



Fin de l'élimination des poussins mâles : où en est-on dans la mise au point des méthodes de sexage in ovo et des autres alternatives

Joël GAUTRON et Sophie REHAULT-GODBERT
joel.gautron@inrae.fr, sophie.rehault-godbert@inrae.fr

Directeur (rice) de recherche
Research Directors
UMR BOA
(33) 2 47 42 75 40



PPILOW European project



PPILOW

INRAE
science for people, life & earth

Coordinator A. Collin
UMR BOA INRAE, France

Poultry and Pig Low-input and Organic production systems' Welfare



(2019-2024)

WP 5 Innovative alternatives of the elimination of one day old male layer chicks

The project PPILOW has received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement N°816172



INRAE

Ovosexage et alternatives à l'élimination des poussins mâles

26/05/2021 Académie d'Agriculture de France

Les lignées spécialisées pour l'aviculture



Pondeuses

(340 œufs par an)
Viande n'est pas commercialisable



ZW female chicken



~~ZZ male chicken~~

Production de viande

(<150 œufs par an)
Œufs de mauvaise qualité
non commercialisables



**6 milliards de mâles pondeuses éliminés
annuellement au niveau mondial**



Enjeux éthiques et de société



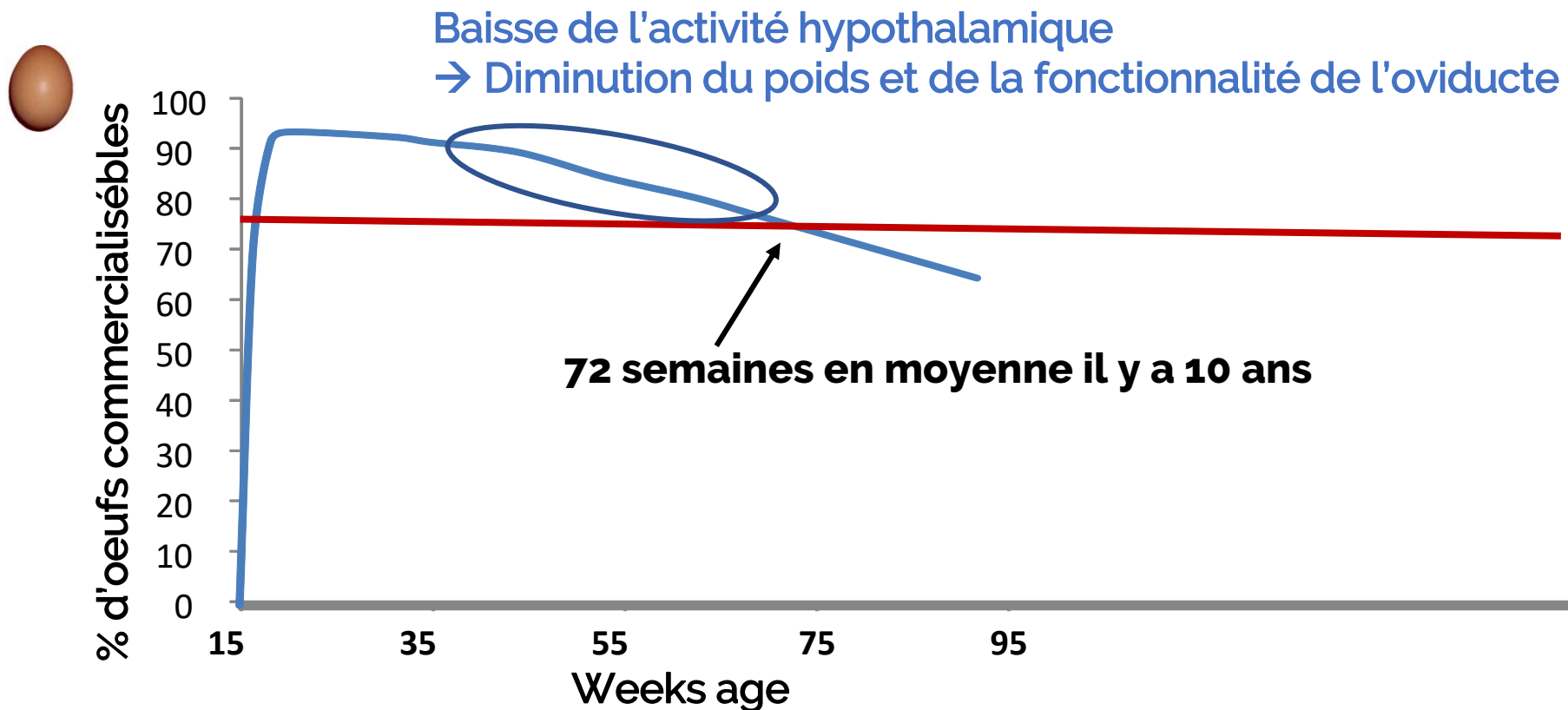
Alternatives ?

