



HAL
open science

Sexage de l'embryon aviaire : vers de nouveaux outils d'évaluation du sexe in ovo

Marina Govoroun

► **To cite this version:**

Marina Govoroun. Sexage de l'embryon aviaire : vers de nouveaux outils d'évaluation du sexe in ovo. Journée ITAVI pour les Professionnels de la Poule Pondeuse et de l'OEuf de consommation, ITAVI, Dec 2019, Pocé, France. hal-04276168

HAL Id: hal-04276168

<https://hal.inrae.fr/hal-04276168>

Submitted on 8 Nov 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Vers de nouveaux outils d'évaluation du sexe *in ovo*

Marina Govoroun

UMR Physiologie de la Reproduction
et des Comportements, INRA



la Journée ITAVI pour les Professionnels de la Poule Pondeuse et de l'Œuf
de consommation. Le 10 décembre 2019 à Pocé



CONTEXTE

➤ Intérêt d'un seul sexe pour les productions spécifiques (œufs, chair)

élimination précoce d'un des deux sexes

➤ Cas " Poules pondeuses":

6 Milliard de poussins mâles/an à l'échelle mondiale détruits à la naissance
50 millions en France



gazage ou broyage

- contexte étique et sociétal
- coté commerciale

• contexte étique et sociétal

- 2014 : diffusion par L214 de la vidéo sur les pratiques de traitement des poussins mâles dans un couvoir breton

Médiatisation large, nécessité d'une réponse du gouvernement

- 2015 : En Allemagne : projet d'interdiction de destruction des poussin mâle à partir de 2017

- 2016 : En France : financement du projet SOO sur l'élaboration du procédé du sexage des œufs *in ovo*

- 2018 : Avancement d'un projet allemand du sexage *in ovo*. Implémentation dans l'industrie à une petite échelle

Buzz médiatique

Marche arrière pour l'interdiction de destruction des poussins en Allemagne

• contexte étique et sociétal

CHALLENGES > SOCIÉTÉ

Société

Allemagne: l'élimination des poussins mâles autorisée provisoirement

Par AFP le 13.06.2019 à 11h21



Des militants de l'ONG de protection des animaux Peta jettent des poussins en peluche dans une fausse broyeurse pour protester contre la destruction industrielle des poussins mâles dans les élevages, devant le tribunal administratif de Leipzig, le 13 juin 2019. DPA/AFP - JAN WOITAS

Par quoi remplacer le broyage des poussins ? - Le Figaro

www.lefigaro.fr > Économie > Consommation

28 mars 2019 - La Suisse est en passe d'abolir le broyage des poussins. ... Mais que faire des poussins s'il est interdit de les «liquider»? En effet, pour les ...

Une première technique pour éviter de broyer des poussins arrive en ...

www.lefigaro.fr > Économie > Consommation

18 avr. 2019 - FIGARO DEMAIN - Pour éviter le massacre de plus de 50 millions de poussins ... une technique allemande permet d'identifier le sexe des poussins dans l'œuf ... Alors que 50 millions de poussins mâles sont éliminés chaque année à la ... L'Allemagne interdit le broyage des poussins mâles, et la France?

L'Allemagne interdit le massacre des poussins mâles!

www.natura-sciences.com/.../massacre-poussins-interdiction-allemande864.html

26 mars 2018 - L'Allemagne a annoncé l'interdiction du sacrifice des poussins mâles dans les couvoirs du pays dès 2017. L214 interpelle le ministre ...

L'élimination des poussins mâles, pratique controversée de l'industrie - Geo

<https://www.geo.fr> > Environnement

Il y a 10 heures - Des millions de poussins mâles tués chaque année, asphyxiés ou ... pour protester

destruction poussin 2019

La justice allemande valide l'élimination industrielle des poussins mâles

<https://www.lexpress.fr> > Monde

Par AFP, publié le 13/06/2019 à 11:21, mis à jour à 11:21 ... protester contre la destruction industrielle des poussins mâles dans les élevages, devant le tribunal ...

La justice allemande valide l'élimination industrielle des poussins mâles

<https://www.liberation.fr/.../2019/.../la-justice-allemande-valide-l-elimination-industrie...>

Il y a 5 heures - ... destruction industrielle des poussins mâles dans les élevages, devant le tribunal administratif de Leipzig, le 13 juin 2019 Photo Jan Woitas.

