C. -, Audet, I., Bailey, J. L., Chouinard, P. Y., Laforest, J. -, & Matte, J. J. (2010). Effect of dietary n-3 fatty acids (fish oils) on boar reproduction and semen quality. *Journal of Animal Science*, 88(7), 2346-2355. doi:10.2527/jas.2009-2779
- Cheng, Y-C., & Mruk, D. D. (2012). The blood-testis barrier and its implications for male contraception. *Pharmacological Reviews*, 64(1), 16-64. doi:10.1124/pr.110.002790
- Coy, P., García-Vázquez, F. A., Visconti, P. E., & Avilés, M. (2012). Roles of the oviduct in mammalian fertilization. *Reproduction*, 144(6), 649-660. doi:10.1530/REP-12-0279
- Debie, C. (2015). Cours de Toxicologie humaine et environnementale. LBRT2201
- Doreau, M., & Ferlay, A. (1994). Digestion and utilisation of fatty acids by ruminants. *Animal Feed Science and Technology*, 45(3-4), 379-396. doi:10.1016/0377-8401(94)90039-6
- Dudouet, C. (2014). Production des bovins allaitants. 4ème éd. Paris : France Agricole. 485p
- Esmaili, V., Shahverdi, A. H., Alizadeh, A. R., Alipour, H., & Chehraz, M. (2014). Saturated, omega-6 and omega-3 dietary fatty acid effects on the characteristics of fresh, frozen-thawed semen and blood parameters in rams. *Andrologia*, 46(1), 42-49. doi:10.1111/and.12040
- Fair, S., Doyle, D. N., Diskin, M. G., Hennessy, A. A., & Kenny, D. A. (2014). The effect of dietary n-3 polyunsaturated fatty acids supplementation of rams on semen quality and subsequent quality of liquid stored semen. *Theriogenology*, 81(2), 210-219. doi:10.1016/j.theriogenology.2013.09.002

- Fawcett, D. W. (1973). Observations on the organization of the interstitial tissue of the testis and on the occluding cell junctions in the seminiferous epithelium. *Advances in the Biosciences*, 10, 83-99. Retrieved from www.scopus.com
- Ferlay, A., Bernard, L., Meynadier, A., & Malpuech-Brugère, C. (2017). Production of trans and conjugated fatty acids in dairy ruminants and their putative effects on human health: A review. *Biochimie*, 141, 107-120. doi:10.1016/j.biochi.2017.08.006
- França, L. R., Auharek, S. A., Hess, R. A., Dufour, J. M., & Hinton, B. T. (2013). *Blood-tissue barriers morphofunctional and immunological aspects of the blood-testis and blood-epididymal barriers* doi:10.1007/978-1-4614-4711-5_12 Retrieved from www.scopus.com
- Gervasi, M. G., & Visconti, P. E. (2017). Molecular changes and signaling events occurring in spermatozoa during epididymal maturation. *Andrology*, 5(2), 204-218. doi:10.1111/andr.12320
- Gholami, H., Chamani, M., Towhidi, A., & Fazeli, M. H. (2010). Effect of feeding a docosahexaenoic acid-enriched nutraceutical on the quality of fresh and frozen-thawed semen in holstein bulls. *Theriogenology*, 74(9), 1548-1558. doi:10.1016/j.theriogenology.2010.06.025
- Gholami, H., Chamani, M., Towhidi, A., & Fazeli, M. H. (2011). Improvement of semen quality in holstein bulls during heat stress by dietary supplementation of omega-3 fatty acids. *International Journal of Fertility and Sterility*, 4(4), 160-167. Retrieved from www.scopus.com
- Glencross, Brett D. (2009). Exploring the Nutritional Demand for Essential Fatty Acids by Aquaculture Species. *Reviews in Aquaculture* 1 (2): 71–124. doi:10.1111/j.1753-5131.2009.01006.x.
- Gonthier, C., Mustafa, A. F., Berthiaume, R., Petit, H. V., & Ouellet, D. R. (2004). Feeding micronized and extruded flaxseed to dairy cows: Effects on digestion and ruminal biohydrogenation of long-chain fatty acids. *Canadian Journal of Animal Science*, 84(4), 705-711. doi:10.4141/A04-003
- Gürler, H., Calisici, O., Calisici, D., & Bollwein, H. (2015). Effects of feeding omega-3-fatty acids on fatty acid composition and quality of bovine sperm and on antioxidative capacity of bovine seminal plasma. *Animal Reproduction Science*, 160, 97-104. doi:10.1016/j.anireprosci.2015.07.010
- Guthrie, H. D., Liu, J., & Critser, J. K. (2002). Osmotic tolerance limits and effects of cryoprotectants on motility of bovine spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 67(6), 1811-1816. Retrieved from www.scopus.com

- Hall, J. C., Hadley, J., & Doman, T. (1991). Correlation between changes in rat sperm membrane lipids, protein, and the membrane physical state during epididymal maturation. *Journal of Andrology*, 12(1), 76-87. doi:10.1002/j.1939-4640.1991.tb00220.x
- Hanset, R. (2000). Circonférence scrotale, facteurs de variation, indexation des taureaux. Publication Herd-Book BBB. p 11 -6
- Hanset, R. (2006). Un défi permanent. Concilier sélection et faible consanguinité, Le Sillon Belge. 3208 : 10–4
- Hanset, R. de Tillesse, S. Michaux, P. André, E. (2003). La consanguinité en Blanc-Bleu Belge. Sa genèse et son contrôle. Herd-Book du BBB n8. p3–36
- Harvatine, K. J., Boisclair, Y. R., & Bauman, D. E. (2009). Recent advances in the regulation of milk fat synthesis. *Animal*, 3(1), 40-54. doi:10.1017/S1751731108003133
- Hyttel, P., Sinowatz, F., Vejlsted, M. (2010). Domestic animal embryology. Saunders/Elsevier. 455p
- Hoflack, G., Opsomer, G., Rijsselaere, T., Van Soom, A., Maes, D., De Kruif, A., & Duchateau, L. (2007). Comparison of computer-assisted sperm motility analysis parameters in semen from belgian blue and holstein-friesian bulls. *Reproduction in Domestic Animals*, 42(2), 153-161. doi:10.1111/j.1439-0531.2006.00745.x
- Hoflack, G., Opsomer, G., Van Soom, A., Maes, D., de Kruif, A., & Duchateau, L. (2006a). Comparison of sperm quality of belgian blue and holstein friesian bulls. *Theriogenology*, 66(8), 1834-1846. doi:10.1016/j.theriogenology.2006.05.007
- Hoflack, G., Van den Broeck, W., Maes, D., Van Damme, K., Opsomer, G., Duchateau, L., . . . Van Soom, A. (2008). Testicular dysfunction is responsible for low sperm quality in belgian blue bulls. *Theriogenology*, 69(3), 323-332. doi:10.1016/j.theriogenology.2007.09.034
- Hoflack, G., Van Soom, A., Maes, D., de Kruif, A., Opsomer, G., & Duchateau, L. (2006b). Breeding soundness and libido examination of belgian blue and holstein friesian artificial insemination bulls in belgium and the netherlands. *Theriogenology*, 66(2), 207-216. doi:10.1016/j.theriogenology.2005.11.003
- Holt, W. V. (2011). Mechanisms of sperm storage in the female reproductive tract: An interspecies comparison. *Reproduction in Domestic Animals*, 46(SUPPL. 2), 68-74. doi:10.1111/j.1439-0531.2011.01862.x
- Hueston, W. D., Monke, D. R., & Milburn, R. J. (1988). Scrotal circumference measurements on young holstein bulls. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 192(6), 766-768. Retrieved from www.scopus.com

- Kelso, K. A., Redpath, A., Noble, R. C., & Speake, B. K. (1997). Lipid and antioxidant changes in spermatozoa and seminal plasma throughout the reproductive period of bulls. *Journal of Reproduction and Fertility*, 109(1), 1-6. Retrieved from www.scopus.com
- Khoshvaght, A., Towhidi, A., Zare-shahneh, A., Noruozi, M., Zhandi, M., Dadashpour Davachi, N., & Karimi, R. (2016). Dietary n-3 PUFAs improve fresh and post-thaw semen quality in holstein bulls via alteration of sperm fatty acid composition. *Theriogenology*, 85(5), 807-812. doi:10.1016/j.theriogenology.2015.10.023
- Kim, E., Yamashita, M., Kimura, M., Honda, A., Kashiwabara, S. -, & Baba, T. (2008). Sperm penetration through cumulus mass and zona pellucida. *International Journal of Developmental Biology*, 52(5-6), 677-682. doi:10.1387/ijdb.072528ek
- Kishino, S., Ogawa, J., Ando, A., & Shimizu, S. (2003). Conjugated α -linolenic acid production from α -linolenic acid by lactobacillus plantarum AKU 1009a. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 105(10), 572-577. doi:10.1002/ejlt.200300806
- Kolev, S.I. (2000). Vitality and acrosomal integrity of buffalo spermatozoa frozen in straws using different rates of thawing. *Bulgarian Journal of agriculture Science*: 6 (4). 477-480
- Lewis, S. E. M., & Aitken, R. J. (2005). DNA damage to spermatozoa has impacts on fertilization and pregnancy. *Cell and Tissue Research*, 322(1), 33-41. doi:10.1007/s00441-005-1097-5
- Loor, J. J., Ferlay, A., Ollier, A., Doreau, M., & Chilliard, Y. (2005). Relationship among trans and conjugated fatty acids and bovine milk fat yield due to dietary concentrate and linseed oil. *Journal of Dairy Science*, 88(2), 726-740. doi:10.3168/jds.S0022-0302(05)72736-3
- Loor, J. J., Ueda, K., Ferlay, A., Chilliard, Y., & Doreau, M. (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. *Journal of Dairy Science*, 87(8), 2472-2485. doi:10.3168/jds.S0022-0302(04)73372-X
- Martínez-Soto, J. C., Landeras, J., & Gadea, J. (2013). Spermatozoa and seminal plasma fatty acids as predictors of cryopreservation success. *Andrology*, 1(3), 365-375. Retrieved from www.scopus.com
- Medeiros, C. M. O., Forell, F., Oliveira, A. T. D., & Rodrigues, J. L. (2002). Current status of sperm cryopreservation: Why isn't it better? *Theriogenology*, 57(1), 327-344. doi:10.1016/S0093-691X(01)00674-4
- Moallem, U., Neta, N., Zeron, Y., Zachut, M., & Roth, Z. (2015). Dietary α -linolenic acid from flaxseed oil or eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids from fish oil differentially alter

- fatty acid composition and characteristics of fresh and frozen-thawed bull semen. *Theriogenology*, 83(7), 1110-1120. doi:10.1016/j.theriogenology.2014.12.008
- Murphy, C., Holden, S. A., Murphy, E. M., Cromie, A. R., Lonergan, P., & Fair, S. (2016). The impact of storage temperature and sperm number on the fertility of liquid-stored bull semen. *Reproduction, Fertility and Development*, 28(9), 1349-1359. doi:10.1071/RD14369
- Murray RK, Mayes PA, Granner DK, Rodwell WR. (1999). Harper's Biochemistry. 24th éd, London.
- Nikolopoulou, M., Soucek, D. A., & Vary, J. C. (1985). Changes in the lipid content of boar sperm plasma membranes during epididymal maturation. *BBA - Biomembranes*, 815(3), 486-498. doi:10.1016/0005-2736(85)90377-3
- Nixon, B., Aitken, R. J., & McLaughlin, E. A. (2007). New insights into the molecular mechanisms of sperm-egg interaction. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64(14), 1805-1823. doi:10.1007/s00018-007-6552-x
- Ollero, M., Powers, R. D., & Alvarez, J. G. (2000). Variation of docosahexaenoic acid content in subsets of human spermatozoa at different stages of maturation: Implications for sperm lipoperoxidative damage. *Molecular Reproduction and Development*, 55(3), 326-334. doi:10.1002/(SICI)1098-2795(200003)55:3<326::AID-MRD11>3.0.CO;2-A
- Park, K., Kim, B., Kang, J., Nam, T., Lim, J. M., Kim, H. T., . . . Kim, U. -. (2011). Ca²⁺ signaling tools acquired from prostasomes are required for progesterone-induced sperm motility. *Science Signaling*, 4(173) doi:10.1126/scisignal.2001595
- Parks, J. E., & Graham, J. K. (1992). Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*, 38(2), 209-222. doi:10.1016/0093-691X(92)90231-F
- Parks, J. E., & Hammerstedt, R. H. (1985). Development changes occurring in the lipids of ram epididymal spermatozoa plasma membrane. *Biology of Reproduction*, 32(3), 653-668. doi:10.1095/biolreprod32.3.653
- Peris, S. I., Bilodeau, J. -, Dufour, M., & Bailey, J. L. (2007). Impact of cryopreservation and reactive oxygen species on DNA integrity, lipid peroxidation, and functional parameters in ram sperm. *Molecular Reproduction and Development*, 74(7), 878-892. doi:10.1002/mrd.20686
- Rana, A. P. S., Majumder, G. C., Misra, S., & Ghosh, A. (1991). Lipid changes of goat sperm plasma membrane during epididymal maturation. *BBA - Biomembranes*, 1061(2), 185-196. doi:10.1016/0005-2736(91)90284-F

Rejraji, H., & Drevet, J. R. (2004). Apocrine secretions in the male genital tract: Putative roles in sperm maturation. *Andrologie*, 14(1), 22-33. Retrieved from www.scopus.com

Rejraji, H., Saez, F., & Drevet, J. -. (2009). Changes in spermatozoa plasma membrane lipid composition during epididymal maturation. *Andrologie*, 19(1), 17-28. doi:10.1007/s12610-008-0006-7

