

## Effets d'une ration enrichie en acides gras polyinsaturés n-3 sur la production d'embryons chez la vache laitière

ELIS S. (1), LE BOURHIS D. (2), OSEIKRIA M. (1), DESMARCHAIS A. (1), BRIANT E. (3), DESNOES O. (2), DUPONT M. (3), LE BERRE L. (2), UZBEKOVA S. (1), SALVETTI P. (2), MAILLARD V. (1), FRERET S. (1)

(1) PRC, CNRS, IFCE, INRA, Université de Tours, 37380, Nouzilly, France

(2) Aalice, Station de Phénotypage, 37380, Nouzilly, France

(3) UE PAO, INRA, 37380, Nouzilly, France

### RESUME

La fertilité des vaches laitières de race Prim'Holstein reste actuellement assez faible. Dans une précédente étude (Elis et al., 2016), l'ajout d'acides gras oméga-3 à longue chaîne (AGPI n-3 LC) dans la ration alimentaire de vaches laitières a permis de diminuer le taux de non fécondation-mortalité embryonnaire précoce après la 1<sup>ère</sup> insémination artificielle (groupe AGPI n-3 LC 13,5 %, n=22 vs témoin n-6 38,8 %, n=23) suggérant un effet potentiel sur la qualité ovocytaire. Cette étude avait donc pour objectif d'évaluer les effets de ce même type de supplémentation sur la production d'embryons *in vitro* chez la vache laitière, après stimulation ovarienne hormonale (superovulation). Ainsi 37 vaches primipares Holstein ont été supplémentées en AGPI n-3 (n=18, huile de poisson micro-encapsulée, 1% MS, OMG750®, Kemin) ou n-6 (n=19, témoin avec huile de soja micro-encapsulée, 1% MS, OMG Soy®, Kemin) à partir de 11 semaines post partum en moyenne et pendant 9 semaines. Des ponctions écho-guidées des follicules ovariens ont été réalisées sur les vaches, après 2, 5 ou 7 semaines de supplémentation. Après ponction folliculaire, les complexes ovocyte-cumulus (COC) ont été mis en maturation, fécondation puis développement *in vitro*. Au total 1462 follicules ont été ponctionnés sur les vaches n-3 (54 sessions de ponctions) et 1538 follicules sur les vache n-6 (57 sessions). Une augmentation significative du taux de blastocystes jugés de bonne qualité a été observée ( $p = 0,0217$ ) chez les vaches n-3 (42,7 %) comparées aux vaches témoins n-6 (33,3 %).

### Effects of a diet enriched with n-3 polyunsaturated fatty acids on embryo production in dairy cows

ELIS S. (1), LE BOURHIS D. (2), OSEIKRIA M. (1), DESMARCHAIS A. (1), BRIANT E. (3), DESNOES O. (2), DUPONT M. (3), LE BERRE L. (2), UZBEKOVA S. (1), SALVETTI P. (2), MAILLARD V. (1), FRERET S. (1)

(1) PRC, CNRS, IFCE, INRA, Université de Tours, 37380, Nouzilly, France

### SUMMARY

Fertility of Prim'Holstein dairy cows remains relatively low. In a previous study (Elis et al. 2016), the enrichment of the diet with long chain n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA n-3 LC) led to a decrease of the non-fertilization – early embryo mortality rate after the first artificial insemination (PUFA n-3 LC 13.5%, n=22 vs control n-6 38.8%, n=23), suggesting a potential effect on oocyte quality. We thus investigated here, the effects of the same supplementation on *in vitro* embryo production in dairy cows, after ovarian stimulation. Therefore 37 primiparous cows were supplemented with either n-3 PUFA (n=18, encapsulated fish oil, 1% DM, OMG750®, Kemin) or n-6 PUFA (n=19, control with encapsulated soy oil, 1% DM, OMG Soy®, Kemin). After ovum pick-up, oocyte cumulus complexes were *in vitro* matured, fertilized and underwent *in vitro* development. A total of 1462 follicles were punctured on n-3 cows (54 sessions) and 1583 follicles on n-6 cows (57 sessions). A significant increase of the good quality blastocysts rate was reported ( $p = 0.0217$ ) in n-3 cows (42.7%) compared to control n-6 cows (33.3%).

### INTRODUCTION

En France, la fertilité des vaches laitières de race Prim'Holstein reste faible (39,7 % de réussite à la première insémination artificielle (IA1) en 2015, Le Mezec 2017), entraînant un taux de réforme pour infertilité élevé : les réformes pour problèmes de reproduction peuvent représenter globalement un peu plus d'un quart des motifs de réforme (Seegers, 2008).

Une supplémentation de la ration des vaches laitières par des acides gras poly-insaturés AGPI n-3 pourrait favoriser la fertilité (Petit et al. 2002, Ambrose et al. 2006, Thangavelu et al. 2007, Zachut et al. 2010b, Dirandeh et al. 2013a, Moallem et al. 2013, Sinedino et al. 2017, Moallem 2018). Les AGPI n-3 agirait en diminuant la sécrétion de prostaglandine utérine (PGF2alpha), facilitant ainsi l'implantation de l'embryon (Mattos et al. 2000, Dirandeh et al. 2013b). Ils agirait également sur la population folliculaire (Petit et al. 2002, Zachut et al. 2010, Elis et al. 2016). La diminution du taux de non fécondation-mortalité embryonnaire précoce (NF-MEP) après IA1 (Elis et al. 2016) d'une part, et l'amélioration du rendement de la production d'embryon *in vitro*, réalisée sans traitement de superovulation après ponction écho-guidée des follicules ovariens (Moallem et al. 2013) d'autre part, suggèrent

un effet potentiel des AGPI n-3 sur la qualité ovocytaire, effet confirmé *in vitro* pour l'acide docosahexaénoïque (DHA), un AGPI n-3 à longue chaîne (Oseikria et al. 2016).

L'objectif de ce travail est d'étudier les effets de ce même type de supplémentation sur la production d'embryons *in vitro*, après stimulation ovarienne hormonale (= traitement de superovulation), chez la vache laitière. Nous avons également testé plusieurs durées de supplémentation, afin de déterminer la durée minimale à utiliser.