L'élimination des poussins mâles, pratique controversée ... - Orange actu

<https://actu.orange.fr/.../l-elimination-des-poussins-males-pratique-controversee-de-l-i...>

AFP, publié le jeudi 13 juin 2019 à 12h24. Des millions de poussins mâles tués chaque année, asphyxiés ou broyés: une pratique critiquée par les défenseurs ...

le broyage des poussins, castration des porcs... le gouvernement veut y ...

www.lefigaro.fr > Économie > Conjoncture

10 août 2018 - Mettre fin au broyage des poussins mâles ... Et pour l'arrêt de la destruction stématique des services vétérinaires veillant normalement au ...



Le Monde

30 octobre 2019

Le « broyage des poussins » devrait être interdit en France à la fin de 2021

L'annonce de l'interdiction de cette pratique très controversée a été faite mercredi par le ministre de l'agriculture, Didier Guillaume.



- intérêt commercial

- ✓ occupation des incubateurs
- ✓ sexage
- ✓ destruction

- impact environnemental

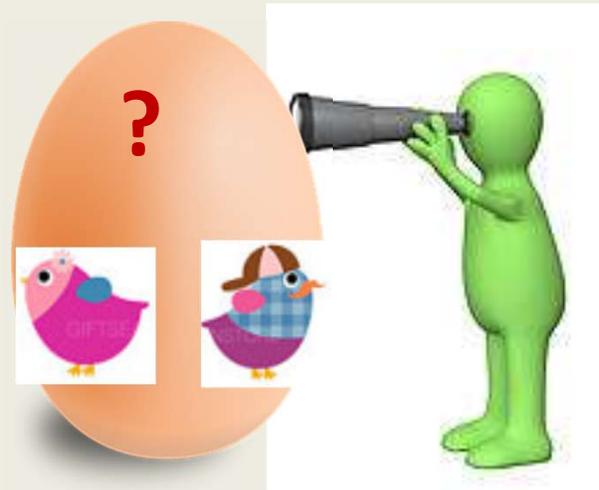


CONTEXTE

- Contexte étique et sociétal
- Intérêt commerciale



Intérêt fort du development du sexage *in ovo*



outils d'évaluation du sexe in ovo

➤ Sexage in ovo : quelles exigences?

- précision (98,5%)
- sans conséquences sur l'éclosabilité et la viabilité des poussins
- rapidité (20000-30000 œufs/heure)
- sans conséquences sur le cout du poussin

(Phelp, 2003)

➤ Comment on peut sexer les œufs?

invasives , noninvasives



Sécurité sanitaire?

- approches biologiques (moléculaires, biochimiques, immunologiques)
- approches physiques
- approches physico-chimiques

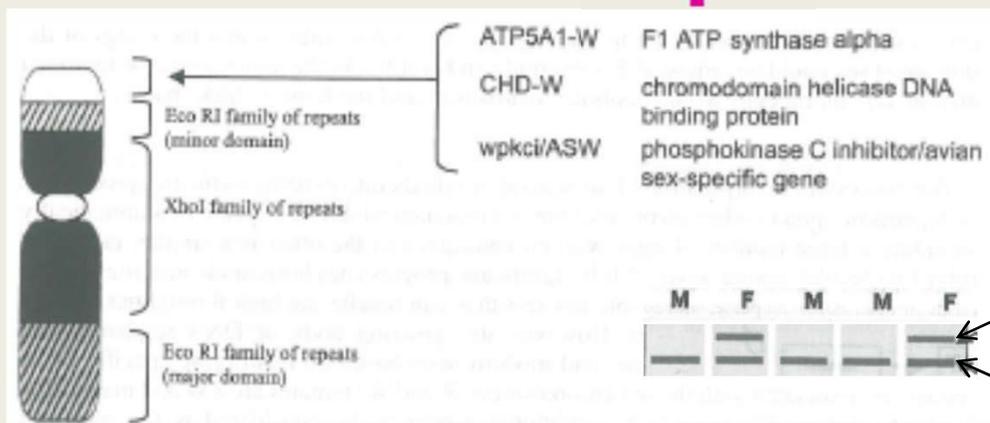
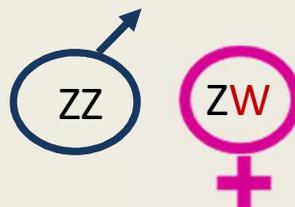
Quelles paramètres utiliser?