Rejraji, H., Sion, B., Prensier, G., Carreras, M., Motta, C., Frenoux, J. -, . . . Drevet, J. R. (2006). Lipid remodeling of murine epididymosomes and spermatozoa during epididymal maturation. *Biology of Reproduction*, 74(6), 1104-1113. doi:10.1095/biolreprod.105.049304

Saez, F., Frenette, G., & Sullivan, R. (2003). Epididymosomes and prostasomes: Their roles in posttesticular maturation of the sperm cells. *Journal of Andrology*, 24(2), 149-154. doi:10.1002/j.1939-4640.2003.tb02653.x

Saint-Dizier, M. Chastant-Maillard, S. (2014). La reproduction animale et humaine. Versailles : Quae. 750p

Sariözkán, S., Bucak, M. N., Tuncer, P. B., Ulutaş, P. A., & Bilgen, A. (2009). The influence of cysteine and taurine on microscopic-oxidative stress parameters and fertilizing ability of bull semen following cryopreservation. *Cryobiology*, 58(2), 134-138. doi:10.1016/j.cryobiol.2008.11.006

Scollan, N. D., Dhanoa, M. S., Choi, N. J., Maeng, W. J., Enser, M., & Wood, J. D. (2001). Biohydrogenation and digestion of long chain fatty acids in steers fed on different sources of lipid. *Journal of Agricultural Science*, 136(3), 345-355. doi:10.1017/S0021859601008796

Sellem, E., Broekhuijse, M. L. W. J., Chevrier, L., Camugli, S., Schmitt, E., Schibler, L., & Koenen, E. P. C. (2015). Use of combinations of in vitro quality assessments to predict fertility of bovine semen. *Theriogenology*, 84(9), 1447-1454.e5. doi:10.1016/j.theriogenology.2015.07.035

Shechter, E. (2000). Fluidité membranaire. In: Schechter E, Rossignol B (eds) Biochimie et biophysique des membranes. Aspects structuraux et fonctionnels. Masson, Paris, pp. 97–121

Shingfield, K. J., & Wallace, R. J. (2014). *Synthesis of conjugated linoleic acid in ruminants and humans* Retrieved from www.scopus.com

Sun, T. T., Chung, C. M., & Chan, H. C. (2011). Acrosome reaction in the cumulus oophorus revisited: Involvement of a novel sperm-released factor NYD-SP8. *Protein and Cell*, 2(2), 92-98. doi:10.1007/s13238-011-1022-5

Thibault, C. (2001). La fécondation, In : La reproduction chez les mammifères et l'homme, Editions Ellipses, Inra éditions, p 367-389

Toullec, R., & Lallès J.P. (1995). Digestion dans la caillette et l'intestin grêle. Paris: Journet. p527-581.

Travert, C., Carreau, S., & Galeraud-Denis, I. (2009). In vitro capacitation. [La capacitation in vitro] *Gynecologie Obstetrique Et Fertilité*, 37(6), 523-528. doi:10.1016/j.gyobfe.2009.04.004

Wathes, D. C., Abayasekara, D. R. E., & Aitken, R. J. (2007). Polyunsaturated fatty acids in male and female reproduction. *Biology of Reproduction*, 77(2), 190-201. doi:10.1095/biolreprod.107.060558

Watson, P. F. (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, 60-61, 481-492. doi:10.1016/S0378-4320(00)00099-3

Williams, C. M. (2000). Dietary fatty acids and human health. *Animal Research*, 49(3), 165-180. Retrieved from www.scopus.com

Witte, T. S., & Schäfer-Somi, S. (2007). Involvement of cholesterol, calcium and progesterone in the induction of capacitation and acrosome reaction of mammalian spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 102(3-4), 181-193. doi:10.1016/j.anireprosci.2007.07.007

Annexes

Annexe 1 : Profils en acides gras des spermatozoïdes provenant des taureaux BBB après avoir suivi le premier régime (P1).

ALA = acide alpha-linolénique, EPA = acide eicosapentaénoïque, DHA = acide docosahexaénoïque, LA = acide linoléique, AA = acide arachidonique, DPA = acide docosapentaénoïque

	Régime contrôle												Régime contrôle												Régime contrôle											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	22	23	24	26	27	28	29	30	31							
Acides gras																																				
C10:0	0,03	0,05	0,04	0,05	0,03	0,04	0,03	0,06	0,03	0,04	0,03	0,04	0,04	0,03	0,05	0,06	0,03	0,02	0,05	0,04	0,03	0,02	0,02	0,02	0,03	0,04	0,02	0,02	0,03							
C12:0	0,13	0,17	0,11	0,16	0,15	0,11	0,08	0,24	0,15	0,14	0,15	0,19	0,17	0,08	0,12	0,18	0,18	0,15	0,19	0,14	0,14	0,10	0,11	0,10	0,11	0,15	0,13	0,16	0,16							
C13:0	0,05	0,06	0,03	0,05	0,05	0,05	0,03	0,06	0,05	0,05	0,04	0,05	0,06	0,03	0,04	0,06	0,06	0,04	0,05	0,04	0,04	0,04	0,05	0,03	0,03	0,04	0,05	0,05	0,04							
C14:0	8,35	10,36	8,40	9,97	8,07	8,86	5,11	9,91	9,54	10,19	7,35	7,89	11,57	5,22	6,71	8,59	10,00	7,81	5,30	8,45	9,09	8,31	9,58	4,74	6,98	8,43	10,17	8,37	7,61							
C15:0	0,08	0,10	0,09	0,07	0,08	0,12	0,08	0,09	0,08	0,11	0,10	0,09	0,09	0,10	0,09	0,11	0,09	0,07	0,12	0,12	0,08	0,11	0,09	0,07	0,09	0,09	0,11	0,10	0,08							
X	21,84	21,99	22,90	22,55	21,29	23,39	23,66	22,18	24,79	22,76	22,41	21,96	25,59	23,35	22,07	22,20	21,94	23,38	22,93	20,24	21,05	22,15	21,37	23,62	22,67	22,34	22,21	23,54	22,18							
C16:0	12,31	11,92	11,60	10,48	13,58	11,65	12,10	11,63	9,06	11,22	12,75	13,64	11,00	12,25	11,85	13,45	10,83	10,18	12,62	13,99	13,79	12,56	11,57	13,17	13,08	11,47	11,20	10,53	12,49							
C16:1n9	0,15	0,14	0,10	0,12	0,14	0,12	0,19	0,14	0,15	0,15	0,14	0,14	0,14	0,15	0,13	0,17	0,15	0,17	0,14	0,09	0,12	0,10	0,07	0,14	0,14	0,13	0,10	0,20	0,16							
C17:0	0,14	0,07	0,10	0,08	0,16	0,16	0,12	0,10	0,06	0,09	0,12	0,15	0,07	0,10	0,17	0,12	0,16	0,10	0,14	0,16	0,12	0,12	0,16	0,14	0,12	0,12	0,15	0,11	0,13							
C18:0	4,71	5,45	5,10	4,44	5,55	4,73	4,98	5,70	4,10	4,43	5,34	4,99	4,85	5,03	5,49	5,65	5,52	4,77	5,18	5,19	4,88	5,49	5,10	4,82	5,26	5,02	4,80	4,39	4,84							
C18:1n9	1,81	1,27	0,99	1,06	1,50	1,07	1,19	1,19	1,08	1,53	1,33	1,43	1,02	1,59	1,26	1,47	1,27	1,36	1,22	1,76	1,81	1,38	0,98	1,33	1,19	1,51	1,25	1,22	1,37							
C18:1n11	1,62	1,39	1,41	1,36	1,56	1,25	1,75	1,45	1,54	1,55	1,86	1,58	1,27	1,59	1,62	1,59	1,54	1,69	1,46	1,43	1,55	1,69	1,33	1,71	1,27	1,64	1,30	1,47	1,35							
C18:2n9c12 (LA)	2,87	2,08	2,30	2,57	2,80	2,25	3,23	2,56	2,42	2,34	2,85	2,75	2,68	2,93	3,19	2,43	2,97	2,64	3,09	2,83	2,25	3,00	2,45	3,09	2,46	2,66	2,18	2,61	2,96							
C20:0	0,10	0,11	0,10	0,14	0,16	0,09	0,08	0,15	0,12	0,13	0,09	0,12	0,12	0,12	0,18	0,16	0,15	0,10	0,16	0,12	0,11	0,13	0,11	0,15	0,11	0,12	0,12	0,10	0,15							
C20:1n11	0,05	0,07	0,04	0,05	0,06	0,05	0,05	0,06	0,04	0,06	0,06	0,04	0,06	0,08	0,05	0,05	0,06	0,08	0,05	0,06	0,06	0,07	0,05	0,05	0,06	0,07	0,06	0,06	0,08							
C18:3n9c12,c15 (ALA)	0,05	0,05	0,05	0,07	0,05	0,07	0,05	0,06	0,06	0,06	0,06	0,04	0,07	0,07	0,08	0,06	0,07	0,05	0,05	0,07	0,04	0,05	0,06	0,06	0,05	0,03	0,04	0,06	0,05							
C20:2n11,c14	0,19	0,10	0,23	0,22	0,21	0,24	0,22	0,18	0,11	0,13	0,20	0,23	0,17	0,23	0,29	0,17	0,27	0,15	0,29	0,35	0,17	0,27	0,30	0,18	0,28	0,23	0,22	0,19	0,26							
C22:0	0,04	0,04	0,04	0,03	0,00	0,03	0,05	0,03	0,04	0,04	0,04	0,04	0,05	0,04	0,03	0,02	0,03	0,04	0,03	0,05	0,04	0,04	0,06	0,07	0,05	0,07	0,04	0,04	0,05							
C20:3n8c11,c14	0,61	0,45	0,66	0,38	0,41	0,42	0,42	0,41	0,39	0,49	0,48	0,58	0,38	0,53	0,61	0,61	0,49	0,41	0,52	0,66	0,55	0,49	0,35	0,41	0,40	0,47	0,44	0,61	0,43							
C22:1n13	0,07	0,07	0,01	0,02	0,00	0,00	0,05	0,20	0,02	0,02	0,02	0,02	0,13	0,10	0,03	0,03	0,04	0,03	0,06	0,04	0,02	0,03	0,03	0,03	0,04	0,04	0,02	0,03	0,03							
C20:3c11,c14,c17	0,03	0,00	0,04	0,04	0,02	0,07	0,04	0,03	0,02	0,02	0,03	0,03	0,02	0,02	0,06	0,02	0,06	0,02	0,05	0,07	0,02	0,03	0,07	0,03	0,02	0,02	0,03	0,04	0,03							
C20:4n5c8c11,c14 (AA)	3,28	2,46	2,94	2,40	2,53	2,62	3,04	2,96	2,64	2,75	3,28	3,18	3,19	3,28	3,20	3,08	3,06	3,32	3,17	2,81	2,65	2,98	2,56	2,81	2,87	3,28	2,61	3,20	2,75							
C20:5n5,c8c11,c14,c17 (EPA)	0,01	0,00	0,02	0,00	0,02	0,00	0,01	0,00	0,01	0,01	0,02	0,01	0,00	0,00	0,02	0,00	0,00	0,01	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00	0,01	0,02							
C22:4c7,c10,c13,c16	0,33	0,35	0,34	0,41	0,29	0,32	0,32	0,36	0,42	0,42	0,33	0,41	0,68	0,36	0,38	0,29	0,36	0,33	0,40	0,44	0,32	0,30	0,41	0,28	0,47	0,41	0,37	0,28	0,36							
C22:5n4,c7,c10,c13,c16 (DPA)n-6	3,78	5,42	2,90	4,44	2,94	3,42	3,22	4,52	6,04	4,35	3,58	4,07	4,02	4,54	3,47	2,62	2,63	4,31	3,35	3,41	2,63	2,91	4,18	2,86	5,65	3,82	3,50	4,88	4,22							
C22:5n7,c10,c13,c16,c19 (DPA) n-3	0,57	0,50	0,45	0,57	0,57	0,56	0,58	0,54	0,58	0,52	0,55	0,43	0,77	0,49	0,72	0,69	0,63	0,51	0,84	0,99	0,69	0,53	0,58	0,51	0,57	0,62	0,65	0,51	0,58							
C22:6n4,c7,c10,c13,c16,c19 (DHA)	36,73	35,26	38,90	38,18	37,71	38,21	39,16	35,16	36,34	36,27	36,67	35,77	31,68	37,57	38,05	36,08	37,36	38,17	38,39	36,31	37,64	36,97	38,23	39,50	35,89	37,06	38,18	37,13	37,53							
c24:5n9,c12,c15,c18,c21	0,05	0,05	0,04	0,06	0,05	0,13	0,07	0,03	0,06	0,06	0,05	0,04	0,06	0,06	0,05	0,06	0,04	0,04	0,06	0,07	0,05	0,04	0,07	0,05	0,04	0,05	0,05	0,04	0,04							
c24:6n6,c9,c12,c15,c18,c21	0,00	0,00	0,06	0,07	0,00	0,00	0,08	0,00	0,07	0,07	0,06	0,08	0,06	0,06	0,00	0,00	0,02	0,07	0,08	0,06	0,05	0,05	0,06	0,02	0,07	0,07	0,00	0,05	0,00							

Annexe 2 : Profils en acides gras des spermatozoïdes provenant des taureaux Holstein après avoir suivi le premier régime (P1)

ALA = acide alpha-linolénique, EPA = acide eicosapentaénoïque, DHA = acide docosahexaénoïque, LA = acide linoléique, AA = acide arachidonique, DPA = acide docosapentaénoïque