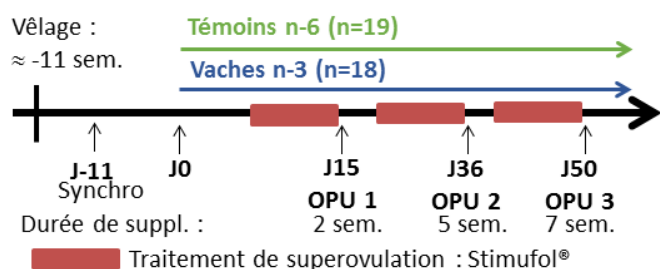
### 1. MATERIEL ET METHODES

#### 1.1. DISPOSITIF EXPERIMENTAL

Ainsi 37 vaches primipares Holstein ont été supplémentées en AGPI n-3 (n=18), ou n-6 (n=19), à partir de 11 semaines post partum en moyenne et pendant 9 semaines, dans l'Unité Expérimentale PAO (site de Nouzilly, Centre INRA Val de Loire). Afin de pouvoir conclure que les effets observés sont dus spécifiquement aux AGPI n-3, le groupe témoin a été constitué de vaches supplémentées en AGPI n-6.

Elles ont subi 3 sessions de ponctions écho-guidées folliculaires (ou OPU pour Ovum Pick-Up) après stimulation

ovarienne (superovulation), après 2 (OPU1), 5 (OPU2) et 7 (OPU3) semaines de supplémentation (Figure 1).



**Figure 1** : Dispositif expérimental (le délai vêlage-début de supplémentation (=J0) est de  $11 \pm 2$  semaines).

## 1.2. RATIONNEMENT, SUPPLÉMENTATION ÉNERGETIQUE ET PARAMÈTRES ZOOTECHNIQUES

Les vaches ont reçu pendant 9 semaines une ration de base composée (en % de matière sèche (MS), totale de la ration) de 59,4 % d'ensilage de maïs, de 24 % de concentrés (14,5 % Sandilait® (tourteau de soja et de colza), 9,5 % Sandifort® (blé)), de 8,5 % de foin de luzerne, de 7,5 % de luzerne déshydratée, de 0,2 % de CMV 5/23 et de 0,4 % de calcium. Le supplément AGPI n-3 est une huile d'origine marine microencapsulée (OMG750®, Kemin, France) et le supplément témoin n-6 est une huile de soja microencapsulée (OMG-SOY®, Kemin, France), distribués chacun à 1 % MS/j. Ces suppléments ont été mélangés à la ration des vaches (rations complètes) dans des auges individuelles, permettant de mesurer l'ingestion en continu (Insentec B.V., Marknesse, Pays-Bas). Le poids (mesuré en sortie de salle de traite) et la production laitière ont été enregistrés tous les jours, pendant les 5 premiers mois après vêlage. Le bilan énergétique (exprimé en UFL/j) a été calculé et correspond à la différence entre les apports et les besoins énergétiques d'entretien et de lactation, selon la méthode INRA (INRA, 2007). Les valeurs nutritionnelles des différents ingrédients de la ration ont été obtenues par des analyses chimiques.

## 1.3 DOSAGES METABOLIQUES

Des prises de sang ont été réalisées 1 fois par semaine avant la distribution de la ration du matin, à partir du début de la supplémentation, afin de mesurer les taux plasmatiques d'AGNE (acides gras non estérifiés), de glucose et d'urée, par dosage enzymatique colorimétrique sur un analyseur multiparamétrique (Kone instruments corporation, Espoo, Finlande) à l'UMR PEGASE (site de Saint-Gilles, Centre INRA Bretagne-Normandie), ainsi que la composition en acides gras du plasma et du liquide folliculaire par chromatographie en phase gazeuse à INSAVALOR (Villeurbanne, France).

## 1.4 PRODUCTION D'EMBRYONS

### 1.4.1. Traitements de synchronisation des chaleurs et de stimulation ovarienne

Onze jours avant le début de la supplémentation, chaque vache a reçu un traitement de synchronisation (norgestomet implant sous-cutané 3,3 mg, busérelina injection IM 0,001 mg, Crestar Pack®, MSD Santé Animale, France), puis 7 jours après une injection IM de 15 mg de luprotriol (Prosolvlin®, Virbac, France) et 2 jours après, l'implant a été retiré. Les chaleurs de référence ont été observées 48 h après le retrait de l'implant (= 1<sup>er</sup> jour de supplémentation), et un nouvel implant de norgestomet 3,3 mg a été posé (Crestar® SO, MSD Santé Animale). Il a été remplacé tous les 10 jours pendant 9 semaines jusqu'à la fin du protocole pour éviter les retours en chaleur entre les ponctions ovariennes.

La stimulation ovarienne a été réalisée avec 400  $\mu$ g/vache de pFSH (Stimufol®, Reprobiol, Belgique) répartis en 5 injections IM à doses décroissantes (112, 100, 75, 63 et 50  $\mu$ g) toutes les 12 h, à partir de 60 h avant la ponction folliculaire.

### 1.4.2. Ponctions folliculaires échoguidées

La ponction folliculaire échoguidée a été réalisée sous anesthésie loco-régionale avec 86,5 à 173 mg/vache de procaine (Procamidol®, Richter Pharma, Autriche), après une sédation avec 10 mg/100 kg de xylazine (Rompun®, Bayer Animal Health, France). La zone ano-génitale a ensuite été nettoyée et désinfectée (Vétédine savon®, Vétquinol, France). Un guide contenant la sonde échographique a été introduit par voie vaginale et l'ovaire positionné par l'opérateur par voie transrectale contre la sonde (sonde EC123, 7,5 MHz, échographe MyLab30, ESAOTE Pie Medical). Un porte-aiguille muni d'une aiguille (18 G, à usage unique) et d'un système d'aspiration a été introduit dans le guide pour procéder à la ponction des follicules ovariens par voie transvaginale. Les 37 vaches ont été réparties en 5 groupes de 6 à 9 vaches. Pour chaque groupe de vaches, la session de ponctions folliculaires a été réalisée sur une journée. L'ensemble du dispositif expérimental (groupes 1 à 5) s'est déroulé sur une période de 14 mois.