- génétiques  
- hormonaux (stéroïdes sexuelles)
- biochimiques/métaboliques
- physiques

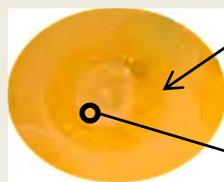
Approches Biologiques

➤ Detection du chromosome W par PCR avant incubation

(Petitte et al., 1995)



Nandi et al., 2003



blastoderme 30000-50000 cellules

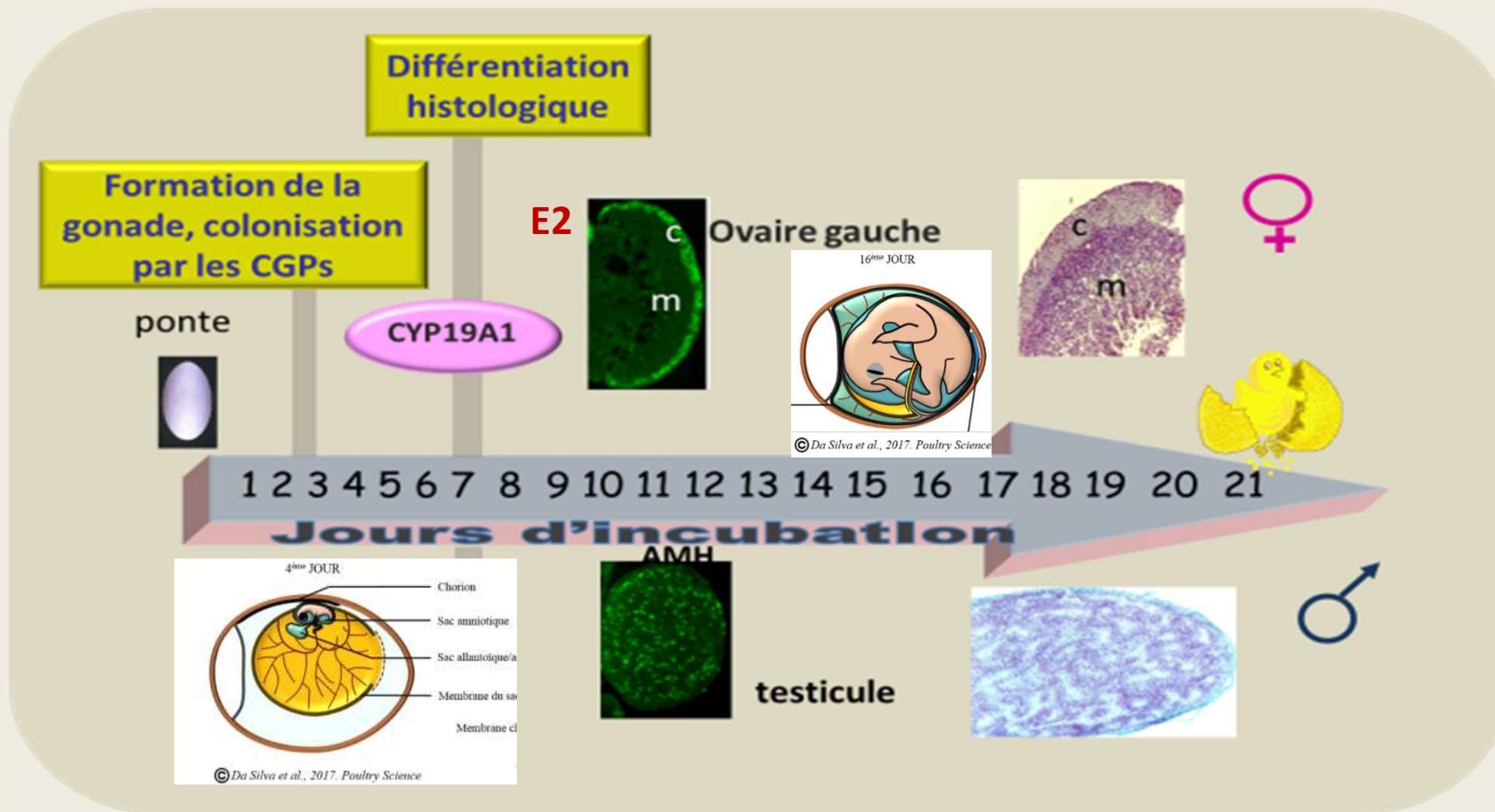
prélevement de cellules embryonnaires

viabilité des embryons ↓

Approches Biologiques

➤ **Détection des hormones sexuelles** : Estrogènes (Estradiol 17B (E2) et estrone sulfate (E1S))

Estrogènes - hormones spécifique du développement ovariens



Gill et al. (1983) : dosage des estrogènes dans le liquide allantoïdien

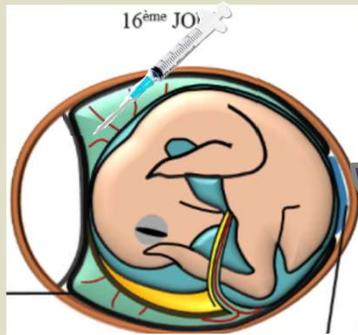
Approches Biologiques

➤ Détection des estrogènes:

- **Méthode EMBREX (USA) :** Estrogènes (Estradiol 17B (E2) ou estrogènes totaux)