	R. contrôle	Régime contrôle					Régime contrôle		
Acides gras	35	36	37	38	39	40	41	42	
C10:0	0,02	0,03	0,02	0,03	0,03	0,07	0,02	0,02	
C12:0	0,16	0,10	0,08	0,19	0,15	0,17	0,12	0,12	
C13:0	0,04	0,03	0,02	0,05	0,05	0,06	0,03	0,04	
C14:0	7,21	5,26	3,86	8,85	9,90	7,52	6,87	7,23	
C15:0	0,08	0,06	0,05	0,11	0,13	0,08	0,07	0,08	
X	23,69	24,74	25,93	21,91	22,04	22,56	22,53	23,55	
C16:0	11,10	10,61	9,64	14,15	12,25	12,34	11,22	9,46	
C16:1cis9	0,15	0,14	0,11	0,20	0,15	0,13	0,17	0,14	
C17:0	0,16	0,11	0,13	0,13	0,17	0,17	0,21	0,10	
C18:0	5,27	4,31	4,57	4,67	4,65	5,34	5,18	3,91	
C18:1cis9	1,38	1,20	1,03	2,46	1,43	1,10	1,26	1,21	
C18:1cis11	1,33	1,25	1,25	1,46	1,32	1,39	1,43	1,28	
C18:2c9c12 (LA)	1,86	2,29	2,42	2,09	2,08	2,23	2,20	2,03	
C20:0	0,14	0,10	0,14	0,12	0,11	0,28	0,12	0,08	
C20:1c11	0,10	0,06	0,07	0,09	0,07	0,06	0,07	0,06	
C18:3c9,c12,c15 (ALA)	0,05	0,06	0,04	0,05	0,04	0,05	0,04	0,05	
C20:2c11,c14	0,20	0,13	0,18	0,13	0,13	0,25	0,26	0,12	
C22:0	0,00	0,04	0,05	0,04	0,04	0,03	0,05	0,06	
C20:3c8,c11,c14	0,34	0,50	0,41	0,77	0,40	0,35	0,43	0,36	
C22:1c13	0,04	0,04	0,03	0,04	0,03	0,08	0,03	0,02	
C20:3c11,c14,c17	0,03	0,02	0,02	0,02	0,02	0,03	0,03	0,00	
C20:4c5,c8,c11,c14 (AA)	2,71	2,56	2,69	2,65	2,38	2,63	2,89	2,64	
C20:5c5,c8,c11,c14,c17 (EPA)	0,00	0,03	0,00	0,02	0,00	0,00	0,00	0,01	
C22:4c7,c10,c13,c16	0,64	0,38	0,70	0,23	0,39	0,31	0,58	1,83	
C22:5c4,c7,c10,c13,c16 (DPA) n-6	9,17	3,47	14,16	1,41	6,99	5,22	12,22	15,57	
C22:5c7,c10,c13,c16,c19 (DPA) n-3	0,59	0,62	0,74	0,49	0,51	0,98	0,71	0,85	
C22:6c4,c7,c10,c13,c16,c19 (DHA)	33,47	41,76	31,52	37,59	34,51	36,52	31,17	29,09	
c24:5c9,c12,c15,c18,c21	0,04	0,07	0,05	0,05	0,05	0,03	0,07	0,05	
c24:6c6,c9,c12,c15,c18,c21	0,02	0,04	0,07	0,02	0,00	0,00	0,06	0,03	

Annexe 3 : Profils en acides gras des spermatozoïdes provenant des taureaux BBB après avoir suivi le deuxième régime (P3).

Acides gras	Régime oméga3						Régime antioxydants						Régime oligoéléments						Régime contrôle						Régime all-in					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	22	23	24	26	27	28	29	30	31	
C10:0	0.02	0.06	0.01	0.02	0.02	0.04	0.02	0.03	0.02	0.02	0.05	0.02	0.02	0.04	0.03	0.03	0.03	0.03	0.04	0.04	0.05	0.03	0.02	0.05	0.06	0.03	0.07	0.01	0.01	
C12:0	0.14	0.23	0.11	0.10	0.15	0.15	0.11	0.22	0.18	0.15	0.15	0.15	0.13	0.14	0.22	0.17	0.23	0.24	0.21	0.17	0.22	0.11	0.14	0.22	0.20	0.15	0.25	0.12	0.09	
C13:0	0.05	0.10	0.04	0.04	0.05	0.08	0.05	0.07	0.07	0.05	0.07	0.05	0.04	0.07	0.07	0.05	0.09	0.07	0.08	0.06	0.07	0.04	0.05	0.10	0.07	0.05	0.11	0.05	0.03	
C14:0	8.04	10.52	8.54	6.50	9.00	8.88	6.29	9.71	9.96	9.96	7.44	7.03	9.40	4.35	11.44	9.28	11.59	8.08	9.19	6.99	9.39	7.94	9.55	5.14	6.63	9.04	9.82	7.30	4.54	
C15:0	0.08	0.10	0.10	0.06	0.10	0.16	0.09	0.08	0.09	0.11	0.10	0.09	0.08	0.12	0.10	0.11	0.11	0.10	0.10	0.11	0.09	0.11	0.09	0.10	0.13	0.09	0.14	0.10	0.09	
X	21.10	21.52	21.07	21.53	20.09	19.30	23.39	22.71	21.41	21.00	19.62	20.57	23.32	21.85	19.12	20.47	18.59	18.11	21.01	19.37	17.70	19.29	19.55	17.74	18.96	22.06	16.46	22.24	19.51	
C16:0	13.02	12.33	12.31	11.76	13.17	14.06	11.56	10.61	10.38	11.87	13.96	13.54	9.88	14.34	12.45	13.98	12.71	13.66	14.07	16.22	14.67	13.07	11.98	16.30	16.83	12.06	16.98	11.23	15.51	
C16:1c16:9	0.14	0.06	0.09	0.11	0.13	0.10	0.19	0.12	0.12	0.15	0.15	0.15	0.12	0.13	0.11	0.16	0.11	0.18	0.11	0.16	0.17	0.14	0.13	0.13	0.18	0.10	0.08	0.14	0.16	
C17:0	0.16	0.06	0.11	0.09	0.17	0.18	0.14	0.12	0.07	0.09	0.14	0.18	0.07	0.11	0.15	0.12	0.15	0.14	0.16	0.18	0.14	0.15	0.18	0.20	0.20	0.12	0.17	0.12	0.19	
C18:0	4.66	6.65	5.12	4.74	5.28	6.19	4.92	5.31	5.30	4.64	6.02	5.39	4.28	6.80	5.87	5.39	5.77	6.44	6.22	6.08	6.29	5.96	5.54	8.63	7.74	5.27	7.91	4.47	5.47	
C18:1c18:7	2.15	1.25	0.94	1.03	1.49	1.33	1.65	1.18	1.23	1.66	1.77	1.46	0.91	1.39	1.36	1.71	1.45	2.31	1.25	2.69	2.34	1.59	1.28	2.47	2.22	1.36	2.33	1.12	1.73	
C18:1c18:11	1.66	1.32	1.39	1.43	1.39	1.12	1.60	1.46	1.49	1.61	1.83	1.55	1.33	1.64	1.28	1.58	1.31	1.84	1.18	1.43	1.60	1.78	1.43	1.88	1.45	1.48	1.45	1.39	1.55	
C18:2c9c12 (LA)	3.60	2.21	2.74	3.07	2.99	2.81	3.16	2.91	2.66	2.72	3.45	3.49	3.10	3.50	2.81	3.13	2.93	3.22	2.80	3.27	2.77	3.63	3.11	3.98	3.69	2.98	3.07	2.90	3.67	
C20:0	0.10	0.28	0.09	0.08	0.11	0.19	0.09	0.15	0.12	0.07	0.13	0.11	0.10	0.18	0.12	0.09	0.13	0.18	0.16	0.12	0.11	0.11	0.12	0.16	0.15	0.12	0.12	0.05	0.06	
C20:1c11	0.05	0.05	0.04	0.04	0.05	0.04	0.04	0.06	0.05	0.05	0.08	0.04	0.05	0.07	0.05	0.05	0.05	0.07	0.05	0.07	0.07	0.08	0.05	0.06	0.08	0.06	0.05	0.05	0.05	
C18:3c9,c12,c15 (ALA)	0.07	0.05	0.05	0.05	0.06	0.06	0.04	0.03	0.04	0.05	0.04	0.03	0.06	0.06	0.04	0.04	0.05	0.04	0.04	0.06	0.04	0.04	0.05	0.05	0.09	0.05	0.06	0.06	0.06	
C20:2c11,c14	0.31	0.11	0.30	0.25	0.35	0.36	0.33	0.23	0.14	0.17	0.27	0.38	0.22	0.28	0.29	0.22	0.36	0.21	0.38	0.42	0.25	0.35	0.43	0.24	0.39	0.28	0.32	0.20	0.43	
C22:0	0.03	0.00	0.05	0.04	0.05	0.00	0.03	0.05	0.05	0.06	0.00	0.04	0.04	0.00	0.00	0.04	0.00	0.05	0.00	0.00	0.06	0.05	0.04	0.00	0.00	0.04	0.00	0.04	0.06	
C20:3c8,c11,c14	0.78	0.39	0.69	0.44	0.45	0.45	0.41	0.42	0.37	0.50	0.49	0.63	0.39	0.53	0.55	0.66	0.51	0.62	0.52	0.99	0.62	0.55	0.37	0.54	0.78	0.42	0.82	0.67	0.81	
C22:1c13	0.03	0.10	0.00	0.03	0.00	0.05	0.04	0.05	0.03	0.03	0.03	0.03	0.04	0.06	0.02	0.03	0.07	0.07	0.09	0.07	0.06	0.06	0.05	0.12	0.09	0.05	0.12	0.05	0.06	
C20:3c11,c14,c17	0.09	0.00	0.09	0.04	0.13	0.10	0.04	0.02	0.00	0.01	0.04	0.04	0.02	0.00	0.03	0.03	0.06	0.00	0.05	0.05	0.00	0.03	0.09	0.00	0.07	0.04	0.05	0.05	0.08	
C20:4c5,c8,c11,c14 (AA)	2.92	2.20	3.40	2.87	2.91	2.75	2.77	2.98	2.91	3.16	3.88	3.94	2.61	3.13	2.83	3.54	3.08	3.75	2.59	2.68	3.13	3.87	3.19	3.84	3.17	2.73	2.92	3.35	3.94	
C20:5c5,c8,c11,c14,c17 (EPA)	0.01	0.00	0.00	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.02	
C22:4c7,c10,c13,c16	0.30	0.34	0.35	0.47	0.31	0.30	0.49	0.58	0.60	0.63	0.47	0.59	0.62	0.48	0.47	0.47	0.42	0.40	0.48	0.60	0.50	0.46	0.57	0.39	0.35	0.34	0.36	0.28	0.36	
C22:5c4,c7,c10,c13,c16 (DPA)n=6	2.18	4.91	2.54	5.33	2.31	2.05	5.56	8.15	10.25	9.11	5.85	7.47	14.32	6.59	4.63	5.25	3.06	4.04	4.81	5.51	4.78	6.26	6.61	4.23	3.35	2.13	2.01	3.89	3.46	
C22:5c7,c10,c13,c16,c19 (DPA) n=3	0.65	0.49	0.47	0.54	0.60	0.63	0.60	0.52	0.52	0.48	0.50	0.42	0.63	0.47	0.68	0.49	0.57	0.54	0.58	0.71	0.66	0.47	0.60	0.43	0.53	0.55	0.66	0.53	0.56	
C22:6c4,c7,c10,c13,c16,c19 (DHA)	37.53	34.66	39.27	39.20	38.53	38.62	36.70	32.16	31.91	31.54	33.47	32.55	28.15	33.67	35.27	32.87	36.57	35.61	33.84	31.92	34.23	33.78	34.70	33.00	32.56	38.33	33.66	39.51	37.47	
C24:5c9,c12,c15,c18,c21	0.05	0.00	0.04	0.04	0.05	0.00	0.03	0.04	0.00	0.02	0.00	0.02	0.02	0.00	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00	0.03	0.00	0.03	0.03	0.00	0.02	0.03	0.00	0.05	0.03	
C24:6c6,c9,c12,c15,c18,c21	0.06	0.00	0.03	0.07	0.05	0.00	0.07	0.04	0.02	0.07	0.00	0.04	0.06	0.00	0.00	0.03	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02	0.06	0.00	0.00	0.02	0.00	0.05	0.02	

ALA = acide alpha-linolénique, EPA = acide eicosapentaénoïque, DHA = acide docosahexaénoïque, LA = acide linoléique, AA = acide arachidonique, DPA = acide docosapentaénoïque

Annexe 4 : Profils en acides gras des spermatozoïdes provenant des taureaux Holstein après avoir suivi le deuxième régime (P3)

ALA = acide alpha-linolénique, EPA = acide eicosapentaénoïque, DHA = acide docosahexaénoïque, LA = acide linoléique, AA = acide arachidonique, DPA = acide docosapentaénoïque