INRAE

Ovosexage et alternatives à l'élimination des poussins mâles

26/05/2021 Académie d'Agriculture de France

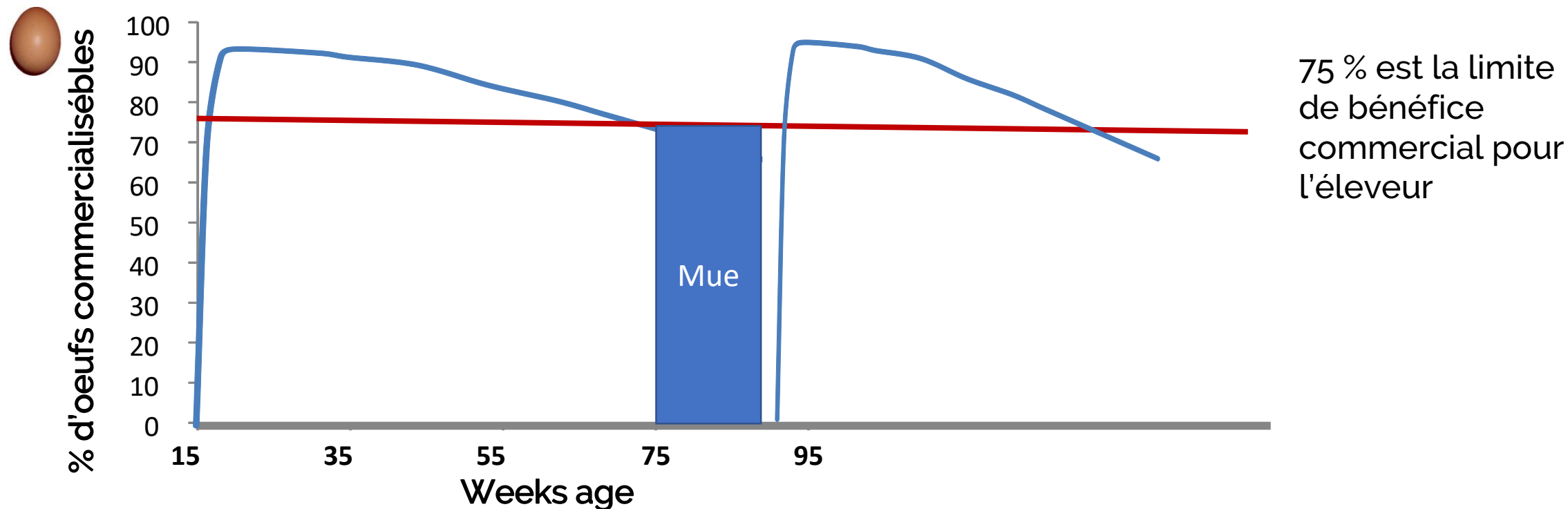
Réduire le nombre de pondeuses



Poids d'œufs avec une bonne valeur sur le marché de 53 à 73 g (le poids d'œuf augmente avec l'âge)

Réduire le nombre de pondeuses

✓ Utilisation de la mue



Second et troisième cycles de pontes sont possibles après la mue de la pondeuse

→ Nécessite une induction de la mue par privation d'eau et de nourriture

(réglementation européenne)

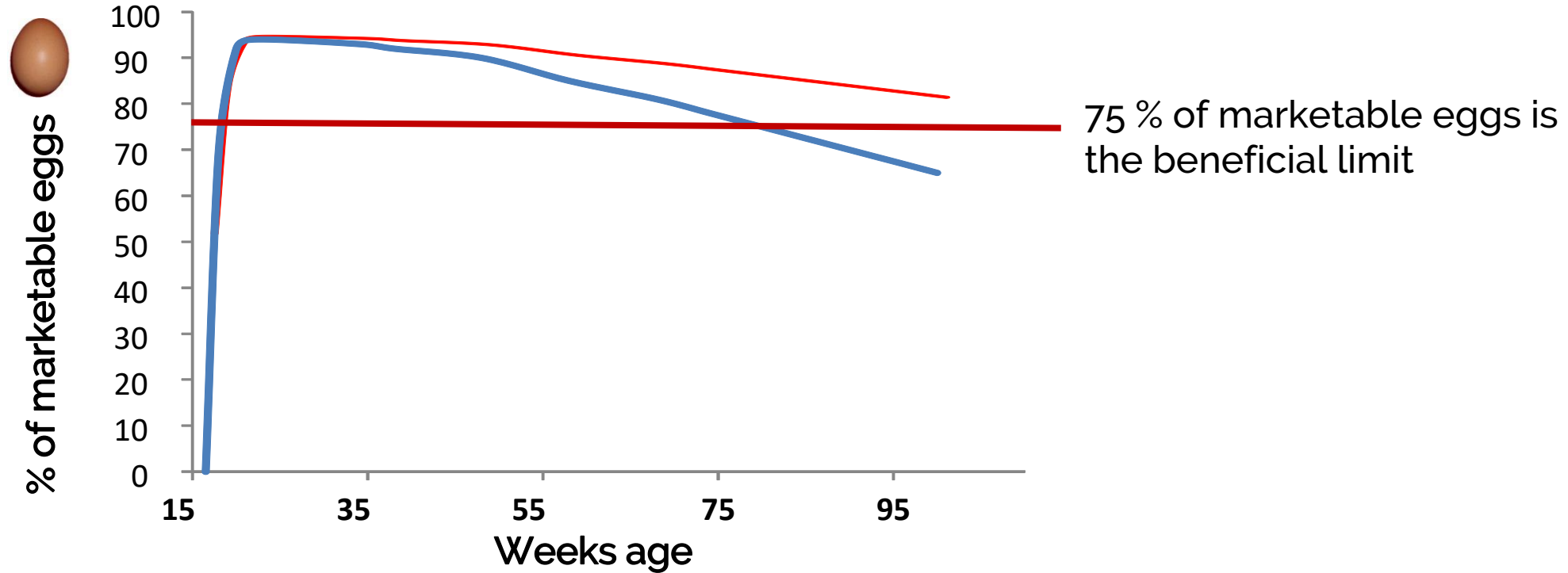
Efforts de recherches sont nécessaires pour induire la mue dans le respect du bien être animal.

INRAE

Ovosexage et alternatives à l'élimination des poussins mâles

26/05/2021 Académie d'Agriculture de France

Augmenter la persistance de ponte pour réduire le nombre de pondeuses



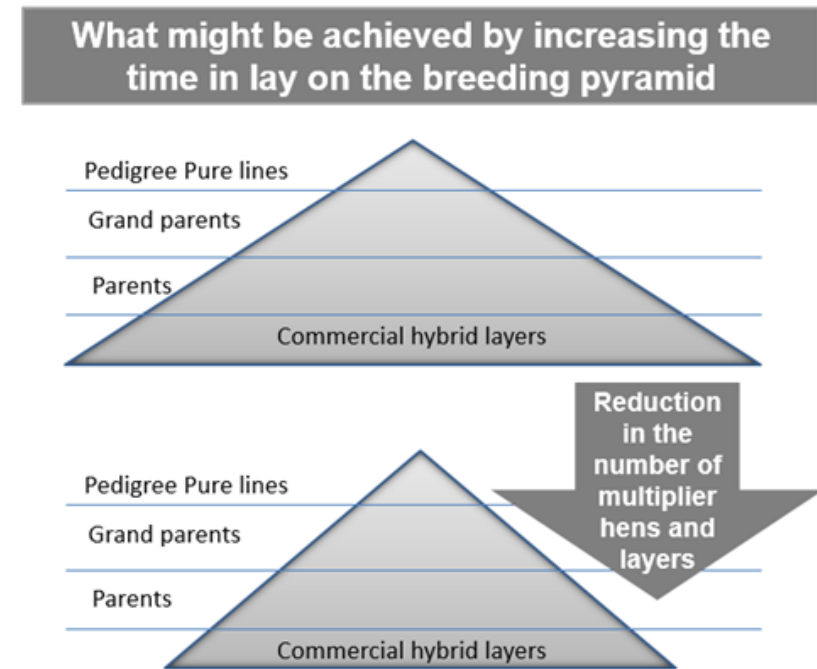
Augmenter la persistance de ponte pour réduire le nombre de pondeuses