### 1.4.3. Production d'embryons *in vitro*

Les complexes ovocyte-cumulus (COC), récupérés lors de la ponction folliculaire, ont ensuite été triés, puis ont subi une maturation *in vitro* (MIV) suivie d'une fécondation *in vitro* (FIV) au laboratoire de production d'embryons de la station de phénotypage d'ALLICE (Nouzilly). Les zygotes produits ont été mis en développement *in vitro* (DIV) selon un protocole précédemment décrit (Osekria et al. 2017). La qualité des embryons a été évaluée par calcul du taux d'embryons clivés (> 2 cellules, par rapport aux ovocytes mis en FIV) et du taux de blastocystes (par rapport aux embryons clivés) à 48 h et 7 j après FIV, respectivement. La qualité des blastocystes a également été évaluée (qualité notée de Q1 à Q4, selon les critères morphologiques IETS, International Embryo Technology Society). Les blastocystes de qualité Q1 et Q2 sont considérés de bonne qualité.

## 1.5 ANALYSES STATISTIQUES

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel SAS® (SAS Institute Inc., 2013). Les stades (jour post partum) des vaches n-3 et n-6 en début de supplémentation ont été comparés avec un test t de Student.

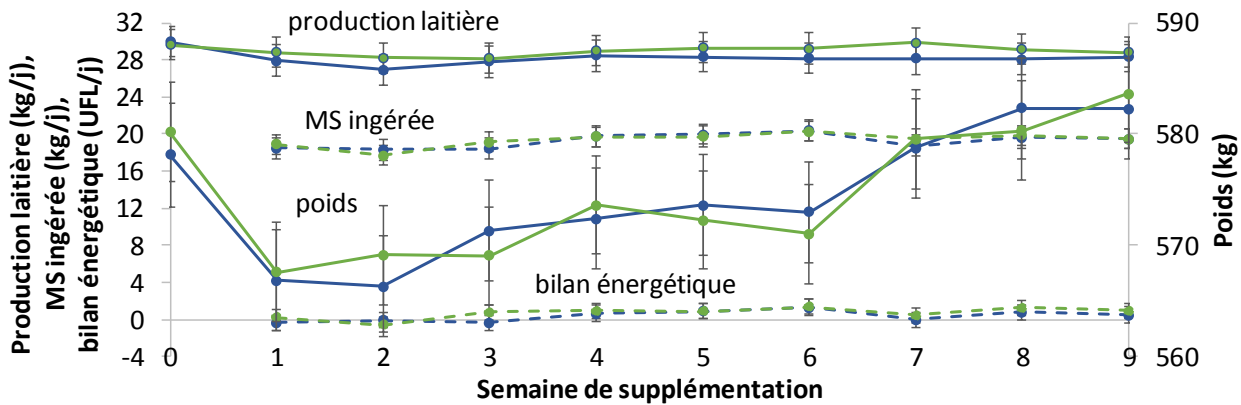
Les modèles multifactoriels suivants ont été utilisés :

# Modèle linéaire mixte (procédure MIXED) avec aliment, semaine de supplémentation (mesures répétées intra-vache) et interaction entre les 2 en effets fixes, effet aléatoire du groupe, pour les variables : production laitière (avec jour post partum au 1<sup>er</sup> jour de supplémentation en covariable), poids vif (avec poids en 1<sup>ère</sup> semaine de supplémentation en covariable), matière sèche totale ingérée (avec poids vif en covariable), bilan énergétique, AGNE, glucose, urée (pour chacun des 3 paramètres, valeur du paramètre mesuré au 1<sup>er</sup> jour de supplémentation en covariable), AG plasmatiques et folliculaires, nombre de COC récupérés et mis en maturation, nombre d'embryons produits par session d'OPU.

# Modèle mixte de régression logistique (procédure GLIMMIX) avec aliment, semaine de supplémentation et interaction entre les 2 en effets fixes, effet aléatoire du groupe, pour les variables : taux de clivage et de développement des embryons.

Les résultats sont présentés en moyennes estimées  $\pm$  SEM, sauf indication contraire. Les comparaisons multiples de moyennes estimées ont été faites avec un test t, un ajustement de Bonferroni a été utilisé pour toutes les variables, sauf pour COC et embryons, AG plasmatiques et folliculaires. Les effets avec  $p \leq 0,05$  ont été considérés comme significatifs, ceux avec  $0,05 < p \leq 0,10$  comme des tendances.

Seule la p-value de l'effet aliment (n-6 versus n-3) est systématiquement indiquée dans la section Résultats. La p-value de l'interaction aliment x semaine de supplémentation (sem. de suppl.) n'est indiquée que lorsqu'elle est significative, de même pour la p-value de l'effet semaine de supplémentation.



**Figure 2 :** Poids (kg, mesure journalière), production laitière (kg/j), MS ingérée (kg/j) et bilan énergétique (UFL/j) pour les vaches n-3 (bleu) et n-6 (vert), moyennes estimées  $\pm$  SEM