	R. oméga3	Régime contrôle				Régime all-in		
Acides gras	35	36	37	38	39	40	41	42
C10:0	0,03	0,03	0,02	0,03	0,03	0,02	0,04	0,02
C12:0	0,14	0,18	0,14	0,22	0,15	0,15	0,31	0,14
C13:0	0,04	0,05	0,04	0,06	0,06	0,04	0,11	0,04
C14:0	5,27	7,93	6,42	9,24	9,34	8,99	8,86	7,77
C15:0	0,08	0,09	0,07	0,12	0,12	0,08	0,12	0,09
X	22,68	22,60	22,76	20,20	19,71	22,25	16,28	20,81
C16:0	11,89	12,27	11,58	14,20	13,79	12,72	15,92	11,86
C16:1cis9	0,18	0,15	0,13	0,19	0,19	0,13	0,16	0,15
C17:0	0,18	0,15	0,19	0,13	0,15	0,17	0,24	0,15
C18:0	5,56	5,33	5,26	5,16	5,37	4,82	8,59	4,49
C18:1cis9	1,65	1,39	1,16	2,04	1,63	1,08	1,99	1,34
C18:1cis11	1,54	1,52	1,39	1,46	1,53	1,48	1,33	1,33
C18:2c9c12 (LA)	2,92	2,65	2,52	2,24	2,44	2,47	2,34	2,38
C20:0	0,06	0,07	0,09	0,06	0,06	0,10	0,13	0,06
C20:1c11	0,09	0,06	0,06	0,07	0,06	0,06	0,07	0,06
C18:3c9,c12,c15 (ALA)	0,09	0,07	0,06	0,06	0,07	0,07	0,05	0,07
C20:2c11,c14	0,24	0,20	0,22	0,13	0,16	0,22	0,30	0,14
C22:0	0,06	0,02	0,06	0,05	0,04	0,05	0,00	0,05
C20:3c8,c11,c14	0,43	0,55	0,51	0,73	0,49	0,39	0,54	0,47
C22:1c13	0,08	0,06	0,08	0,07	0,06	0,05	0,08	0,03
C20:3c11,c14,c17	0,05	0,03	0,00	0,00	0,00	0,05	0,00	0,00
C20:4c5,c8,c11,c14 (AA)	3,19	2,65	2,86	2,94	2,77	2,43	2,76	2,77
C20:5c5,c8,c11,c14,c17 (EPA)	0,02	0,00	0,01	0,02	0,00	0,02	0,00	0,02
C22:4c7,c10,c13,c16	0,36	0,37	0,39	0,24	0,24	0,24	0,31	0,32
C22:5c4,c7,c10,c13,c16 (DPA) n-6	3,29	2,96	4,91	1,86	2,65	3,51	3,71	4,95
C22:5c7,c10,c13,c16,c19 (DPA) n-3	0,53	0,55	0,64	0,46	0,46	0,56	0,58	0,71
C22:6c4,c7,c10,c13,c16,c19 (DHA)	39,30	38,03	38,34	38,00	38,40	37,84	35,18	39,71
c24:5c9,c12,c15,c18,c21	0,03	0,03	0,05	0,02	0,02	0,04	0,00	0,04
c24:6c6,c9,c12,c15,c18,c21	0,03	0,00	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02

Annexe 5 : Profils en acides gras des spermatozoïdes provenant des taureaux BBB après avoir suivi le troisième régime (P5).

ALA = acide alpha-linolénique, EPA = acide eicosapentaénoïque, DHA = acide docosahexaénoïque, LA = acide linoléique, AA = acide arachidonique, DPA = acide docosapentaénoïque

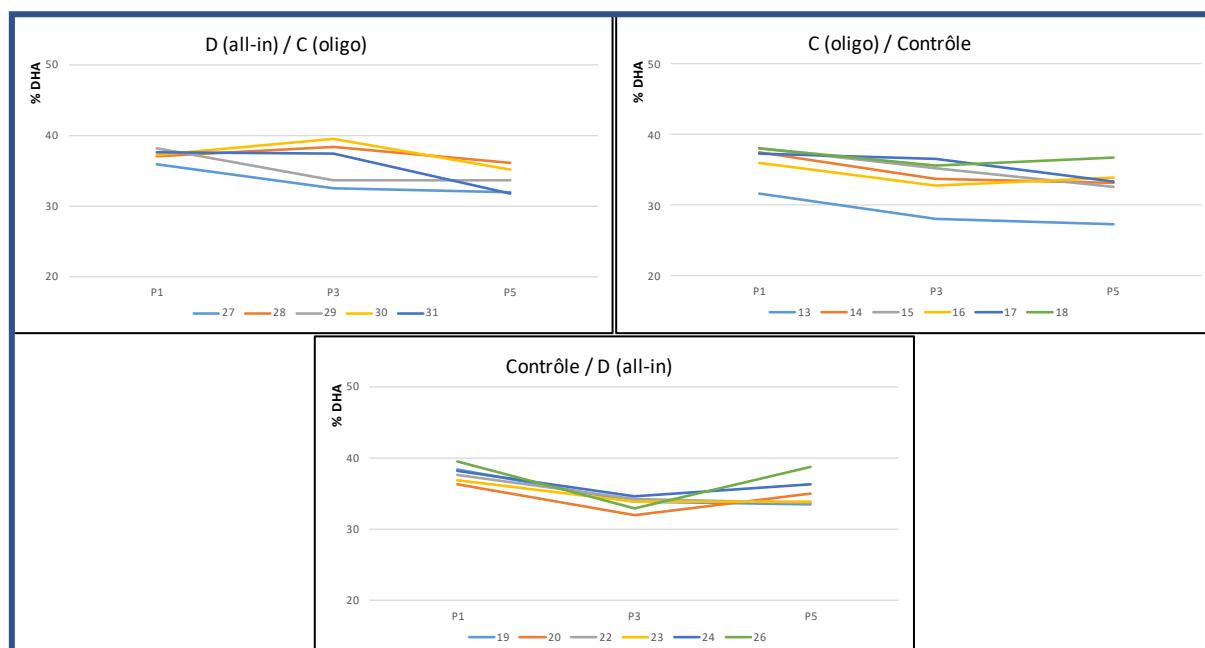
Régime antioxydants						Régime oméga3							Régime contrôle								Régime all-in							Régime oligodélements					
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	22	23	24	26	27	28	29	30	31					
Acides gras																																	
	0.01	0.02	0.07	0.05	0.04	0.04	0.02	0.02	0.03	0.02	0.02	0.01	0.02	0.01	0.02	0.02	0.02	0.02	0.06	0.01	0.03	0.05	0.03	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02				
C10:0	0.14	0.11	0.12	0.09	0.13	0.10	0.10	0.21	0.11	0.14	0.07	0.13	0.15	0.07	0.16	0.17	0.13	0.20	0.21	0.13	0.20	0.24	0.16	0.10	0.12	0.14	0.15	0.13	0.10				
C12:0	0.04	0.04	0.03	0.03	0.04	0.04	0.04	0.04	0.02	0.06	0.03	0.04	0.04	0.03	0.04	0.05	0.05	0.05	0.08	0.04	0.07	0.11	0.07	0.03	0.03	0.04	0.06	0.04	0.03				
C14:0	8.50	7.14	8.81	3.66	9.46	8.69	6.71	10.47	6.36	10.20	7.11	7.27	10.37	4.99	10.75	9.78	9.61	9.61	10.18	7.75	9.20	8.60	10.49	6.24	4.94	9.72	10.72	7.61	5.70				
C15:0	0.10	0.08	0.10	0.05	0.09	0.11	0.09	0.08	0.06	0.10	0.09	0.08	0.08	0.10	0.08	0.11	0.09	0.09	0.10	0.10	0.08	0.12	0.08	0.08	0.09	0.09	0.11	0.09	0.08				
X	22.26	22.81	22.62	24.11	21.36	22.45	23.57	22.73	25.82	22.51	23.77	23.33	23.01	23.69	21.37	21.82	21.76	22.62	20.14	19.95	19.33	20.60	21.66	24.24	22.77	22.58	20.93	24.03	21.00				
C16:0	13.05	11.51	12.19	12.00	12.88	12.63	11.34	10.50	9.16	11.55	11.59	12.76	9.20	11.98	10.78	12.96	11.40	11.01	14.49	14.51	15.92	14.23	10.93	11.07	14.98	11.45	12.38	10.14	14.44				
C16:1c16:9	0.07	0.11	0.06	0.08	0.08	0.07	0.15	0.07	0.12	0.10	0.09	0.07	0.09	0.12	0.08	0.15	0.07	0.13	0.07	0.08	0.12	0.12	0.05	0.12	0.13	0.06	0.06	0.09	0.10				
C17:0	0.17	0.07	0.12	0.10	0.15	0.18	0.13	0.11	0.07	0.09	0.12	0.15	0.07	0.10	0.14	0.12	0.15	0.11	0.20	0.19	0.11	0.13	0.14	0.12	0.13	0.14	0.17	0.14	0.20				
C18:0	4.83	4.76	4.77	4.63	4.44	4.87	4.95	4.95	4.52	5.20	4.51	4.42	4.22	4.94	4.77	4.97	4.88	4.82	6.76	5.07	8.49	7.96	5.18	4.30	5.64	4.93	5.39	4.41	5.62				
C18:1c18:9	0.93	1.06	0.68	0.72	1.28	0.83	0.92	0.71	0.76	1.28	0.89	0.87	0.63	0.93	0.77	1.03	0.88	1.05	0.79	2.03	1.37	0.85	0.55	1.01	0.92	0.91	0.78	0.71	1.05				
C18:2c18:1	1.42	1.53	1.33	1.30	1.45	1.22	1.63	1.42	1.41	1.42	1.69	1.36	1.29	1.55	1.46	1.62	1.41	1.48	1.26	1.37	1.42	1.56	1.23	1.73	1.22	1.39	1.37	1.29	1.48				
C18:2c18:12(LA)	2.67	2.66	2.52	3.34	2.78	2.36	3.66	2.84	2.96	2.65	3.04	2.95	3.03	3.07	2.89	2.65	3.25	2.67	2.83	3.37	2.11	2.94	2.51	3.38	2.45	2.49	2.89	3.01	3.22				
C20:0	0.08	0.09	0.06	0.06	0.07	0.08	0.06	0.09	0.07	0.08	0.07	0.09	0.08	0.09	0.07	0.06	0.10	0.09	0.12	0.07	0.13	0.17	0.15	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	0.11				
C20:1c11	0.04	0.06	0.03	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.05	0.05	0.03	0.04	0.06	0.04	0.04	0.05	0.06	0.03	0.05	0.04	0.05	0.03	0.04	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05				
C18:3c9:c11,c15(ALA)	0.05	0.02	0.03	0.03	0.03	0.03	0.07	0.04	0.06	0.06	0.07	0.05	0.05	0.04	0.04	0.04	0.04	0.03	0.06	0.08	0.04	0.06	0.05	0.03	0.02	0.03	0.04	0.03	0.03				
C20:2c11,c14	0.23	0.10	0.24	0.20	0.24	0.26	0.28	0.23	0.14	0.15	0.24	0.25	0.19	0.23	0.27	0.20	0.32	0.16	0.36	0.41	0.15	0.34	0.32	0.20	0.23	0.27	0.31	0.22	0.37				
C22:0	0.04	0.05	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.05	0.05	0.03	0.04	0.05	0.04	0.04	0.03	0.05	0.05	0.06	0.04	0.03	0.03	0.03	0.05	0.05	0.05	0.04	0.04	0.04				
C20:3c8:c11,c14	0.44	0.45	0.61	0.42	0.41	0.43	0.44	0.44	0.36	0.46	0.36	0.53	0.36	0.52	0.52	0.56	0.46	0.41	0.46	0.85	0.49	0.40	0.31	0.40	0.37	0.36	0.45	0.61	0.50				
C22:1c13	0.03	0.05	0.02	0.03	0.02	0.02	0.04	0.05	0.04	0.05	0.06	0.05	0.08	0.06	0.05	0.05	0.06	0.06	0.10	0.05	0.08	0.16	0.07	0.05	0.07	0.07	0.09	0.07	0.08				
C20:3c11,c14,c17	0.04	0.00	0.03	0.02	0.02	0.03	0.05	0.04	0.03	0.02	0.05	0.04	0.02	0.02	0.03	0.02	0.04	0.02	0.08	0.09	0.00	0.05	0.07	0.03	0.02	0.03	0.03	0.03	0.04				
C20:4c5:c8,c11,c14(AA)	2.76	2.58	3.02	2.70	2.51	2.59	3.14	3.00	2.71	2.88	3.00	3.12	2.69	3.35	3.07	3.42	2.97	2.98	2.67	2.95	2.62	3.05	2.49	3.12	2.52	2.78	2.91	3.15	3.22				
C20:5c5:c8,c11,c14,c17(EPA)	0.00	0.00	0.01	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01				
C22:4c7:c10,c13,c16	0.41	0.58	0.51	0.74	0.40	0.49	0.37	0.40	0.52	0.48	0.31	0.41	0.64	0.53	0.55	0.40	0.59	0.38	0.44	0.49	0.35	0.34	0.49	0.36	0.54	0.43	0.52	0.41	0.58				
C22:5c4:c7,c10,c13,c16(DPA)n=6	6.66	12.00	6.94	13.26	5.67	8.05	3.63	4.75	8.13	5.21	3.65	3.47	15.37	9.67	8.29	5.11	7.53	4.49	4.09	3.99	3.11	3.56	5.89	3.74	9.80	5.11	6.03	7.71	9.28				
C22:5c7:c10,c13,c16,c19(DPA) n=3	0.74	0.47	0.51	0.66	0.63	0.63	0.87	0.85	0.64	0.56	0.64	0.52	0.89	0.64	0.76	0.54	0.67	0.60	0.90	1.10	0.72	0.49	0.71	0.54	0.77	0.62	0.68	0.69	0.76				
C22:6c4:c7,c10,c13,c16,c19(DPAH)	34.23	31.59	34.42	31.51	35.61	33.63	37.34	35.78	35.70	34.53	38.30	37.85	27.25	33.08	32.67	34.00	33.32	36.73	33.52	35.08	33.75	33.83	36.28	38.78	31.94	36.04	33.63	35.06	31.81				
C24c9:c12,c13,c18c21	0.04	0.03	0.04	0.07	0.04	0.05	0.05	0.03	0.04	0.04	0.05	0.04	0.04	0.03	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.03	0.04	0.00	0.03	0.04	0.02	0.04	0.06	0.04	0.06				
C24c6:c9,c12,c13,c18,c21	0.04	0.05	0.07	0.07	0.06	0.05	0.07	0.05	0.08	0.07	0.07	0.07	0.07	0.06	0.25	0.07	0.09	0.06	0.00	0.07	0.00	0.00	0.00	0.08	0.05	0.06	0.06	0.06	0.06				