Sélectionneurs ont déclaré en 2010 qu'ils développeraient des souches de 'pondeuses de longue vie' capables de produire 500 oeufs au cours d'un cycle de production de 100 semaines (Van Sambeek, 2010)

Bain et al., 2016 ont écrit « than even 25 more eggs per hen could potentially reduce the UK flock, including breeding hens by 2,5 millions birds per annum. »

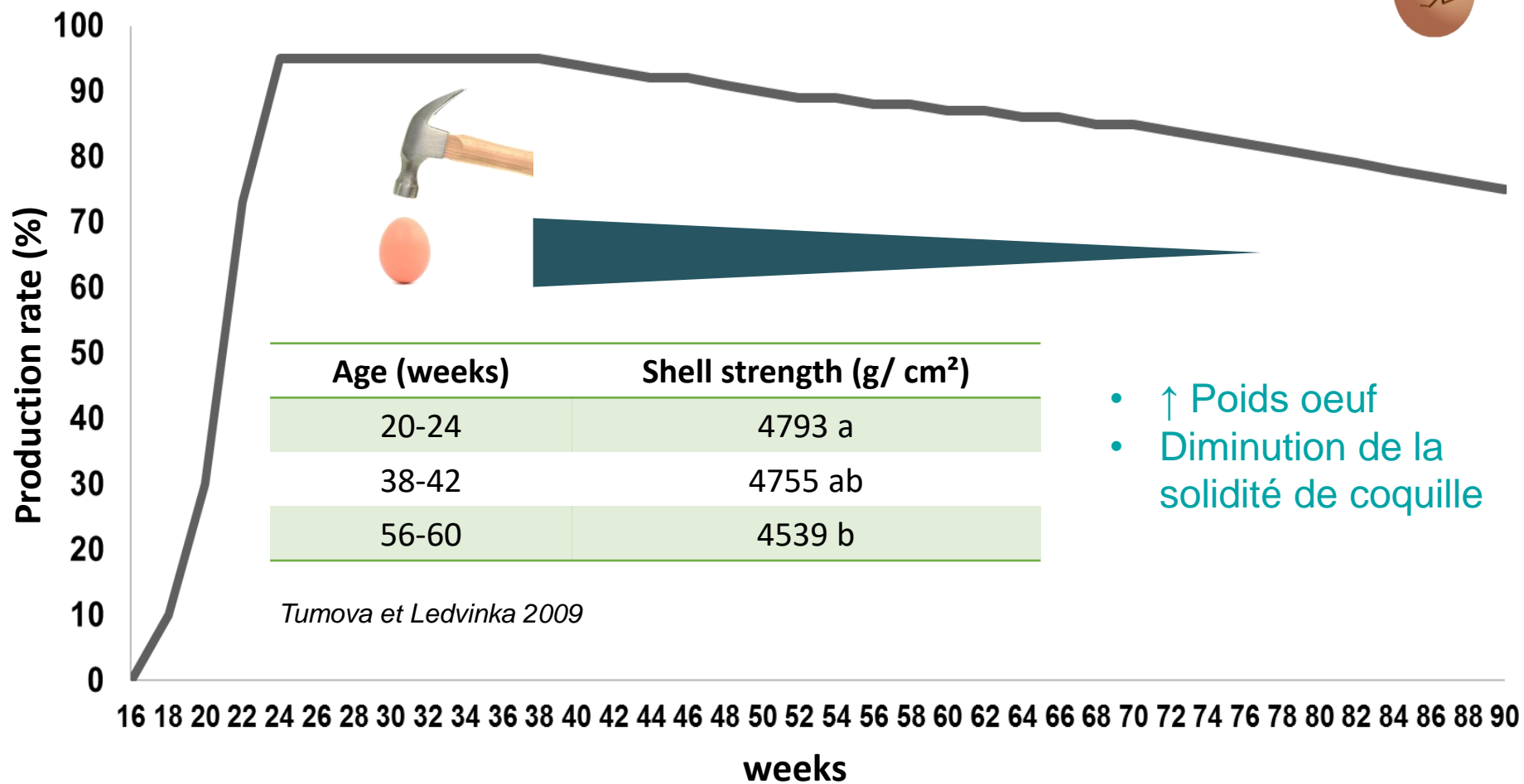
Limité par la charte sanitaire en France...