## 2. RESULTATS

### 2.1. PARAMETRES ZOOTECHNIQUES

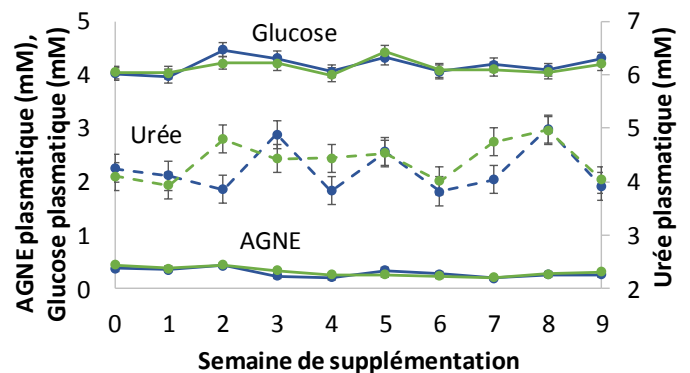
Le début de la supplémentation a eu lieu en moyenne à 11,2  $\pm$  0,3 semaines après vêlage, sans différence entre les groupes témoins n-6 et n-3 (test t,  $p = 0,7462$ ). Aucune différence n'a été trouvée entre les 2 groupes n-3 et n-6, que ce soit pour le poids vif, la production laitière, la MS ingérée ou le bilan énergétique (Figure 2). Pendant la période de supplémentation étudiée, le poids vif était en moyenne de 572,3  $\pm$  3,4 kg pour les vaches n-3 versus 573,5  $\pm$  3,3 kg pour les vaches n-6 (effet aliment,  $p = 0,7421$ ). La production laitière était de 28,5  $\pm$  1,5 kg/j pour les vaches n-3 versus 28,8  $\pm$  1,5 kg/j pour les vaches n-6 (effet aliment,  $p = 0,8069$ ). La MS ingérée était de 19,2  $\pm$  1,0 kg/j pour les vaches n-3 versus 19,4  $\pm$  1,0 kg/j pour les vaches n-6 (effet aliment,  $p = 0,8912$ ). Le bilan énergétique était de 0,4  $\pm$  0,7 UFL/j pour les vaches n-3 versus 0,7  $\pm$  0,7 UFL/j pour les vaches n-6 (effet aliment,  $p = 0,6192$ ). Pour ces 4 paramètres, l'effet sem. de suppl. a été significatif ( $p \leq 0,05$ ), sans interaction aliment x sem. de suppl.

### 2.2. PARAMETRES METABOLIQUES

Les paramètres métaboliques mesurés dans le plasma, (AGNE, glucose et urée) n'ont pas différencié entre les vaches n-3 et témoins n-6 pendant la période étudiée (Figure 3). En effet, les vaches n-3 avaient en moyenne une concentration d'AGNE de 0,30  $\pm$  0,02 mM contre 0,32  $\pm$  0,02 mM pour les vaches témoins n-6 (effet aliment,  $p = 0,2911$ ). Le taux plasmatique de glucose était en moyenne de 4,18  $\pm$  0,05 mM chez les vaches n-3 contre 4,13  $\pm$  0,05 chez les vaches témoins n-6 (effet aliment,  $p = 0,4925$ ). Le taux plasmatique d'urée n'était pas non plus différent (effet aliment,  $p = 0,1834$ ) entre les vaches n-3 (4,23  $\pm$  0,17 mM) et les vaches n-6 (4,40  $\pm$  0,17 mM). Pour ces 3 paramètres, l'effet sem. de suppl. a été significatif ( $p \leq 0,05$ ), sans interaction aliment x sem. de suppl. sauf pour l'urée (interaction,  $p = 0,0025$ ).

La composition en AG (en % des AG totaux) a été mesurée dans le plasma afin de vérifier l'effet de la supplémentation en AGPI, et dans le liquide folliculaire afin de voir comment la composition de ce compartiment ovarien est affectée par la supplémentation (Tableau 1). La majorité des paramètres mesurés (13/16) ont varié au cours du temps (effet sem. de suppl.  $p < 0,05$ ). Chez les vaches n-3, après seulement 2 sem. de suppl., une augmentation significative a été observée dans le plasma, par rapport à la période avant supplémentation : x 2,0 ( $p < 0,0001$ ) pour l'acide eicosapentaénoïque (EPA), x 2,1 ( $p < 0,0001$ ) pour l'acide docosahexaénoïque (DHA) et x 1,2 ( $p < 0,0001$ ) pour la somme des AGPI n-3 (avec effet sem. de suppl.  $p < 0,0001$ ,  $p < 0,0001$  et  $p = 0,0033$ , respectivement pour ces 3 paramètres). Cela valide ainsi l'efficacité de la supplémentation. Pour l'EPA et les AGPI n-3 totaux, un effet aliment a été observé ( $p < 0,0001$ ) : le niveau dans le plasma à 2 sem. de suppl. a été respectivement 1,7

fois ( $p < 0,0001$ ) et 1,2 fois ( $p = 0,0002$ ) plus élevé chez les vaches n-3 par rapport aux vaches n-6, et le niveau dans le liquide folliculaire à 5 sem. de suppl. a été respectivement 1,8 fois ( $p < 0,0001$ ) et 1,3 fois ( $p < 0,0001$ ) plus élevé chez les vaches n-3 par rapport aux vaches n-6. Cet effet était déjà observé pour l'EPA (augmentation de 1,3 fois) dès 2 sem. de suppl. dans le liquide folliculaire ( $p = 0,0344$ ). Dans le cas du DHA, le niveau dans le plasma est 1,6 fois ( $p = 0,0298$ ) plus élevé chez les vaches n-3 par rapport aux vaches n-6, cet effet était déjà observé en tendance à 5 sem. de suppl. ( $p = 0,0534$ ). En revanche, aucune différence de DHA n'a été trouvée dans le liquide folliculaire entre les vaches n-3 et n-6. Concernant les AGPI n-6 totaux (effet aliment,  $p = 0,0081$ ), une tendance à une augmentation de 1,1 fois a été observée dans le plasma des vaches n-6 à 2 sem. de suppl. ( $p = 0,0833$ ), et cette augmentation de 1,1 fois a été significative à 5 sem. de suppl. ( $p = 0,0039$ ). Chez les vaches n-3, le ratio AGPI n-6 / AGPI n-3 (effet aliment,  $p = 0,0010$ ) a été significativement 1,3 fois plus faible dans le plasma à 5 sem. de suppl. ( $p = 0,0425$ ) et 1,6 fois plus faible à 7 sem. de suppl. dans le liquide folliculaire ( $p = 0,0052$ ), par rapport aux vaches n-6. Pour ces 5 paramètres (EPA, DHA, AGPI n-3, AGPI n-6 et ratio n-6/n-3), l'interaction aliment x sem. de suppl. a été significative.