Prélèvement Jour 17 d'incubation

Détection RIA



© Da Silva et al., 2017. Poultry Science

(Phelps P. V., 2003, patents US 6506570 B1, (EMBREX))

détection : transactivation ER

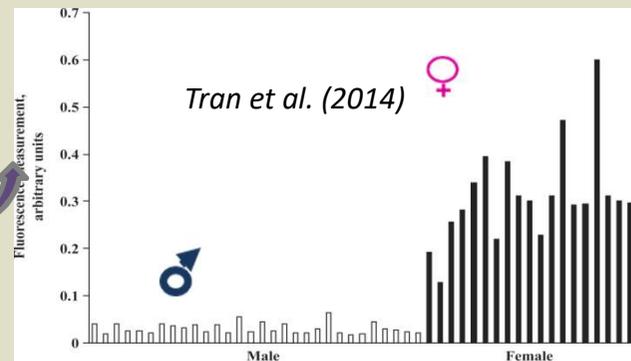
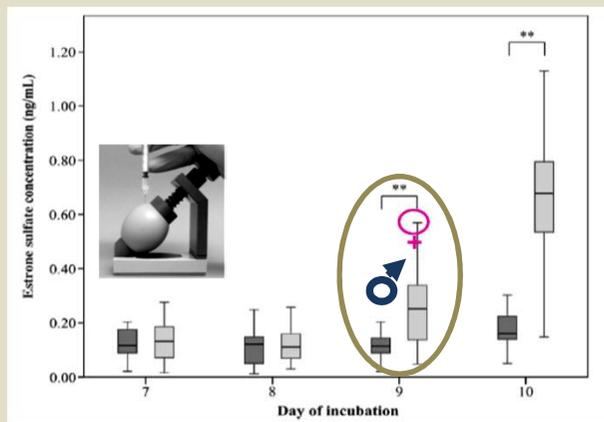


Figure 4. Sex sorting of 50 allantoic fluid samples of d-17 broiler chick embryos using an SSA4-based reporter with resorufin- β -D-galactopyranoside as a substrate in a 2-h assay. The data samples are grouped by sex for presentation.

- précision : 100%
- pas d'impact sur l'éclosabilité
- Mais
- développement du prototype?
- nécessite 17 jours d'incubation

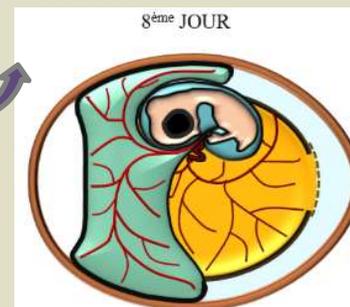
- **Méthode SELEGGT (2017), université de Leipzig (Allemagne):** Estrone sulfate (E1S)