Réduit, mais n'évite pas l'abattage du poussin mâle

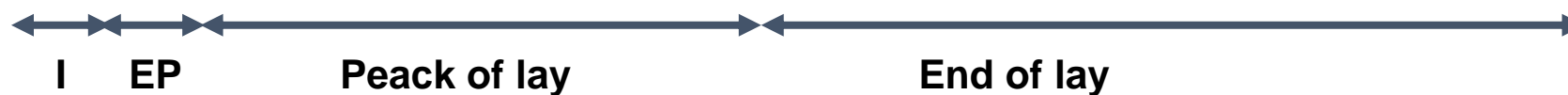


Bain et al., 2016; Gautron et al., 2021

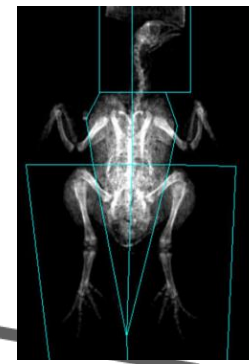
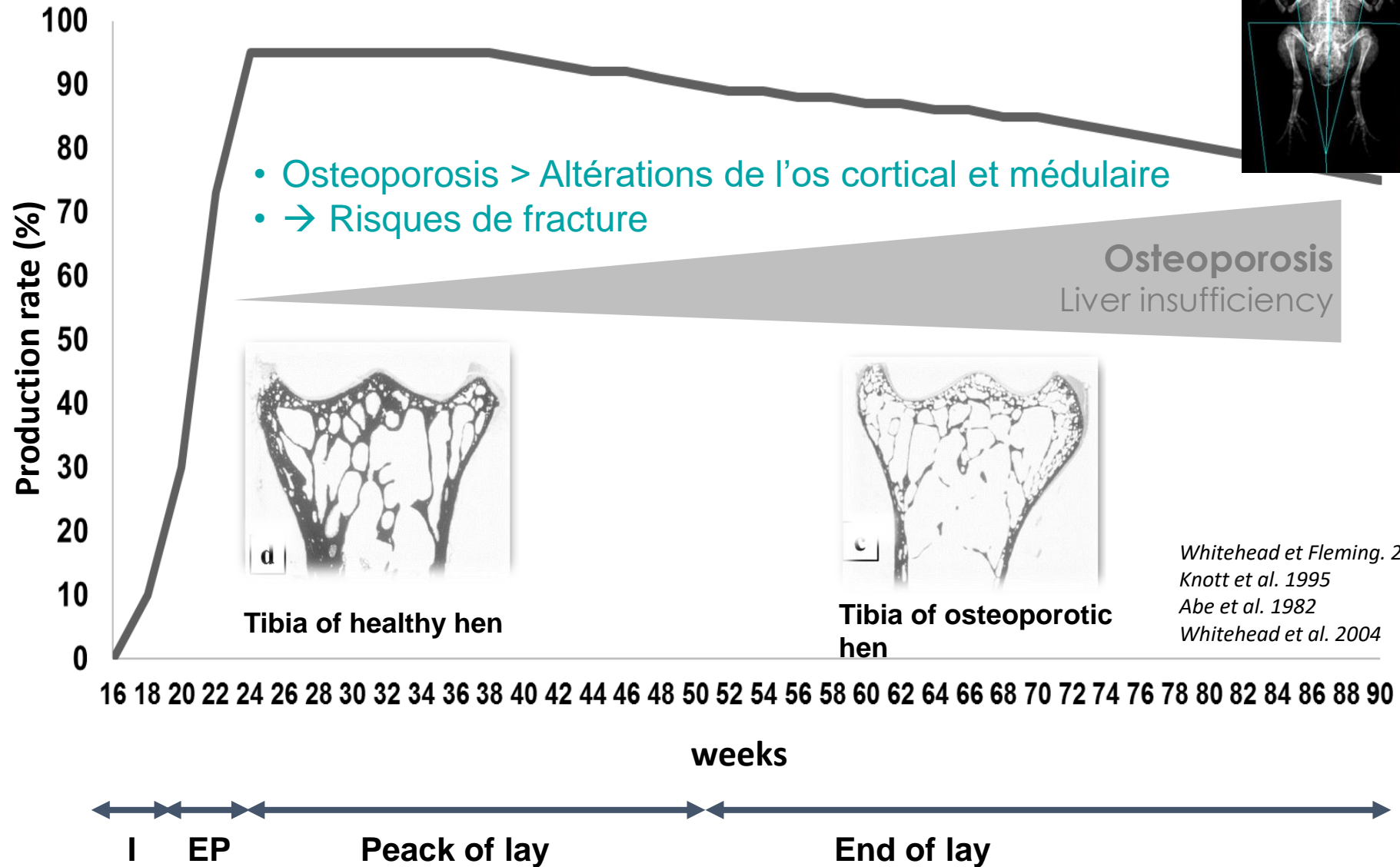
> Altérations à long terme



- ↑ Poids oeuf
- Diminution de la solidité de coquille



> Long-term alterations



Whitehead et Fleming. 2000
Knott et al. 1995
Abe et al. 1982
Whitehead et al. 2004

Souches double fin



Pondeuses
(340 œufs par an)
Viande n'est pas commercialisable



Production de viande
(<150 œufs par an)
Œufs de mauvaises qualité non commercialisables



Croisement

Elevage des femelles pour production d'œufs



Elevage des mâles pour la production de viande

Faible nombre d'œufs
Qualité ?



Faible rendement en viande
Texture de la viande (Education du consommateur)

Défavorable en termes d'impact environnemental

Nécessité d'évaluer la productivité, la qualité, le comportement des animaux dans les différents systèmes d'élevage et à différents environnements.

Questions en termes de santé et de coût économique.

Sexage *in ovo*

Repérer les œufs mâles (sexage *in ovo*) pour les éliminer avant éclosion

Postulat : les embryons mâles et les embryons femelles « expriment » des différences chromosomiques, anatomiques, physiologiques et moléculaires (**indicateurs / marqueurs directs**) et certaines de ces molécules peuvent diffuser dans les structures de l'œuf (**indicateurs / marqueurs indirects**)

Démarche initiale (invasive)

Etape 1: Déterminer le sexe de l'embryon

Etape 2: Rechercher des indicateurs / biomarqueurs sexuels dimorphiques (embryon / structures de l'œuf)

Etape 3: Valider les biomarqueurs sur un grand nombre d'œufs provenant de souches de poules pondeuses génétiquement différentes