**Figure 3 :** Concentrations en glucose, urée et AGNE plasmatiques (mM) pour les vaches n-3 (bleu) et n-6 (vert), semaine 0 = jour de début de supplémentation, moyennes estimées  $\pm$  SEM

### 2.3. PRODUCTION D'EMBRYONS

Trois sessions de production d'embryons par OPU-FIV ont été effectuées pour 18 vaches n-3 et 19 vaches témoins n-6, soit au total 54 et 57 sessions de production d'embryons et 1462 et 1538 follicules ponctionnés, respectivement. Le nombre moyen de follicules ponctionnés par session d'OPU n'a pas été différent (effet aliment,  $p = 0,8196$ ) entre les vaches n-3 (26,7  $\pm$  4,3) et les vaches n-6 (26,1  $\pm$  4,3). Un taux de récupération de complexes ovocyte-cumulus (COC) significativement plus élevé (effet aliment,  $p = 0,0035$ ) a été obtenu chez les vaches n-3 (38,0  $\pm$  1,6 %) comparé aux vaches n-6 (32,8  $\pm$  1,6 %) (Tableau 2).

**Tableau 1** : Composition en acides gras (AG) du plasma (PI) et du liquide folliculaire (LF), exprimée en % par rapport au total des AG, moyennes estimées  $\pm$  SEM, p-value de l'effet aliment dans le modèle

% acides gras		avant supplémentation		2 sem. de suppl.		5 sem. de suppl.		7 sem. de suppl.		P effet aliment
		n-3	n-6	n-3	n-6	n-3	n-6	n-3	n-6	
saturés	PI	37,7 $\pm$ 3,2	38,6 $\pm$ 3,2	39,2 $\pm$ 3,2	38,1 $\pm$ 3,2	37,0 $\pm$ 3,2	35,4 $\pm$ 3,2	37,3 $\pm$ 3,2	36,2 $\pm$ 3,2	0,3840
	LF			43,7 $\pm$ 7,8	41,8 $\pm$ 7,8	41,8 $\pm$ 7,8	43,5 $\pm$ 7,8	42,2 $\pm$ 7,8	44,1 $\pm$ 7,8	0,8058
mono-insaturés	PI	16,9 $\pm$ 0,9	17,4 $\pm$ 0,9	16,4 $\pm$ 0,9	16,2 $\pm$ 0,9	14,2 $\pm$ 0,9	13,2 $\pm$ 0,9	14,3 $\pm$ 0,9 *	12,1 $\pm$ 0,9	0,1022
	LF			16,9 $\pm$ 1,5	16,9 $\pm$ 1,5	15,1 $\pm$ 1,5 #	13,1 $\pm$ 1,5	13,9 $\pm$ 1,5	12,8 $\pm$ 1,5	0,2839
AGPI n-6	PI	39,7 $\pm$ 3,5	37,9 $\pm$ 3,5	37,6 $\pm$ 3,5 #	40,1 $\pm$ 3,5	41,5 $\pm$ 3,5 *	45,7 $\pm$ 3,5	41,3 $\pm$ 3,5 *	46,2 $\pm$ 3,5	0,0081
	LF			33,7 $\pm$ 6,9	36,1 $\pm$ 6,9	36,2 $\pm$ 6,9	38,3 $\pm$ 6,9	37,2 $\pm$ 6,9	38,1 $\pm$ 6,9	0,3183
C20:5 EPA	PI	0,72 $\pm$ 0,15 *	0,84 $\pm$ 0,15	1,45 $\pm$ 0,15 *	0,85 $\pm$ 0,15	1,60 $\pm$ 0,15 *	0,82 $\pm$ 0,15	1,63 $\pm$ 0,15 *	0,78 $\pm$ 0,15	< 0,0001
	LF			1,06 $\pm$ 0,22 *	0,81 $\pm$ 0,22	1,41 $\pm$ 0,22 *	0,77 $\pm$ 0,22	1,51 $\pm$ 0,22 *	0,77 $\pm$ 0,22	< 0,0001
C22:6 n-3 DHA	PI	0,11 $\pm$ 0,04	0,18 $\pm$ 0,04	0,23 $\pm$ 0,04	0,22 $\pm$ 0,04	0,32 $\pm$ 0,04 #	0,21 $\pm$ 0,04	0,34 $\pm$ 0,04 *	0,21 $\pm$ 0,04	0,4164
	LF			0,22 $\pm$ 0,10	0,19 $\pm$ 0,10	0,32 $\pm$ 0,10	0,24 $\pm$ 0,10	0,32 $\pm$ 0,10	0,22 $\pm$ 0,10	0,1863
AGPI n-3	PI	5,7 $\pm$ 0,6 #	6,1 $\pm$ 0,6	6,8 $\pm$ 0,6 *	5,6 $\pm$ 0,6	7,3 $\pm$ 0,6 *	5,7 $\pm$ 0,6	7,2 $\pm$ 0,6 *	5,5 $\pm$ 0,6	< 0,0001
	LF			5,7 $\pm$ 1,1	5,1 $\pm$ 1,1	6,6 $\pm$ 1,1 *	5,1 $\pm$ 1,1	6,6 $\pm$ 1,1 *	4,8 $\pm$ 1,1	< 0,0001
AGPI	PI	45,4 $\pm$ 4,0	44,0 $\pm$ 4,0	44,4 $\pm$ 4,0	45,8 $\pm$ 4,0	48,8 $\pm$ 4,0 #	51,5 $\pm$ 4,0	48,5 $\pm$ 4,0 *	51,8 $\pm$ 4,0	0,1224
	LF			39,4 $\pm$ 7,9	41,2 $\pm$ 7,9	43,0 $\pm$ 7,9	43,3 $\pm$ 7,9	44,0 $\pm$ 7,9	43,0 $\pm$ 7,9	0,8310
AG n-6 / AG n-3	PI	7,7 $\pm$ 0,4 *	6,3 $\pm$ 0,4	5,5 $\pm$ 0,4 *	7,2 $\pm$ 0,4	5,9 $\pm$ 0,5 *	8,2 $\pm$ 0,4	6,2 $\pm$ 0,4 *	8,6 $\pm$ 0,4	0,0010
	LF			5,9 $\pm$ 1,0	7,2 $\pm$ 1,0	5,6 $\pm$ 1,0	7,6 $\pm$ 1,0	6,5 $\pm$ 1,0 *	10,3 $\pm$ 1,0	0,0003

EPA : acide eicosapentaénoïque; DHA: acide docosahexaénoïque; # indique une tendance ( $p < 0.1$ ) et \* une différence significative ( $p < 0.05$ )