A. Weissmann et al, 2013

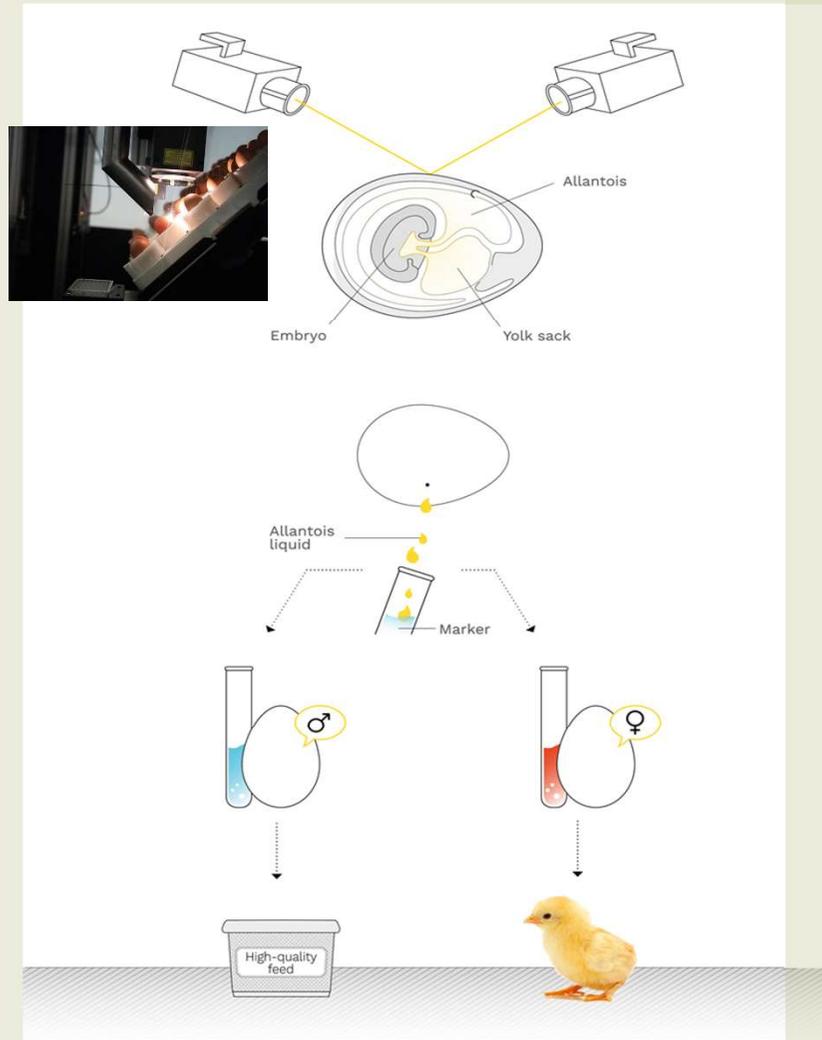
Prélèvement jour 9 d'incubation

détection : ELISA

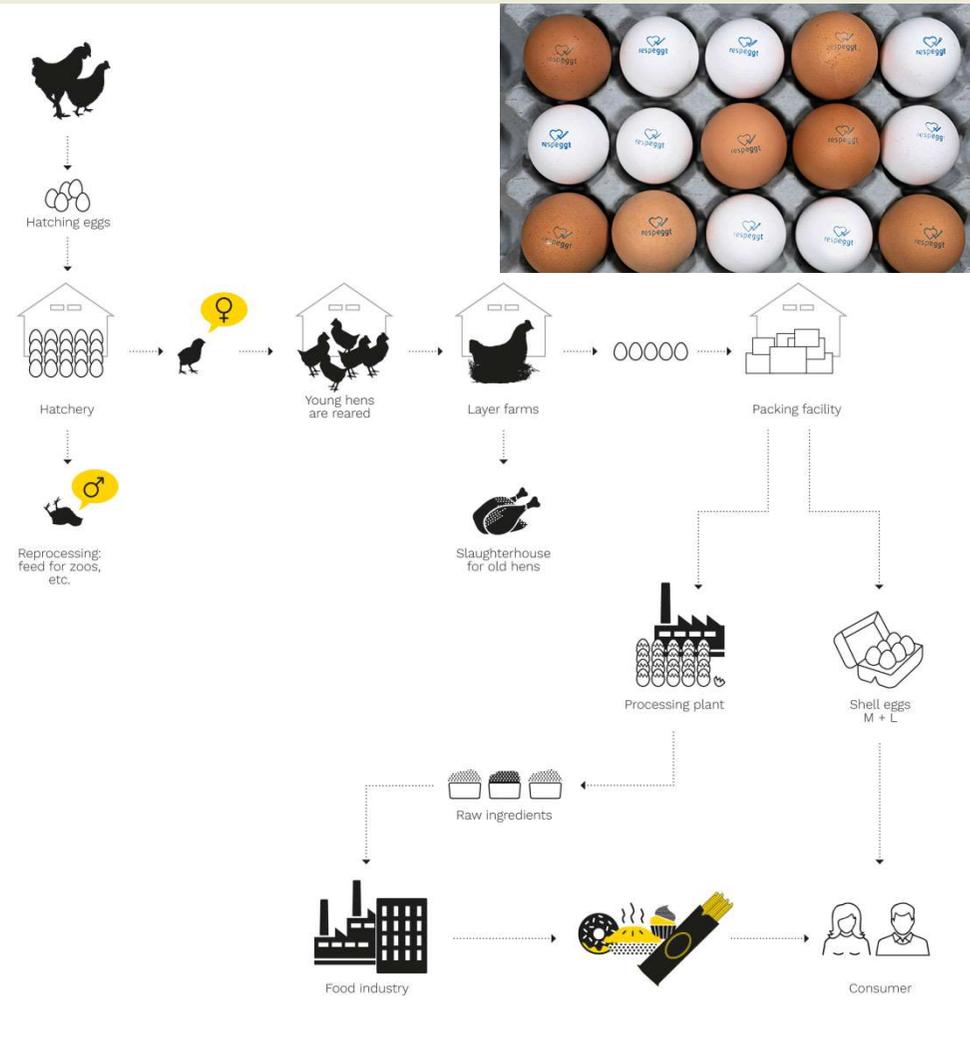


- prototype réalisé
- bonne viabilité
- Précision 97%
- Prix/œuf : 1-3 euros
- Mais
- nécessite 9 jours d'incubation
- pas assez rapide (5000 œufs/h)
- En cours d'amélioration pour être rentable

Technologie



Modèle



ALLEMAGNE

LES PREMIERS OEUFS PRODUITS SANS TUER DE POUSSINS MALES VENDUS A BERLIN