→ **Vers une méthode pratique et commercialisable**

Sexage *in ovo*

Repérer les œufs mâles (sexage *in ovo*) pour les éliminer avant éclosion

→ Vers une méthode pratique et commercialisable

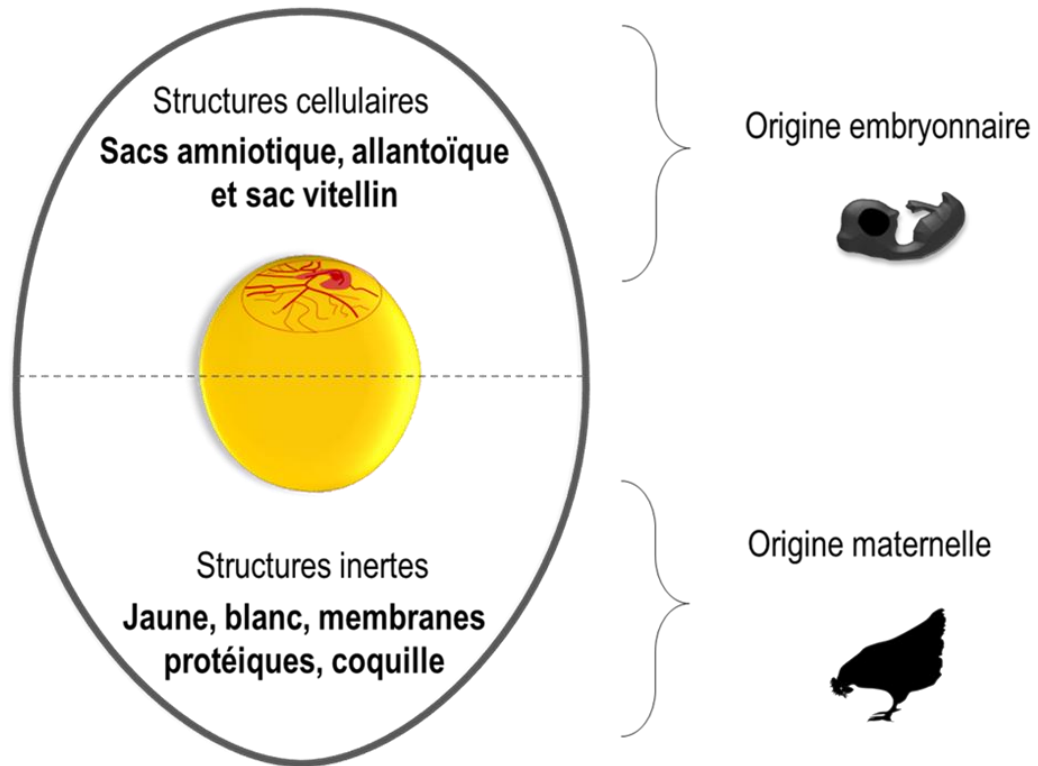
- ✓ Rapide (20 000 to 30 000 oeufs par heure)
- ✓ Peu chère
- ✓ Précise (>98.5 %)
- ✓ Sans consequence sur l'éclosabilité et la viabilité des poussins
- ✓ Faite avant toute sensation de douleur par l'embryon

→ Une course effrénée entre états, recherche et industrie pour trouver des solutions alternatives et toucher le jackpot.



Comment déterminer le sexe *in ovo*

Au cours du développement embryonnaire: activation du métabolisme embryonnaire et régulation de l'expression des gènes situés sur les chromosomes sexuels Z et W



→ Différences de profils moléculaires (chromosomes, ARNm : structures cellulaires) + protéines, métabolites, lipides, hormones : toutes structures)

→ Reflet d'une sécrétion, production et/ou assimilation différentes en fonction du sexe de l'embryon

Comment déterminer le sexe *in ovo*

Différence	Stade	Indicateur/biomarqueur	Contraintes
Chromosomique	E0 →	Taille des chromosomes Z et W et spécificité des gènes associés	Disponibilité des cellules (nombres) Invasivité des prélèvements
Moléculaire	? Variable en fonction de la structure d'intérêt et de son stade d'apparition	Expression de gènes, protéines, lipides, hormones, métabolites, substances volatiles	Nombre important de structures à explorer (œuf + embryon + structures extra-embryonnaires) Invasivité: dépend de la structure collectée Variabilité possible en fonction de la cinétique de croissance de l'embryon (stade optimal à déterminer par souche)
Anatomique	E7 →	Différence de développement de l'appareil reproducteur	Difficulté d'accès de manière non invasive
Physiologique/phénotypique	E13 →	Différence de couleur de plumes	Souches génétiques brunes, phénotype tardif



Comment déterminer le sexe *in ovo*

Méthodes actuelles et développements futurs

- Méthodes destructives et non destructives
- Approches marqueurs biologiques
 - Detection hormonale
 - detection metabolite spécifique du sexe
- Approches physicochimiques
 - Composés volatiles dimorphiques entre males et femelles
- Approches physiques et optiques
 - FTIR spectroscopy
 - Raman spectroscopy
 - Magnetic resonance imaging
 - Hyperspectral analysis
- Ingénierie génétique
 - Genome editing