Cela correspond à 10,2  $\pm$  1,3 ovocytes récupérés par session d'OPU pour les vaches n-3 versus 8,5  $\pm$  1,3 pour les vaches n-6 (effet aliment,  $p = 0,2297$ ). Une tendance à un taux d'embryons clivés (> 2 cellules) plus faible ( $p = 0,1033$ ) a été observée chez les vaches n-3 (77,3  $\pm$  3,8 %) comparé aux vaches n-6 (82,3  $\pm$  3,3 %) (Tableau 2), ce qui correspond à 5,8  $\pm$  1,0 embryons clivés pour les vaches n-3 versus 5,0  $\pm$  1,0 pour les vaches témoins n-6 (effet aliment,  $p = 0,3597$ ). Une tendance à une augmentation du taux de blastocystes (effet aliment,  $p = 0,0865$ ) est également observée chez les vaches n-3, 49,6  $\pm$  5,5 %, versus 42,3  $\pm$  5,5 % (Tableau 2), soit 2,8  $\pm$  0,6 blastocystes par session d'OPU pour les vaches n-3 versus 2,2  $\pm$  0,6 blastocystes pour les vaches témoins n-6 (effet aliment,  $p = 0,2136$ ). Cette tendance n'a été observée que lors de l'OPU1 ( $p = 0,1024$ ). Les blastocystes ont également été évalués morphologiquement selon leur qualité, entre des blastocystes « congelables » considérés de bonne qualité (Q1 et Q2), et des blastocystes de moindre qualité (Q3 et Q4). Une augmentation significative (effet aliment,  $p = 0,0217$ ) du taux de blastocystes Q1-Q2 est observée chez les vaches n-3 (42,2  $\pm$  7,7 %) comparé aux vaches n-6 (32,7  $\pm$  7,7 %) (Tableau 2), ce qui correspond à 2,5  $\pm$  0,5 embryons Q1-Q2 chez les vaches n-3 versus 1,8  $\pm$  0,5 chez les vaches témoins n-6 (effet lot,  $p = 0,1527$ ). Cette différence a été significative ( $p = 0,0447$ ) lors de l'OPU2 et observée avec une tendance ( $p = 0,0773$ ) lors de l'OPU1. Aucune différence n'a été observée lors de l'OPU3, soit après 7 semaines de supplémentation. En effet, les taux de développement embryonnaire des vaches n-3 ont été maintenus aux mêmes niveaux que lors des sessions d'OPU précédentes, et ne sont alors plus différents de ceux des vaches n-6. Concernant les taux de développement

embryonnaire, aucun paramètre n'a montré d'effet sem. de suppl., à l'exception du taux de COC récupérés ( $p = 0,0054$ ) ni d'interaction (aliment x sem. de suppl.). Concernant les nombres d'embryons produits par session d'OPU, aucun paramètre n'a montré d'effet sem. de suppl. ni d'interaction.

### 3. DISCUSSION

Ce travail est à notre connaissance le premier à tester, chez la vache laitière, si l'effet d'une supplémentation en AGPI n-3 (comparée à une ration témoin supplémentée en AGPI n-6) sur la production d'embryons *in vitro* est maintenu en conditions de superovulation et à tester différentes durées de supplémentation. Les résultats obtenus suggèrent qu'une supplémentation en AGPI n-3 permettrait d'améliorer la qualité des embryons produits et qu'une supplémentation courte de type flushing ( $\approx$  2 à 5 semaines) pourrait suffire pour obtenir les effets bénéfiques de la supplémentation (la durée pendant laquelle ces effets bénéfiques sont observés reste à déterminer). La supplémentation en AGPI n-3 utilisée n'a pas entraîné de modification des paramètres zootechniques (poids, production laitière, matière sèche ingérée, bilan énergétique) ni des paramètres métaboliques (niveaux plasmatiques d'AGNE, glucose, urée) mesurés, ce qui est cohérent avec le fait que les rations sont isoénergétiques, que la supplémentation est modérée et avec notre étude précédente (Elis et al. 2016). La modification de la composition en AG du plasma valide l'efficacité de la supplémentation chez la vache.

**Tableau 2** : Taux (%) et nombres moyens par session d'OPU-FIV (Nb) pour la récupération des COCs et la production d'embryons, moyennes estimées  $\pm$  SEM, p-value de l'effet aliment dans le modèle