Annexe 6 : Profils en acides gras des spermatozoïdes provenant des taureaux Holstein après avoir suivi le troisième régime (P5)

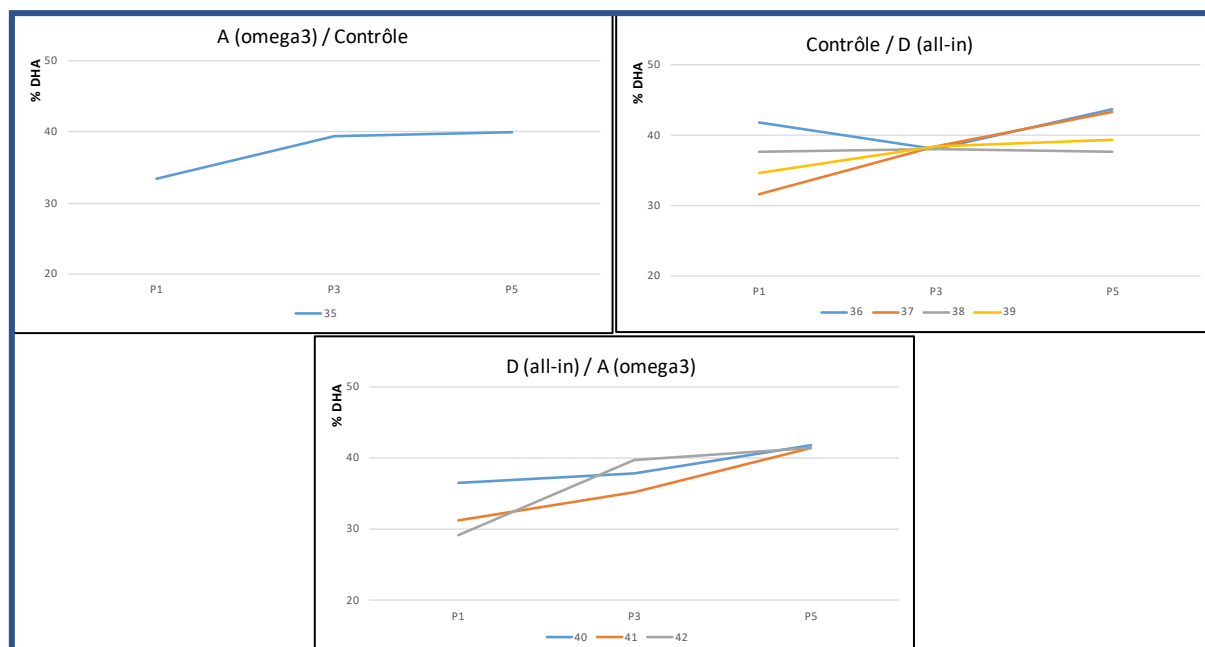
ALA = acide alpha-linolénique, EPA = acide eicosapentaénoïque, DHA = acide docosahexaénoïque, LA = acide linoléique, AA = acide arachidonique, DPA = acide docosapentaénoïque

	R. contrôle	Régime all-in					Régime oméga3		
Acides gras	35	36	37	38	39	40	41	42	
C10:0	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,01	0,02	0,02	
C12:0	0,13	0,12	0,07	0,18	0,13	0,11	0,14	0,13	
C13:0	0,03	0,04	0,03	0,05	0,03	0,02	0,03	0,04	
C14:0	7,14	8,25	3,26	8,98	10,29	6,49	7,32	7,19	
C15:0	0,06	0,06	0,05	0,10	0,10	0,06	0,07	0,08	
X	23,63	24,81	25,17	21,98	21,88	23,85	22,27	22,27	
C16:0	10,55	8,56	11,79	14,38	12,26	11,67	11,31	12,23	
C16:1cis9	0,09	0,11	0,07	0,17	0,13	0,11	0,11	0,13	
C17:0	0,17	0,10	0,16	0,13	0,12	0,16	0,22	0,14	
C18:0	4,95	3,70	4,62	4,86	4,65	4,72	4,96	4,99	
C18:1cis9	1,05	0,87	0,82	1,97	1,00	0,73	1,07	0,93	
C18:1cis11	1,51	1,23	1,37	1,45	1,52	1,37	1,41	1,33	
C18:2c9c12 (LA)	2,69	2,38	2,90	2,41	2,66	2,64	2,47	2,57	
C20:0	0,08	0,08	0,06	0,11	0,17	0,09	0,07	0,12	
C20:1c11	0,08	0,04	0,05	0,06	0,05	0,05	0,05	0,05	
C18:3c9,c12,c15 (ALA)	0,04	0,09	0,10	0,09	0,11	0,09	0,08	0,09	
C20:2c11,c14	0,29	0,17	0,24	0,16	0,20	0,23	0,35	0,16	
C22:0	0,03	0,04	0,05	0,03	0,03	0,05	0,03	0,05	
C20:3c8,c11,c14	0,46	0,46	0,53	0,91	0,59	0,42	0,52	0,52	
C22:1c13	0,03	0,07	0,04	0,05	0,05	0,07	0,06	0,07	
C20:3c11,c14,c17	0,03	0,04	0,07	0,03	0,06	0,06	0,08	0,03	
C20:4c5,c8,c11,c14 (AA)	3,21	2,63	2,65	2,60	2,62	2,61	3,08	2,38	
C20:5c5,c8,c11,c14,c17 (EPA)	0,02	0,02	0,04	0,03	0,03	0,02	0,03	0,03	
C22:4c7,c10,c13,c16	0,36	0,25	0,24	0,17	0,17	0,17	0,22	0,22	
C22:5c4,c7,c10,c13,c16 (DPA) n-6	2,79	1,45	1,49	0,58	0,90	1,51	1,69	1,78	
C22:5c7,c10,c13,c16,c19 (DPA) n-3	0,53	0,69	0,89	0,77	0,78	0,78	0,81	0,99	
C22:6c4,c7,c10,c13,c16,c19 (DHA)	39,91	43,63	43,17	37,67	39,36	41,83	41,48	41,36	
c24:5c9,c12,c15,c18,c21	0,04	0,07	0,07	0,06	0,06	0,06	0,07	0,07	
c24:6c6,c9,c12,c15,c18,c21	0,06	0,02	0,00	0,00	0,00	0,05	0,00	0,03	

Annexe 7 : Proportions en acides docosahexaénoïque dans les spermatozoïdes de BBB, après les régimes D en P3 et C en P5, C en P3 et contrôle en P5, contrôle en P3 et D en P5
DHA = acide docosahexaénoïque

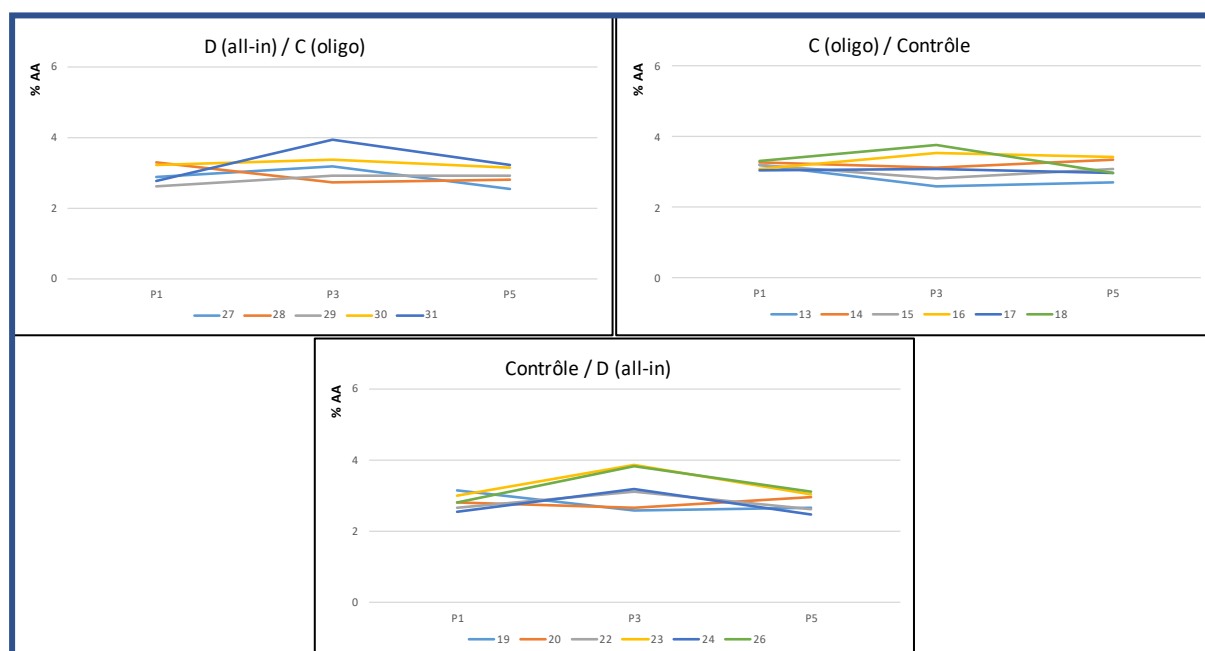


Annexe 8 : Proportions en acides docosahexaénoïque dans les spermatozoïdes d'Holstein, après les régimes A en P3 et contrôle en P5, contrôle en P3 et D en P5, D en P3 et A en P5
DHA = acide docosahexaénoïque



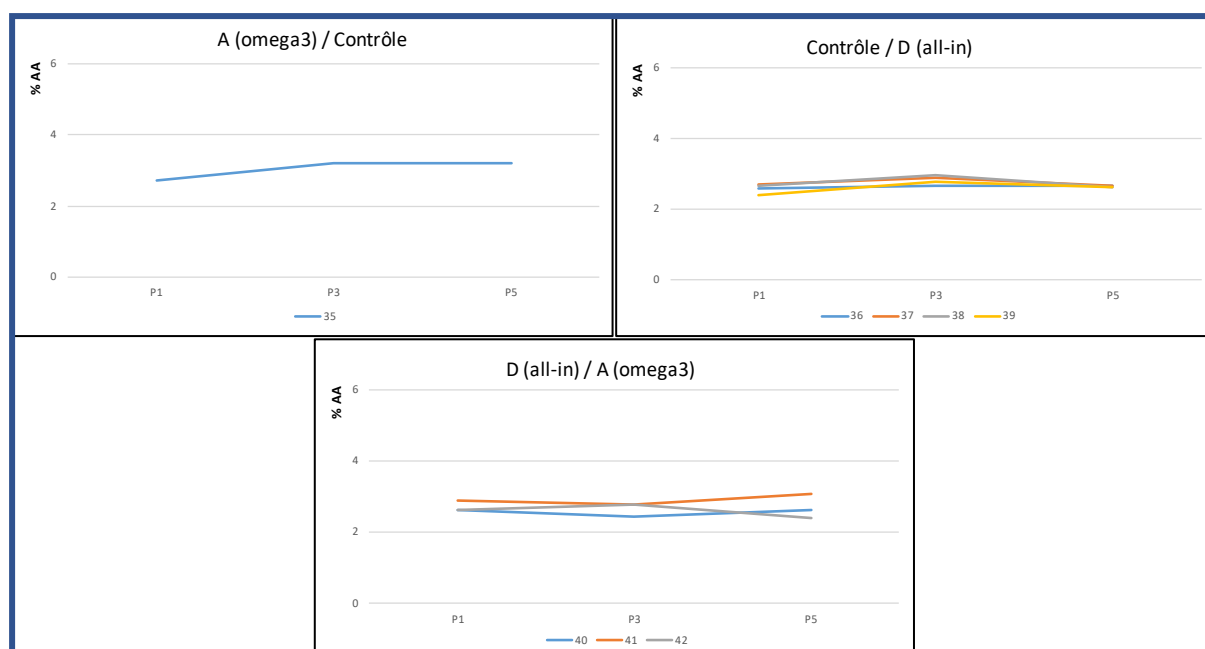
Annexe 9 : Proportions en acides arachidonique dans les spermatozoïdes de BBB, après les régimes D en P3 et C en P5, C en P3 et contrôle en P5, contrôle en P3 et D en P5

AA = acide arachidonique

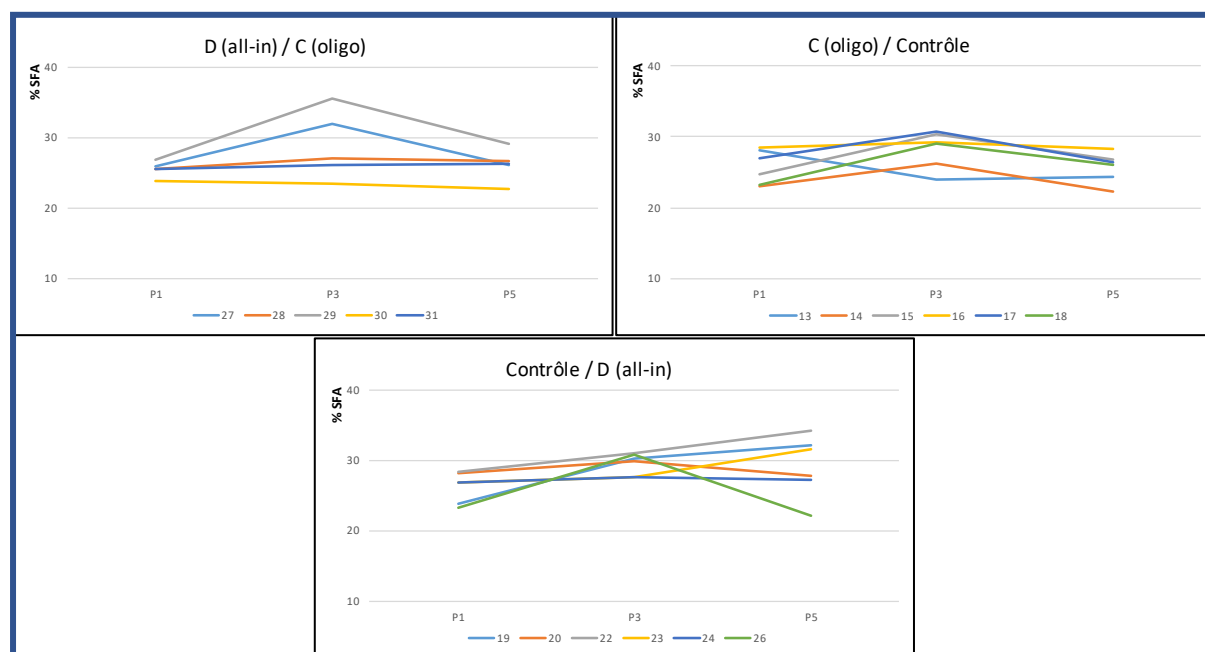


Annexe 10 : Proportions en acides arachidonique dans les spermatozoïdes d'Holstein, après les régimes A en P3 et contrôle en P5, contrôle en P3 et D en P5, D en P3 et A en P5