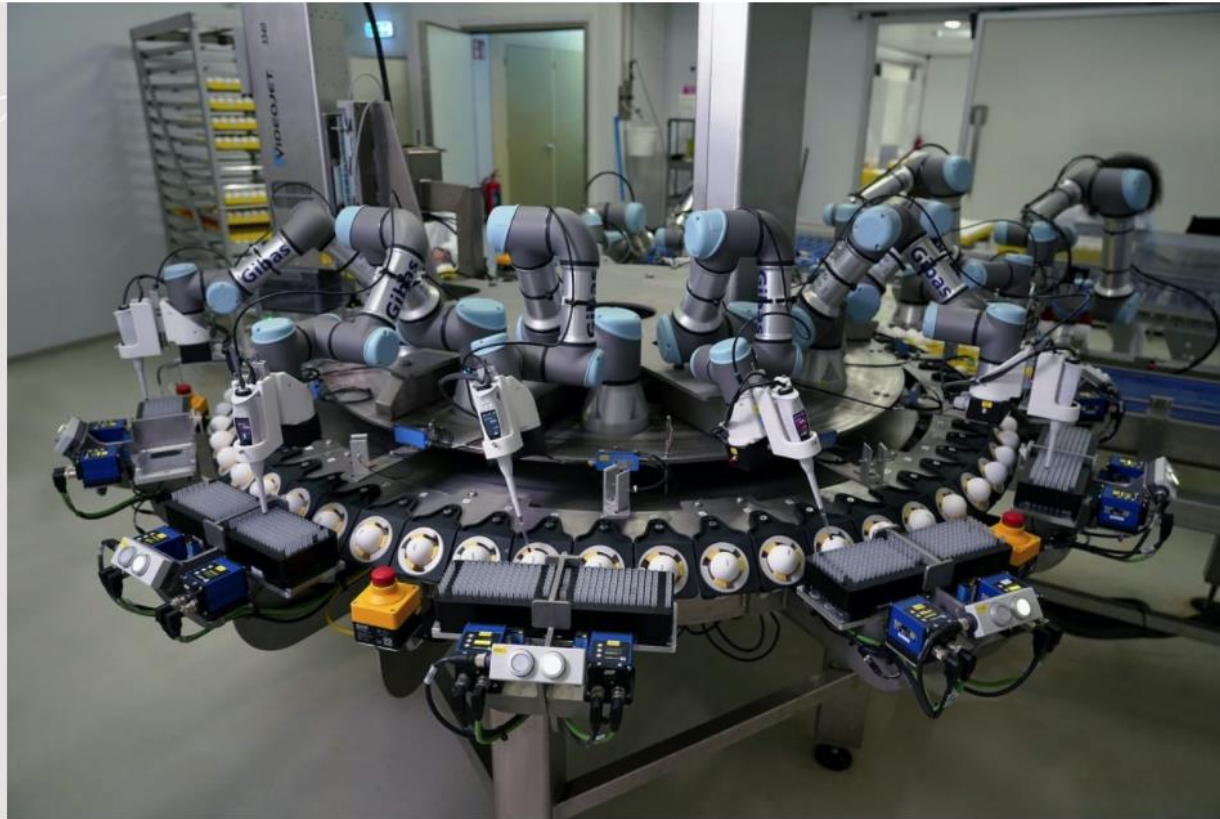


Comment déterminer le sexe *in ovo*



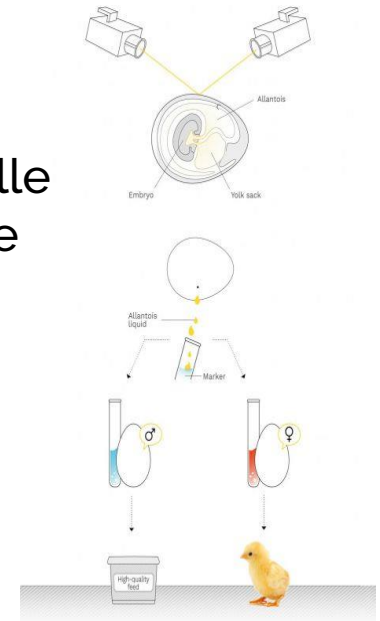
SELEGGT – Hormonal testing (<http://www.seleggt.com/>) (Allemagne)

THE SELEGGT PROCESS



The SELEGGT process is a way to prevent chick culling. The scientific approach of endocrinological (hormone-based) gender identification in the hatching egg has been automated in the SELEGGT process and is already in use today.

- ✓ 9 jours d'incubation
- ✓ Trou de 12 mm dans la coquille
- ✓ Mesure du niveau d'hormone sexuel (estrone sulfate) spécifique des femelles



- ✓ Précision 97-98%
- ✓ Prototype commercialisé
- ✓ Prix 1-3 cents per egg, 7 Euros par poulette
- ✓ Faible débit entre 1-3000 eggs/heure

INRAE

Ovosexage et alternatives à l'élimination des poussins mâles

26/05/2021 Académie d'Agriculture de France

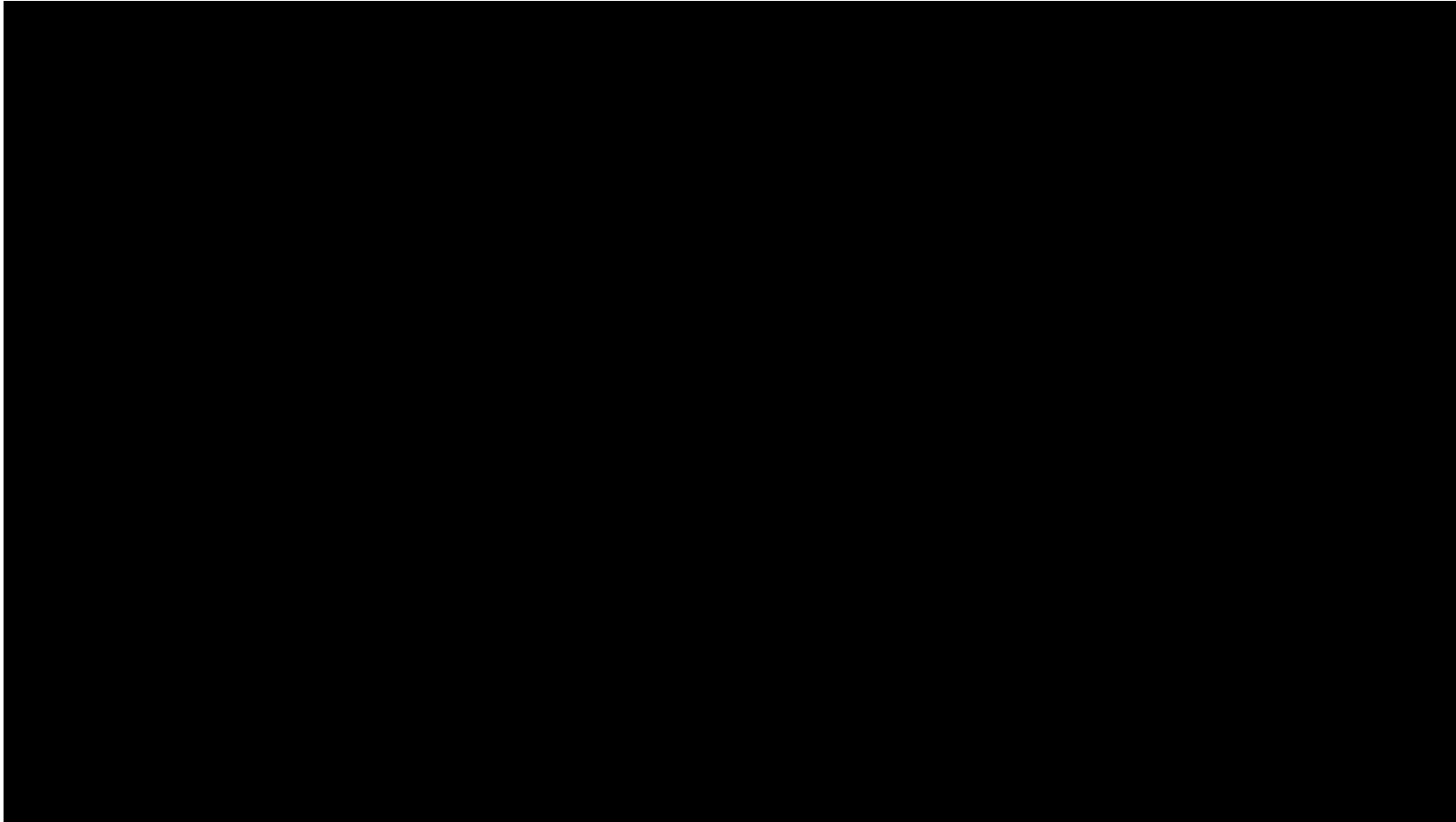
Comment déterminer le sexe *in ovo*



In ovo – Biomarker detection (<https://inovo.nl/solutions/in-ovo-egg-sexing/>) (Netherlands)

- ✓ H NRM spectroscopy
- ✓ Rapide 2 sec/oeuf

- ✓ Marketing
- ✓ Faible débit (1500 œufs/heure)