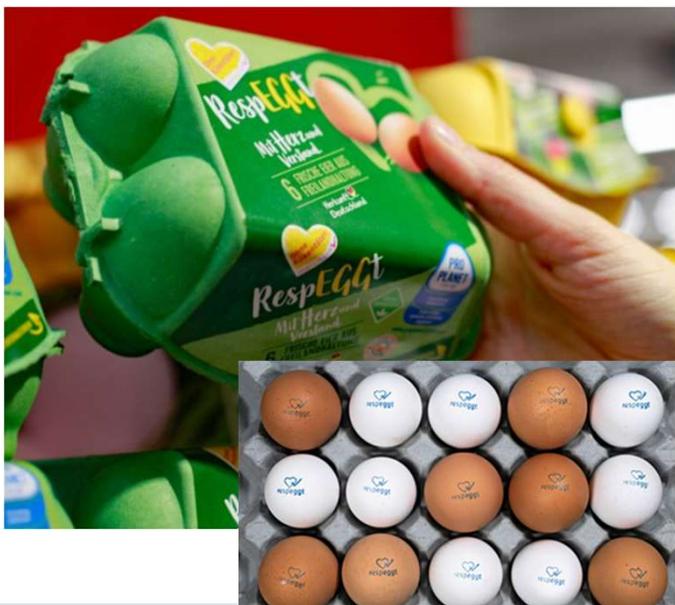
Par CNEWS - Mis à jour le 28/12/2018 à 15:18
Publié le 28/12/2018 à 15:17

f t



(Illustration) Aujourd'hui, on estime que quatre à six milliards de poussins mâles sont tués chaque année dans le monde[FREDERICK FLORIN / AFP]

Bonne nouvelle pour la cause animale. Les premiers oeufs produits sans que l'abattage de poussins mâles ne soit nécessaire ont été commercialisés à Berlin (Allemagne) ces dernières semaines.