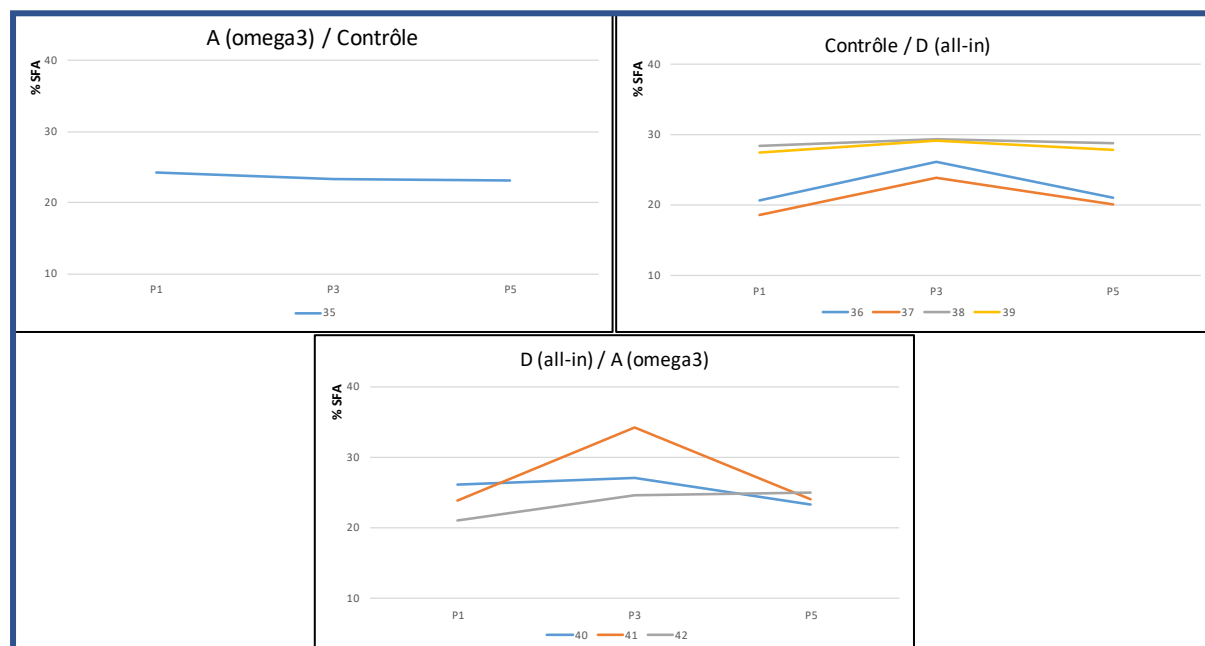
AA = acide arachidonique



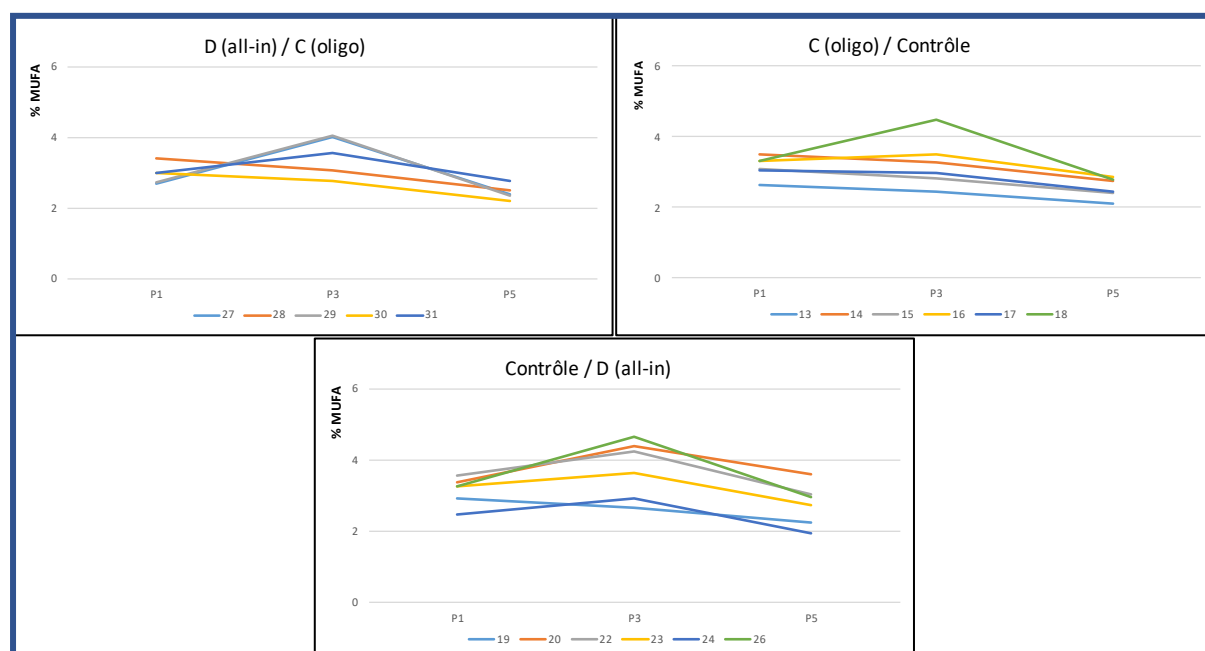
Annexe 11 : Proportions en acides gras saturés dans les spermatozoïdes de BBB, après les régimes D en P3 et C en P5, C en P3 et contrôle en P5, contrôle en P3 et D en P5
SFA = acides gras saturés



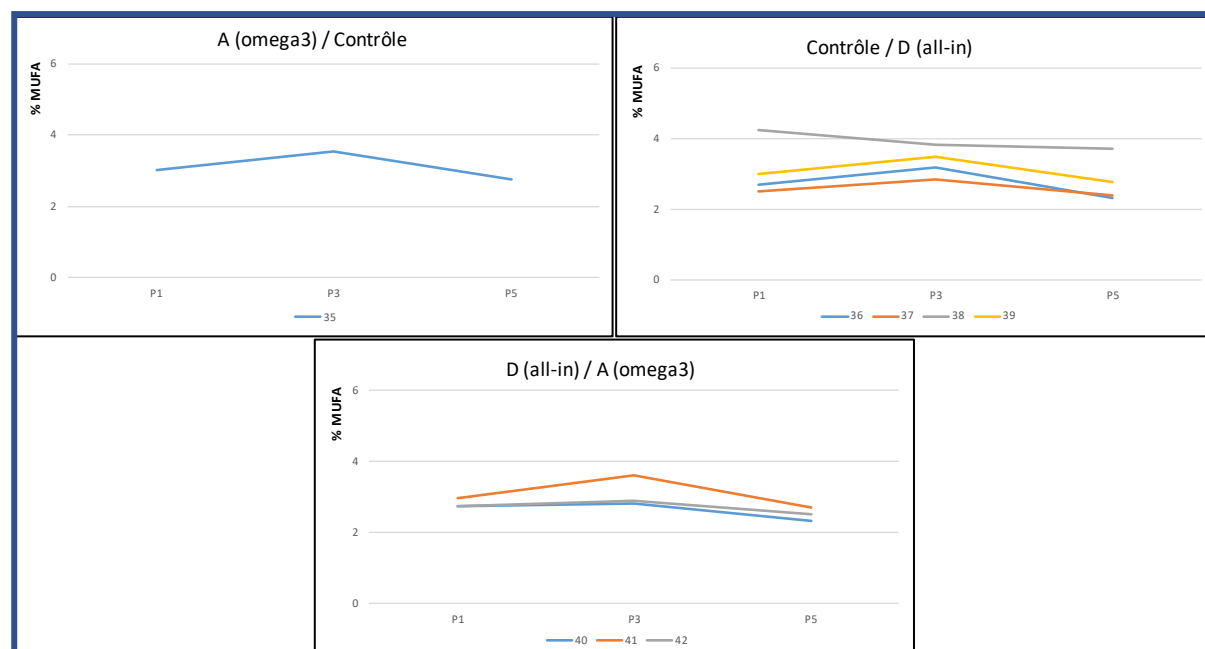
Annexe 12 : Proportions en acides gras saturés dans les spermatozoïdes d'Holstein, après les régimes A en P3 et contrôle en P5, contrôle en P3 et D en P5, D en P3 et A en P5
SFA = acides gras saturés



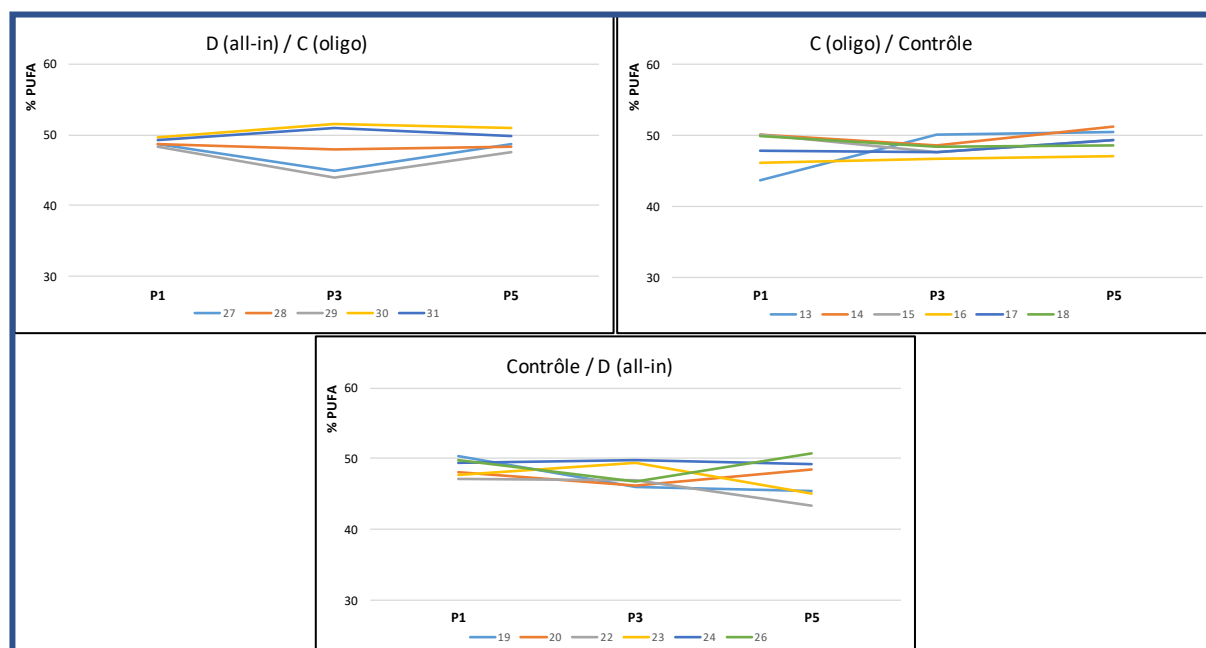
Annexe 13 : Proportions en acides gras monoinsaturés dans les spermatozoïdes de BBB, après les régimes D en P3 et C en P5, C en P3 et contrôle en P5, contrôle en P3 et D en P5
MUFA = acides gras monoinsaturés



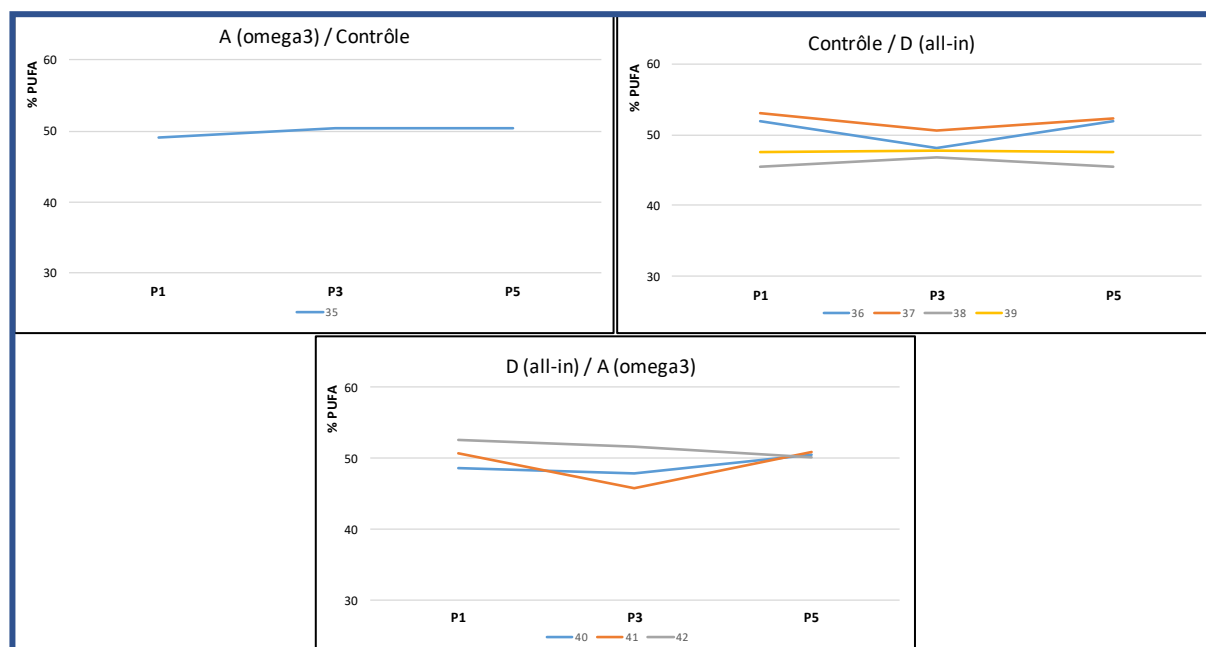
Annexe 14 : Proportions en acides gras monoinsaturés dans les spermatozoïdes d'Holstein, après les régimes A en P3 et contrôle en P5, contrôle en P3 et D en P5, D en P3 et A en P5
MUFA = acides gras monoinsaturés