MIV/FIV/DIV	n-3	n-6	2 sem. de suppl.		5 sem. de suppl.		7 sem. de suppl.		P effet aliment
			n-3	n-6	n-3	n-6	n-3	n-6	
% COC récupérés	38,0 $\pm$ 1,6 *	32,8 $\pm$ 1,6	42,0 $\pm$ 2,5 #	36,5 $\pm$ 2,5	38,4 $\pm$ 2,4 *	31,2 $\pm$ 2,2	33,7 $\pm$ 2,4	30,8 $\pm$ 2,2	0,0035
% Ovo. mis en MIV	76,1 $\pm$ 2,5	73,0 $\pm$ 2,8	73,3 $\pm$ 3,6	70,9 $\pm$ 4,1	79,0 $\pm$ 3,4 *	68,6 $\pm$ 4,2	75,7 $\pm$ 3,9	78,7 $\pm$ 3,6	0,2586
% Embryons clivés	77,3 $\pm$ 3,8 #	82,3 $\pm$ 3,3	76,6 $\pm$ 4,8	84,7 $\pm$ 4,2	71,3 $\pm$ 5,2	79,3 $\pm$ 5,0	83,0 $\pm$ 4,4	82,7 $\pm$ 4,3	0,1033
% Emb. >4 cellules	53,6 $\pm$ 4,1	55,8 $\pm$ 4,2	50,7 $\pm$ 5,3	54,6 $\pm$ 5,8	50,8 $\pm$ 5,2	54,1 $\pm$ 5,8	59,3 $\pm$ 5,7	54,3 $\pm$ 5,4	0,5649
% Blastocystes	49,6 $\pm$ 5,5 #	42,3 $\pm$ 5,5	48,5 $\pm$ 6,7 #	37,0 $\pm$ 6,6	52,3 $\pm$ 6,8	43,2 $\pm$ 7,2	47,8 $\pm$ 7,0	46,9 $\pm$ 6,8	0,0865
% Blasto. Q1-Q2	42,2 $\pm$ 7,7 *	32,7 $\pm$ 7,1	42,2 $\pm$ 8,6 #	30,0 $\pm$ 7,8	43,7 $\pm$ 8,8 *	29,3 $\pm$ 7,9	40,7 $\pm$ 8,9	39,2 $\pm$ 8,6	0,0217
Nb follic. ponct.	26,7 $\pm$ 4,3	26,1 $\pm$ 4,3	26,5 $\pm$ 4,5	22,5 $\pm$ 4,4	28,1 $\pm$ 4,5	27,5 $\pm$ 4,4	25,7 $\pm$ 4,5	28,3 $\pm$ 4,4	0,8196
Nb COC récupérés	10,2 $\pm$ 1,3	8,5 $\pm$ 1,3	11,1 $\pm$ 1,5	8,3 $\pm$ 1,5	10,8 $\pm$ 1,5	8,6 $\pm$ 1,5	8,6 $\pm$ 1,5	8,7 $\pm$ 1,5	0,2297
Nb ovo. mis en MIV	7,8 $\pm$ 1,1	6,2 $\pm$ 1,1	8,2 $\pm$ 1,3	5,8 $\pm$ 1,3	8,6 $\pm$ 1,3	5,9 $\pm$ 1,3	6,6 $\pm$ 1,3	6,8 $\pm$ 1,3	0,1729
Nb Embryons clivés	5,8 $\pm$ 1,0	5,0 $\pm$ 1,0	6,0 $\pm$ 1,1	4,7 $\pm$ 1,1	6,1 $\pm$ 1,1	4,5 $\pm$ 1,1	5,4 $\pm$ 1,1	5,7 $\pm$ 1,1	0,3597
Nb Emb. > 4-cellules	4,1 $\pm$ 0,8	3,4 $\pm$ 0,8	4,1 $\pm$ 0,9	3,1 $\pm$ 0,9	4,4 $\pm$ 0,9	3,2 $\pm$ 0,9	3,7 $\pm$ 0,9	4,1 $\pm$ 0,9	0,4297
Nb Blastocystes	2,8 $\pm$ 0,6	2,2 $\pm$ 0,6	3,0 $\pm$ 0,7	1,8 $\pm$ 0,7	3,1 $\pm$ 0,7	1,9 $\pm$ 0,7	2,5 $\pm$ 0,7	2,8 $\pm$ 0,7	0,2136
Nb Blasto. Q1-Q2	2,5 $\pm$ 0,5	1,8 $\pm$ 0,5	2,6 $\pm$ 0,6	1,6 $\pm$ 0,6	2,6 $\pm$ 0,6	1,3 $\pm$ 0,6	2,1 $\pm$ 0,6	2,4 $\pm$ 0,6	0,1527

Sem : semaine ; COC : complexe ovocyte-cumulus, le taux de COC récupérés est un ratio par rapport aux follicules ponctionnés ; le taux de COC en MIV est un ratio par rapport aux COC récupérés ; les taux d'embryons clivés (> 2 cellules) et d'embryons > 4 cellules sont des ratios par rapport aux COC mis en MIV ; les taux de blastocystes et de blastocystes Q1-Q2 sont des ratios par rapport aux embryons clivés

En effet, comme dans notre étude précédente (Elis et al. 2016), des augmentations significatives d'EPA et de DHA plasmatiques sont observées entre les groupes expérimentaux. Cette présente étude a également pu montrer que les variations de composition d'AG plasmatiques se traduisent par des variations similaires dans le liquide folliculaire, ce qui est cohérent avec la littérature (Childs et al. 2008 ; Moallem et al. 2013). Ces variations ne sont cependant pas observées aussi rapidement que dans le plasma où elles apparaissent dès 2 semaines de supplémentation.

Concernant les résultats de production d'embryons, une augmentation du taux de blastocystes, notamment de bonne qualité, a été observée. Cette augmentation est cohérente avec la littérature qui rapporte un effet positif d'une supplémentation en AGPI n-3 sur la gestation [pour revue (Moallem 2018)]. En effet, la supplémentation semble améliorer les taux de gestation (Ambrose et al. 2006 ; Petit et al. 2007 ; Dirandeh et al. 2013 ; Sinedino et al. 2017) en jouant non seulement sur l'implantation de l'embryon (Mattos et al. 2004), mais également en affectant la qualité de l'ovocyte (Elis et al. 2016). D'autres études ont d'ailleurs été menées sur les effets d'une supplémentation en AGPI n-3 sur la production d'embryons, sans superovulation. Une augmentation du taux de clivage a ainsi été rapportée suite à une supplémentation en graines de lin (Zachut et al. 2010) et en huile de poisson (Moallem et al. 2013). Ces résultats sont également cohérents avec des résultats *in vitro* de supplémentation du milieu de maturation avec des AGPI n-3, notamment le DHA, conduisant à une augmentation du taux de blastocystes (Osekria et al. 2016 ; Elis et al. 2017). Il serait d'ailleurs intéressant de tester si la supplémentation des vaches donneuses d'ovocytes, couplée à la supplémentation du milieu de maturation des ovocytes, pourrait permettre d'optimiser la production d'embryons.

Les augmentations observées dans la présente étude sont modérées, mais les résultats sont néanmoins intéressants, car ils ont été obtenus en conditions de superovulation, dans lesquelles l'effet aurait pu être complètement perdu à cause de la forte stimulation ovarienne. De plus, le témoin utilisé dans notre étude, un AGPI n-6, est le témoin optimal pour être sûr que l'effet observé est bien dû à un AGPI n-3. En effet lorsque le témoin est un AG saturé, l'effet observé peut être lié au fait qu'il s'agisse d'un AGPI, mais pas spécifiquement d'un AGPI n-3. En revanche, ce témoin AGPI n-6 présentant des effets similaires aux AGPI n-3, il est plus difficile d'observer des différences significatives (Leroy et al. 2014). Ainsi les études précédemment citées portant sur la production d'embryons ont mis en évidence des augmentations du taux de clivage comparé au témoin AG saturé (Zachut et al. 2010 ; Moallem et al. 2013), mais une absence de différence comparé au groupe AGPI n-6 (Zachut et al. 2010).