INRAE

Ovosexage et alternatives à l'élimination des poussins mâles

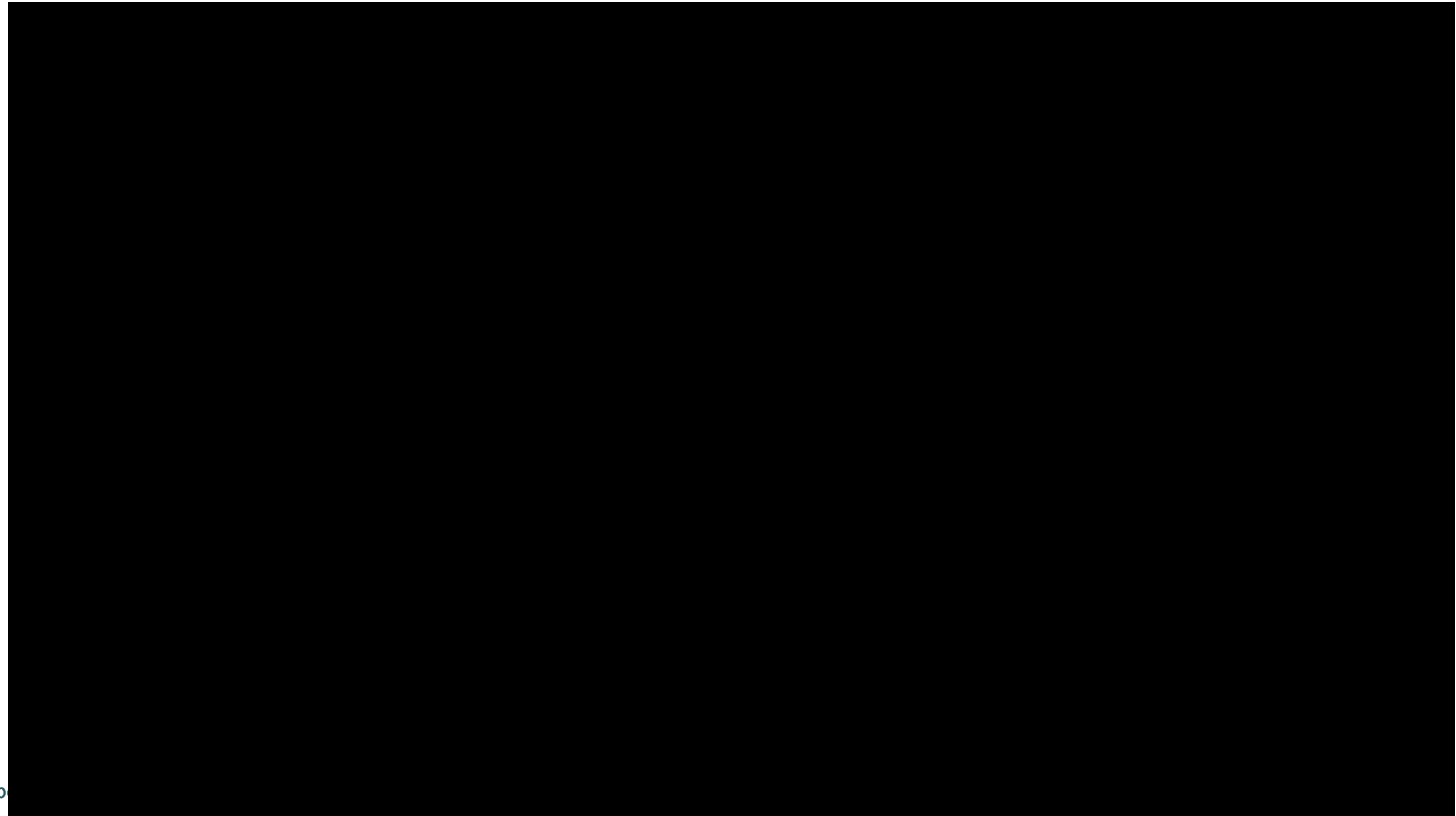
26/05/2021 Académie d'Agriculture de France

Comment déterminer le sexe *in ovo*



Agri Advanced Technologies CHEGGY (<https://www.agri-at.com/fr/produits/determination-du-sexe-in-ovo/cheggy/156-cheggy-downloads>) (Allemagne)

- ✓ Imagerie hyper-spectrale couleur des plumes
- ✓ 20 000 œufs/heure



INRAE

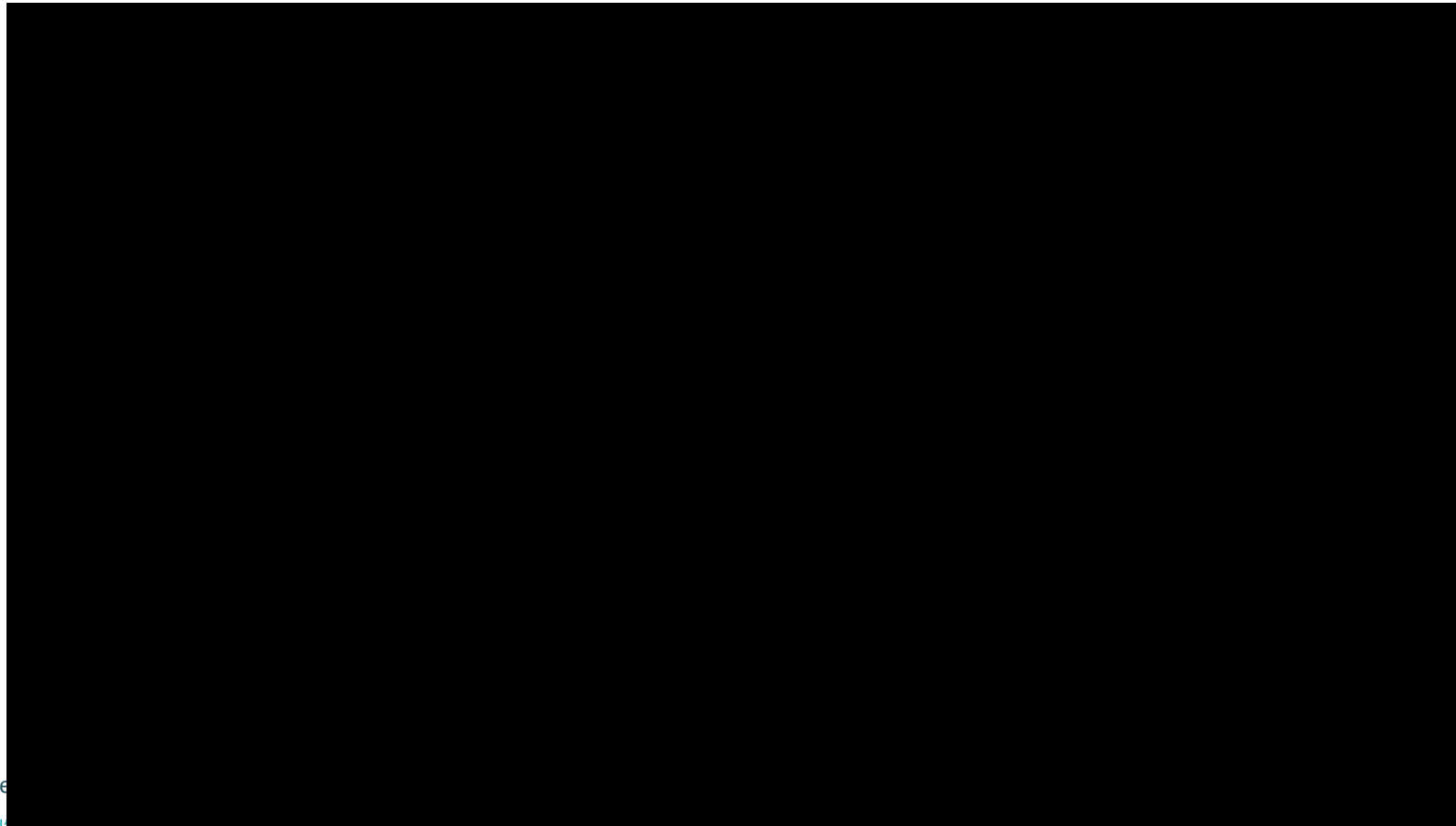
Ovosexage et alternatives à l'élimination des p