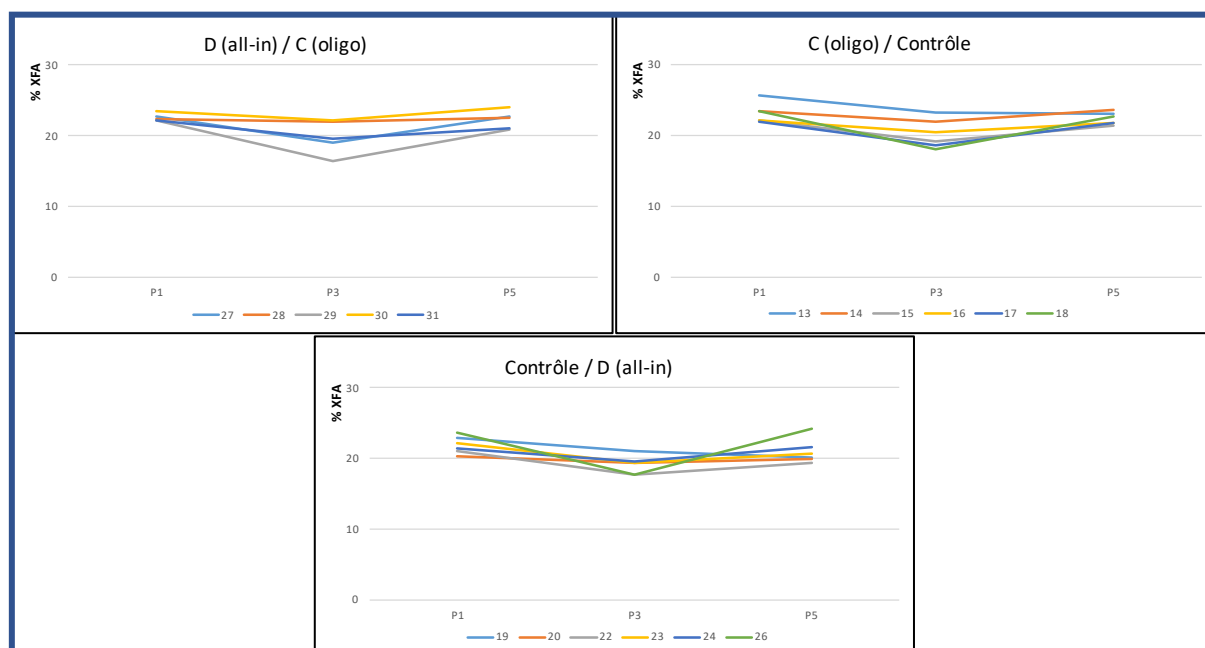
Annexe 15 : Proportions en acides gras polyinsaturés dans les spermatozoïdes de BBB, après les régimes D en P3 et C en P5, C en P3 et contrôle en P5, contrôle en P3 et D en P5
 PUFA = acides gras polyinsaturés



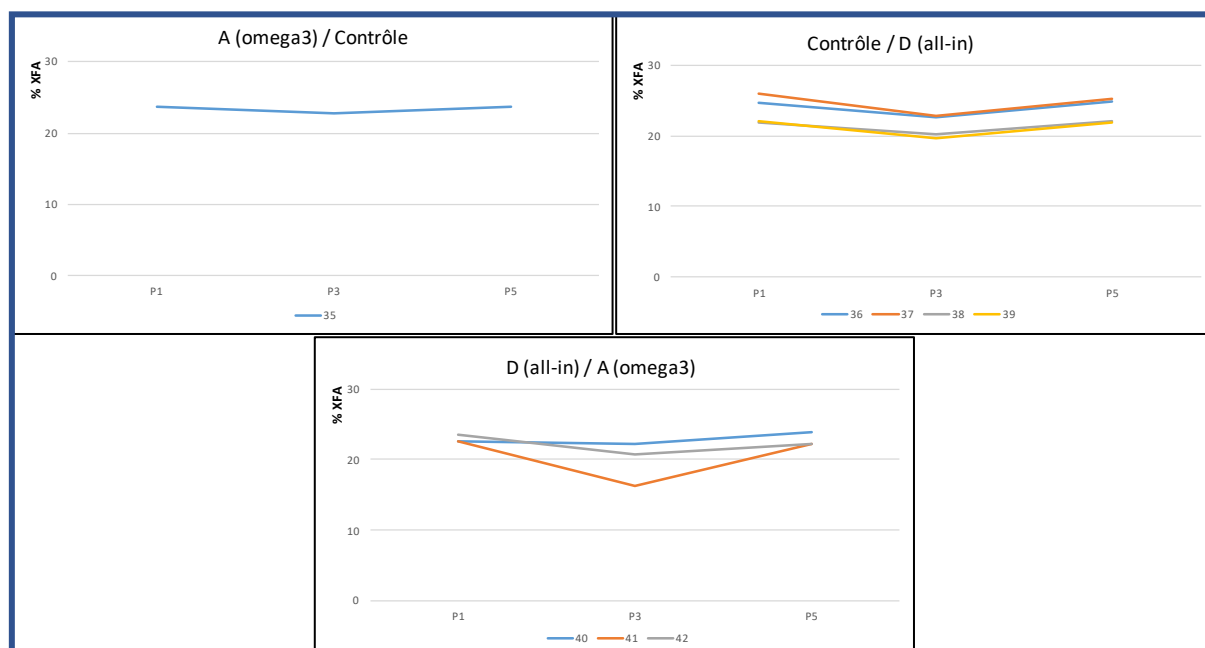
Annexe 16 : Proportions en acides gras polyinsaturés dans les spermatozoïdes d'Holstein, après les régimes A en P3 et contrôle en P5, contrôle en P3 et D en P5, D en P3 et A en P5
 PUFA = acides gras polyinsaturés



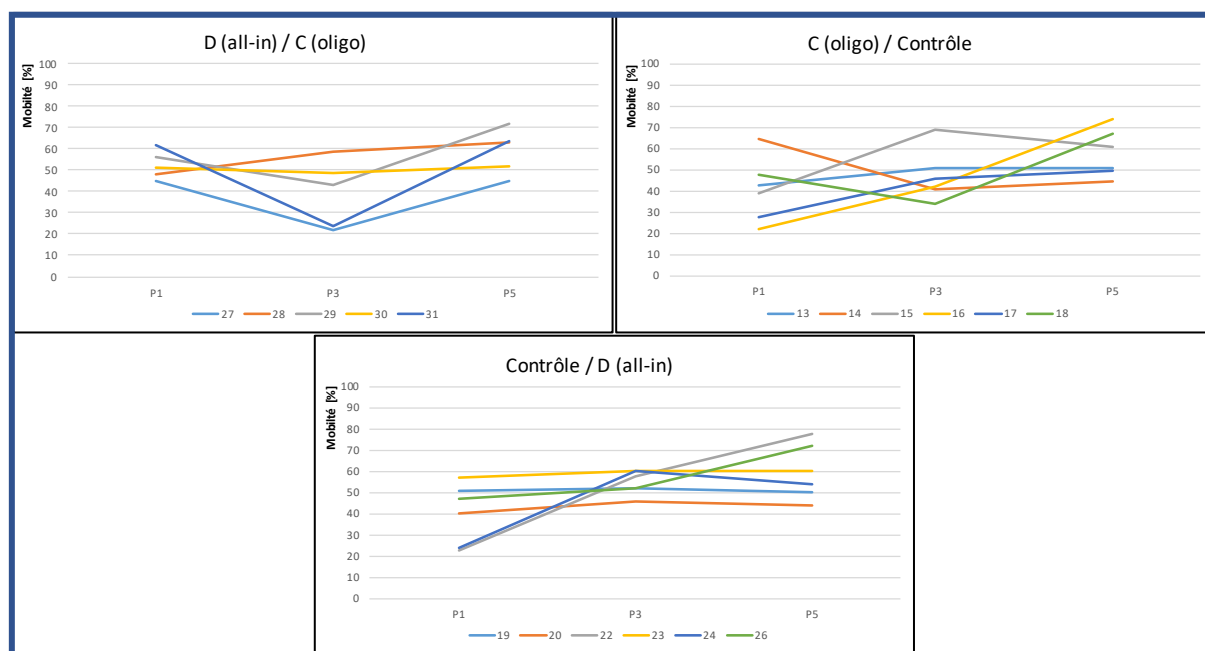
Annexe 17 : Proportions en acides gras « X » dans les spermatozoïdes de BBB, après les régimes D en P3 et C en P5, C en P3 et contrôle en P5, contrôle en P3 et D en P5
XFA = acide gras « X »



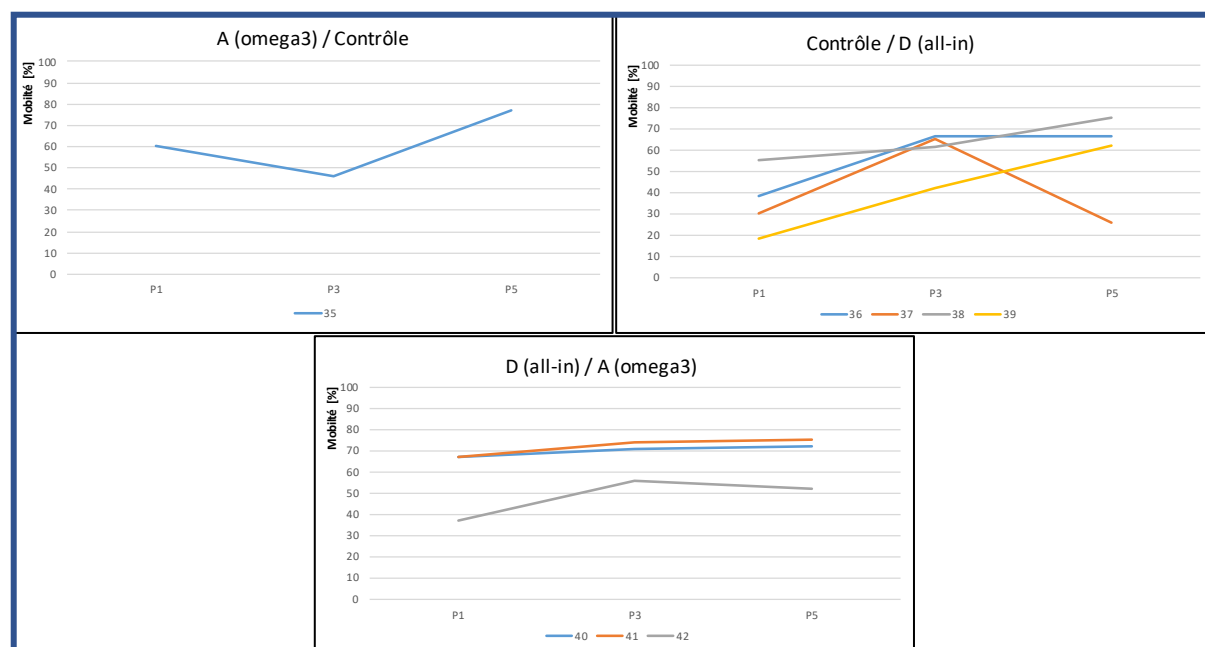
Annexe 18 : Proportions en acides gras « X » dans les spermatozoïdes d'Holstein, après les régimes A en P3 et contrôle en P5, contrôle en P3 et D en P5, D en P3 et A en P5
XFA = acide gras « X »



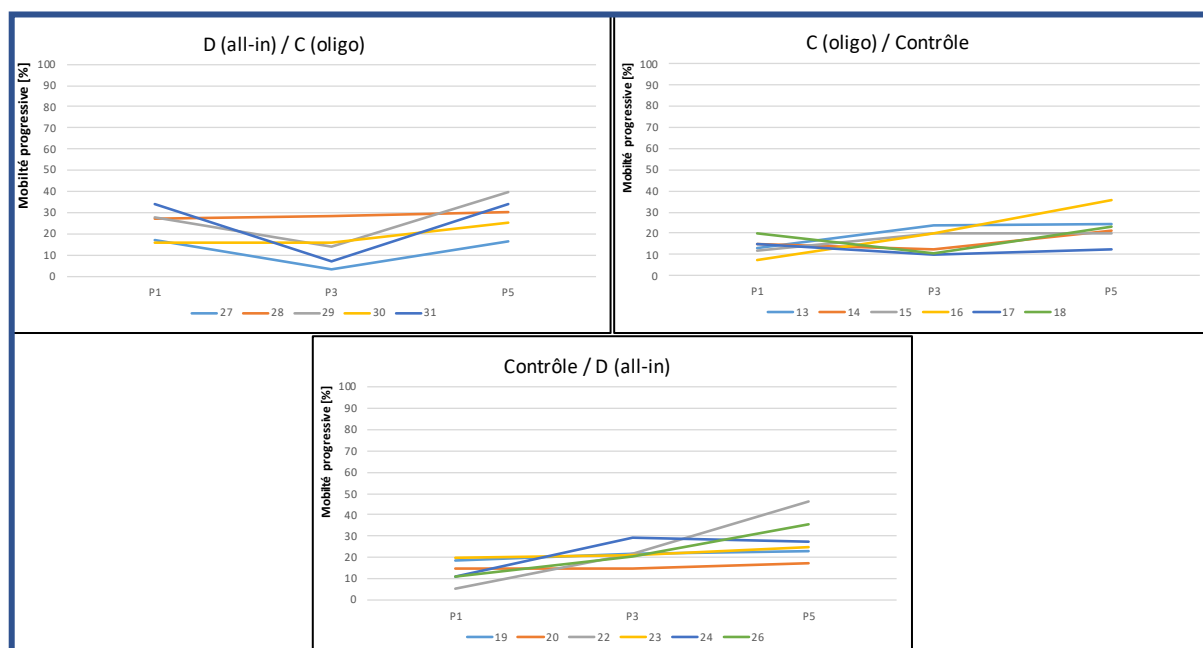
Annexe 19 : Mobilité après décongélation des spermatozoïdes de BBB, après les régimes D en P3 et C en P5, C en P3 et contrôle en P5, contrôle en P3 et D en P5.