Aucune différence du nombre de follicules ponctionnés n'a été observée dans notre étude, ce qui était attendu, car même si une supplémentation en AGPI n-3 est décrite pour augmenter la population folliculaire (Petit et al. 2002 ; Bilby et al. 2006 ; Zachut et al. 2010), ce même effet est observé avec les AGPI n-6 (pour revue : Leroy et al. 2014). De même, aucun des paramètres mesurés n'a différé entre les vaches n-3 et n-6 lors de l'OPU3 (7 semaines de supplémentation). Pour cette durée de supplémentation, une augmentation significative des AGPI n-6 est observée chez les vaches n-6, ce qui pourrait suggérer que des effets bénéfiques sont observés sur les taux de production d'embryons dans les 2 groupes sans pouvoir les différencier. Même si l'inclusion d'un troisième groupe expérimental (témoin AG saturé) n'était pas réalisable, la présence d'un tel groupe aurait pu éclairer les résultats obtenus.

Concernant la durée de supplémentation, notre étude suggère, même si cela nécessite d'être confirmé, qu'une durée courte de supplémentation ( $\approx$  2 à 5 semaines) serait suffisante pour obtenir des effets bénéfiques sur la production d'embryons. En effet, une supplémentation plus longue n'a pas conduit dans

notre étude à des taux d'embryons plus élevés. Une durée courte de supplémentation en ferait un levier utilisable sur le terrain, en limitant le coût de supplémentation ( $\approx$  3,6 €/jour). Enfin, une augmentation du taux de COC récupérés a également été observée chez les vaches n-3. Même s'il n'y a pas d'explication directe à cette observation, le nombre important de follicules ponctionnés suggère que cette différence est réelle et pose l'hypothèse de potentielles différences dans la structure physique des COC, qui leur confèreraient des propriétés d'élasticité ou de résistance à l'aspiration, permettant un taux de récupération supérieur. Ces différences pourraient potentiellement être liées à une différence de composition des membranes (Calder 2015).

## CONCLUSION

En conclusion, cette étude est la première à montrer un effet bénéfique d'une supplémentation en AGPI n-3 sur la production d'embryons en conditions de superovulation et par rapport à un témoin AGPI n-6. Une supplémentation en AGPI n-3 permettrait donc d'augmenter de 1,3 fois les taux de blastocystes (notamment de bonne qualité). De plus, une supplémentation courte de type flushing (2 à 5 semaines) pourrait suffire à observer les effets bénéfiques de la supplémentation. Des études ultérieures sont nécessaires pour préciser la durée minimale de supplémentation nécessaire et la durée d'observation des effets bénéfiques, ainsi que pour tester si la supplémentation des vaches donneuses d'ovocytes couplée à la supplémentation du milieu de maturation *in vitro* des ovocytes pourraient apporter un bénéfice supplémentaire.

*Ces travaux ont été financés par l'INRA et la Région Centre-Val de Loire (Projet Bovoméga3, APR Intérêt Régional 2014). Nous remercions le personnel des unités UEPAO à Nouzilly (Mickael Delanoue, Christophe Mouaze, Ludovic Métivier et Damien Capo) et PEGASE à Rennes (Sophie Daré).*

**Ambrose D.J., Kastelic J.P., Corbett R., Pitney P.A., Petit H. V. et al. 2006.** J. Dairy Sci. 89:3066-3074.

**Bilby, T.R., Sozzi, A., Lopez, M.M., Silvestre, F.T., Ealy, A.D., et al. 2006.** J.Dairy Sci. 89, 3360–3374.

**Calder P. 2015.** J Parenter. Enter. Nutr. 39 : 18-32

**Childs S., Hennessy A.A., Sreenan J.M., Wathes D.C., Cheng Z. et al. 2008.** Theriogenology 70:595-611.

**Dirandeh E., Towhidi A., Zeinoaldini S., Ganjkanlou M., Pirsaraei Z.A. et al. 2013a.** J. Anim. Sci. 91 : 713-721.

**Dirandeh E., Towhidi A., Pirsaraei Z.A., Hashemi F.A., Ganjkanlou M. et al. 2013b.** Theriogenology. 80 :131-137

**Elis S., Freret S., et al. 2016.** J. Anim. Reprod. 164 : 121-132.

**Elis S., Osekria M., et al. 2017.** J. Ovarian Research. 10: 74

**INRA. 2007.** Alimentation des bovins, ovins et caprins : Besoins des animaux - Valeurs des aliments. Paris, France : Quae éditions  
**Le Mezec P. 2017. Fertilité des principales races laitières – bilan 1999-2015.** Institut de l'Elevage Collection Résultats (CR n°0017 203 003, 47p)

**Leroy J., Sturmeijer R.G., Van Hoeck V., De Bie J., McKeegan P.J. et al. 2014.** Reprod. Domest. Anim. 49:353- 361.

**Mattos R., et al. 2000.** Rev. Reprod. 5:38-45.

**Mattos R., et al. 2004.** J. Dairy Sci. 87:921-932.

**Moallem U., Shafran A., Zachut M., Dekel I., Portnick Y. et al. 2013.** Reproduction 146:603-614.

**Moallem U. 2018.** J. Dairy Sci. Vol 101, n°10, in press

**Osekria M., Elis S., et al. 2016.** Theriogenology. 85 : 1625-1634.

**Petit H. V., Dewhurst R. J., et al. 2002.** J. Dairy Sci. 85:889-899

**SAS Institute Inc., 2013.** SAS/STAT 9.4 user's Guide, second ed. SASInstitute Inc., Cary, NC.

**Seegers H. 2008.** Le Nouveau Praticien Vétérinaire élevages et santé, vol. 2, n°10, 402-407.

**Sinedino LDP., Honda PM, et al. 2017.** Reproduction. 153: 707-723.

**Thangavelu G., Colazo M. G., Ambrose D. J., Oba M., Okine E. K. et al. 2007.** Theriogenology 68:949-957.

**Zachut M., Dekel I., Lehrer H., Arieli A., Arav A. et al. 2010.** J. Dairy Sci. 93:529-545.