26/05/2021 Académie d'Agriculture de France

Comment déterminer le sexe *in ovo*

EggXYt – Genetic alteration (<https://www.eggxyt.com/>) (Israël)

- ✓ Genome editing
- ✓ Faisable le jour de ponte (E0)
- ✓ Détection fluorescente à travers la coquille
- ✓ Poussins transgéniques
- ✓ Acceptation du consommateur ?
- ✓ Précision 100 %
- ✓ Prix et dépendance à la souche éditée ???



Comment déterminer le sexe *in ovo*

Différence	Stade (en théorie)	En pratique		Technique	Invasivité / précision / capacité	Commercialisation
		stade	Structure			
Chromosomique	E0	E9	Liquide allantoïque (200-300 µL)	PCR sur des cellules en suspension dans le liquide allantoïque	Invasif, 97-99% 3000/h	PLANTegg (Allemagne) En cours (ALDI)
Moléculaire	?	E9	Liquide allantoïque	Dosage du sulfate d'oestrone (hormone ♀)	Invasif, 98%, SELEGGT: 3600/h In Ovo: 1500/h	SELEGGT (Allemagne) In ovo (Pays-Bas): Machine= Ella
Physiologique /phénotypique	E13	E13	Œuf entier/flash lumineux	Imagerie hyperspectrale/couleur des plumes	Non invasif, 95%, 20 000 /h	Agri Advanced Technologies (Allemagne): Fermiers de Loué Machine: CHEGGY
Edition de génome	E0	E0	Oeuf entier/Transillumination	Imagerie par fluorescence d'une molécule produite par les mâles après édition	Non invasive 100 %	EggXYT (Israël)



Comment déterminer le sexe *in ovo*

Différence	Stade (en théorie)	En pratique		Technique	Invasivité / précision / capacité	Commercialisation
		stade	Structure			
Chromosomique	E0	E9	Liquide allantoïque (200-300 µL)	PCR sur des cellules en suspension dans le liquide allantoïque	Invasif , 97-99% 3000/h	PLANTegg (Allemagne) En cours (ALDI)
Moléculaire	?	E9	Liquide allantoïque	Dosage du sulfate d'oestrone (hormone ♀)	Invasif , 98%, SELEGGT: 3600/h In Ovo: 1500/h	SELEGGT (Allemagne) In ovo (Pays-Bas): Machine= Ella
Physiologique /phénotypique	E13	E13	Œuf entier/flash lumineux	Imagerie hyper-spectrale/couleur des plumes	Non invasif , 95%, 20 000 /h	Agri Advanced Technologies (Allemagne): Fermiers de Loué Machine: CHEGGY
Edition de génome	E0	E0	Oeuf entire/Transil lumination	Imagerie par fluorescencence d'une molécule produite par les males après édition	Non invasive 100 %	EggXYT (Israël)



Sexage *in ovo*

Marges d'amélioration encore possibles :

stade, invasivité, type de biomarqueur, etc.

Association de biomarqueurs/indicateurs?

Utilisation de l'Intelligence artificielle et du deep learning.

Des difficultés à prévoir :

Organisation de la filière (gestion de l'accoupage, des 2% de fausses femelles)

De nombreux bouleversements techniques et économiques pour une filière qui est en évolution permanente depuis 20 ans (Perte de repères pour les producteurs).

La difficile question de la sensibilité de l'embryon (quel stade est acceptable ?)

Et le point de vue du consommateur dans tout ça ? (Œufs sexés = « embryons tués »)

The project PPILOW has received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement N°816172



PPILOW European project



PPILOW

Poultry and Pig Low-input and Organic production systems' Welfare



science for people, life & earth

Coordinator A. Collin
UMR BOA INRAE, France



Biologie des Oiseaux
& Aviculture

(2019-2024)

WP 5 Innovative alternatives of the elimination of one day old male layer chicks

1. Task 5.1: Evaluation of dual-purpose production potential in different environment (month 1 to month 50)
2. Task 5.2: Evaluation of dual-purpose genotypes on organic farms (month 24 to month 60)
3. Task 5.3: Early sex determination using *in-ovo* methods (month 1 to month 54)

(INRAE Egg team UMR BOA, LAAS CNRS)

- Development of physical methods based on electromagnetic signatures of males and females
(Non-invasive method)
- Characterization of omics signatures in allantoic fluids of male and female embryos
(Identification of new biomarkers or a set of complementary biomarkers)



INRAE

Ovosexage et alternatives à l'élimination des poussins mâles

26/05/2021 Académie d'Agriculture de France