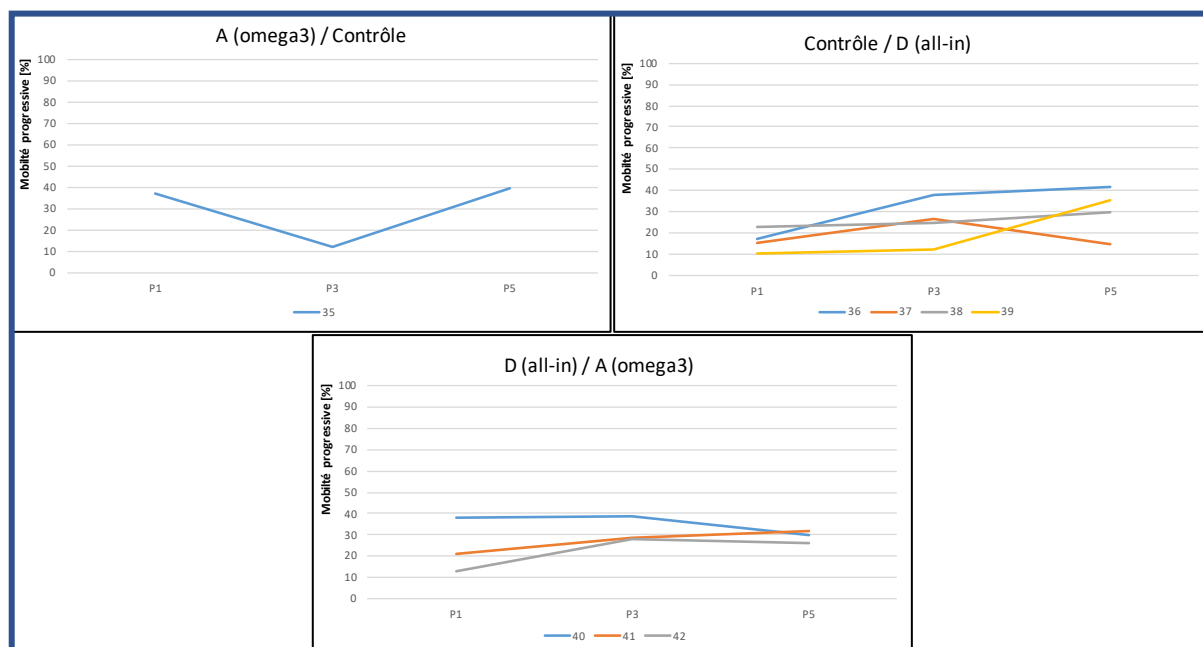
Annexe 20 : Mobilité après décongélation des spermatozoïdes d'Holstein, après les régimes A en P3 et contrôle en P5, contrôle en P3 et D en P5, D en P3 et A en P5.



Annexe 21 : Mobilité progressive après décongélation des spermatozoïdes de BBB, après les régimes D en P3 et C en P5, C en P3 et contrôle en P5, contrôle en P3 et D en P5.

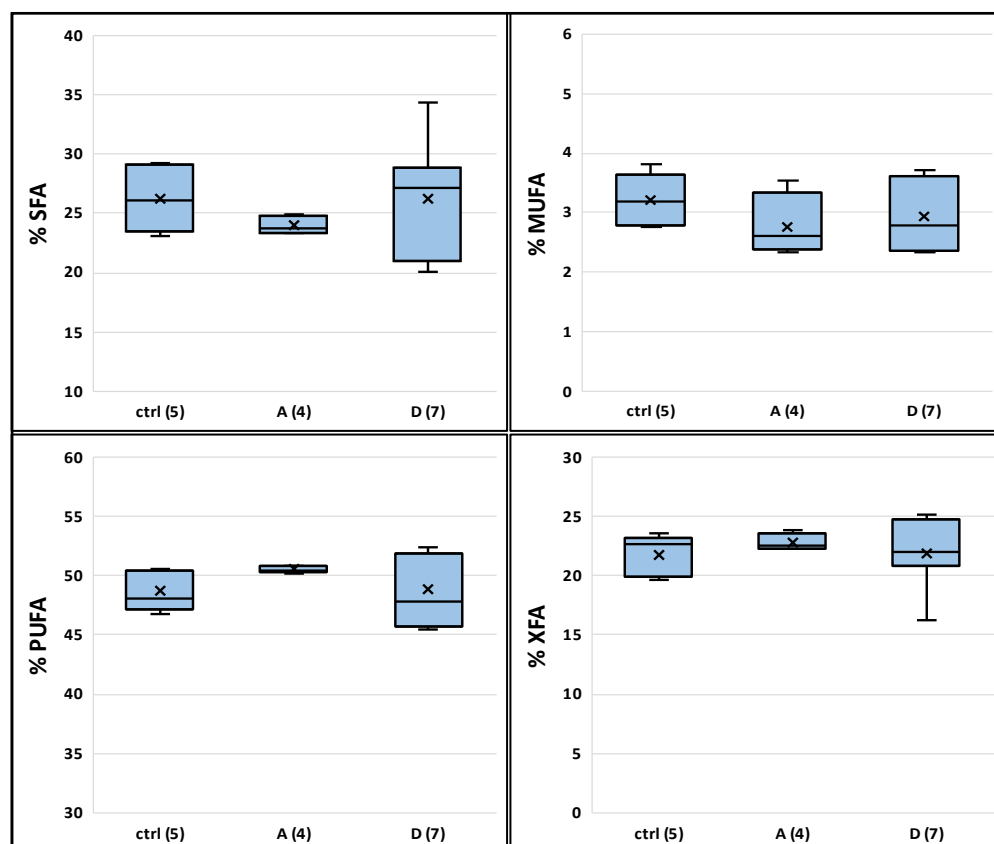


Annexe 22 : Annexe 20 : Mobilité progressive après décongélation des spermatozoïdes d'Holstein, après les régimes A en P3 et contrôle en P5, contrôle en P3 et D en P5, D en P3 et A en P5.



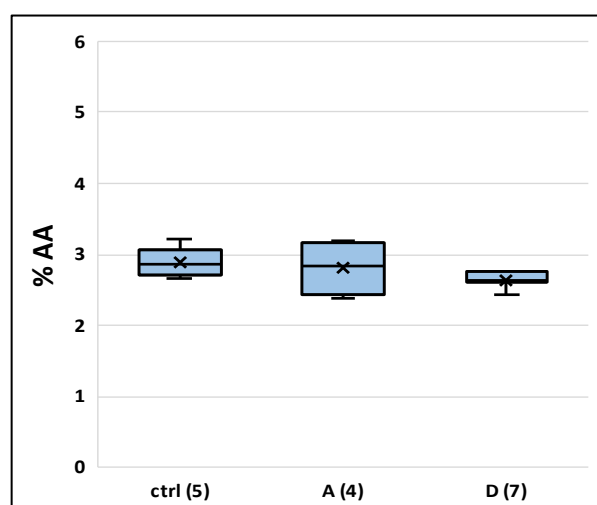
Annexe 23 : Proportions des différentes classes d'acides gras dans les spermatozoïdes de Holstein pour les deux prélèvements (P3 et P5), en fonction des différents régimes

SFA = acides gras saturés, MUFA = acides gras monoinsaturés, PUFA = acides gras polyinsaturés, XFA = acide gras « X »

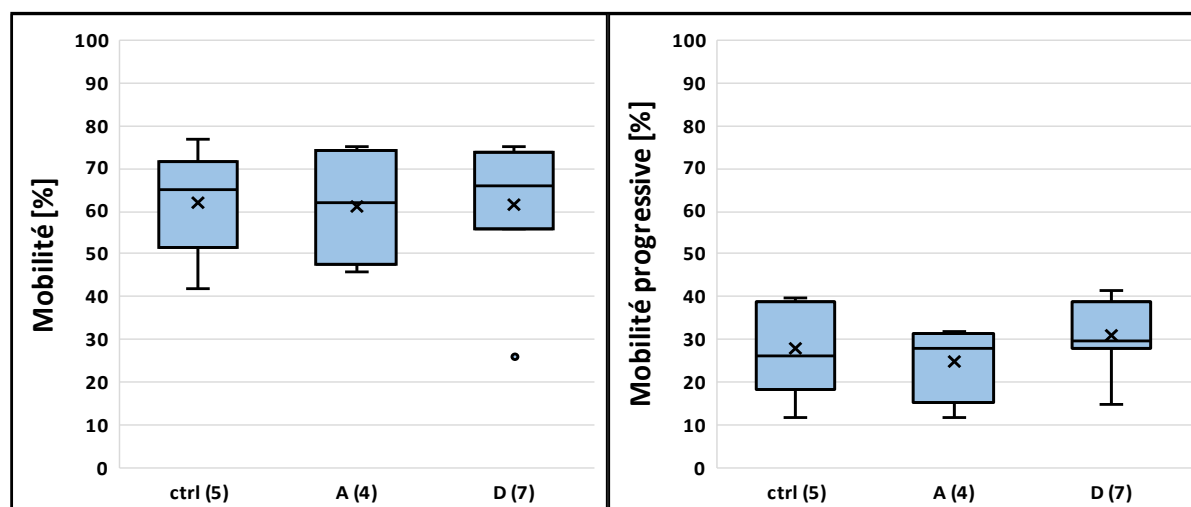


Annexe 24 : Proportions en acide arachidonique dans les spermatozoïdes de Holstein pour les deux prélèvements (P3 et P5), en fonction des différents régimes

AA = acide arachidonique



Annexe 25 : Mobilité et mobilité progressive des spermatozoïdes d'Holstein après décongélation pour les deux prélèvements (P3 et P5), en fonction des différents régimes.



Influence de différents régimes alimentaires sur le profil en acides gras des spermatozoïdes de taureaux d'insémination et leur impact sur la résistance à la congélation

Présenté par Kevin Delhasse

Résumé

La production de paillettes d'insémination pour la race de taureau Blanc Bleu Belge (BBB) est en constante augmentation depuis ces 10 dernières années. Malheureusement, cette production actuelle ne permettrait plus de répondre à la demande grandissante du marché belge et international.

Ce mémoire de fin d'études s'intègre dans le cadre du projet « Fertiwalim » dont l'objectif général est d'améliorer la résistance à la congélation de la semence BBB en jouant sur l'alimentation des taureaux. Ceci permettrait d'augmenter la production de doses d'insémination pour cette race de taureaux, en réduisant le nombre de spermatozoïdes par dose, permettant ainsi de réaliser plus de paillettes par éjaculat.

L'objectif de ce mémoire était tout d'abord de caractériser la composition en acides gras des spermatozoïdes de taureaux BBB ayant reçu des régimes alimentaires différents (régimes enrichis soit en omega3, soit en antioxydants, soit en oligoéléments, soit avec l'ensemble de ces trois types de composés), sur une période allant d'avril 2017 à janvier 2018. Au terme de cette expérience, nous avons corrélé la composition en acides gras des spermatozoïdes avec les paramètres de qualité des spermatozoïdes après décongélation (mobilité et mobilité progressive).

Les résultats de ce travail nous ont permis de constater une augmentation de la proportion en acide docosahexaénoïque (DHA) dans les spermatozoïdes de taureaux BBB lorsque la teneur en omega3 augmente dans le régime. Cette constatation confirme que la composition en acides gras des spermatozoïdes dépend du régime alimentaire donné aux taureaux. En revanche, les antioxydants et les oligoéléments ajoutés à un régime enrichi en omega3, tendent à diminuer l'augmentation des proportions en DHA dans les spermatozoïdes de BBB. Aucun effet régime n'a pu être constaté sur la proportion en acide arachidonique (AA) dans les spermatozoïdes de BBB.

Tout comme pour les proportions des différentes classes d'acides gras, aucun effet des proportions en DHA et en AA n'a pu être observé sur la qualité des spermatozoïdes après décongélation (mobilité et mobilité progressive). De plus, les 5 régimes testés dans ce mémoire n'ont eu aucun effet sur la mobilité après décongélation des spermatozoïdes de taureaux BBB. En revanche, un régime enrichi uniquement en antioxydants, améliorerait la mobilité progressive après décongélation. L'ajout simultané d'omega3 et d'oligoéléments dans un régime enrichi en antioxydants, contrecarrerait l'effet positif apporté par les antioxydants seuls, au niveau de la mobilité progressive.