CHRONIQUE 'AGE BÊTE'

Une alternative au broyage des poussins fait ses premiers pas en France

➔ Une alternative au broyage des poussins fait ses premiers pas en France



Un mignon petit poussin allemand dans un laboratoire de l'université technique de Dresde, en avril 2016, dans le cadre d'un projet de sexage dans l'œuf. Photo John MacDougall. AFP

f t

f PARTAGER t TWEETER

🖨️ ✉️

 **La lettre politique**
de Laurent Joffrin

Recevez tous les jours le billet politique de Laurent Joffrin

Adresse e-mail **S'INSCRIRE**

Grâce à la technique du sexage dans l'œuf, développée en Allemagne, les consommateurs pourront acheter les premiers œufs produits en France garantis «sans sang».



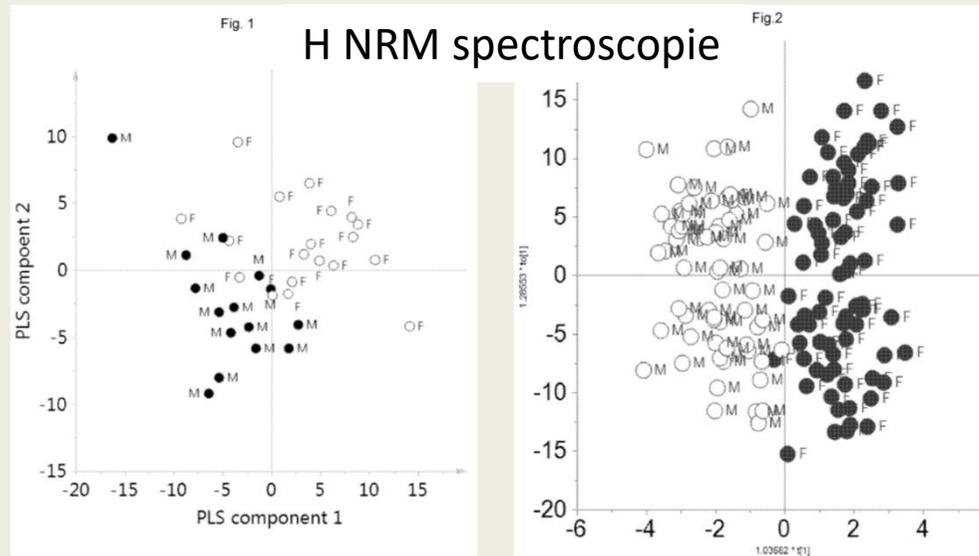
Approches Biologiques

➤ Détection des marqueurs métaboliques:

- Méthode IN OVO (2013), Leiden University

WO 2014/021715 A2, (Bruins and Stutterheim, 2014).

Détection : glucose, la vitamine choline et l'acide aminé valine



- projet en cours, prototype en développement
- Vitesse de mesure : 2 sec/egg
- Commercialisation prévue pour 2020



Promesse de sélection des œufs sexés de haute qualité pour la production des animaux d'intérêt ou des vacins.

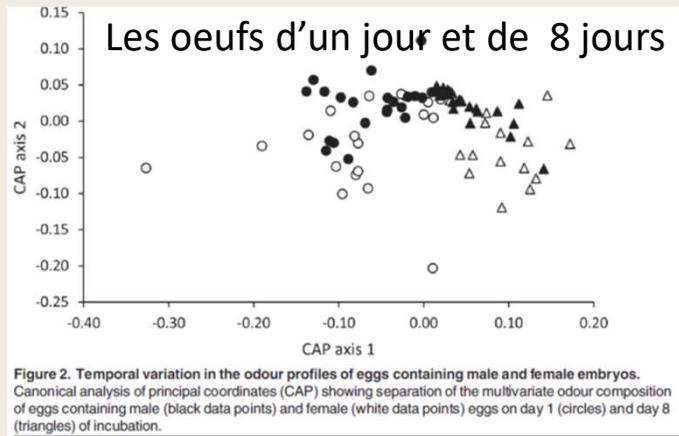


Méthode physico-chimique

➤ Détection des substance volatile sexuellement dimorphique dégagées par les œufs mâles et femelle

Webster et al, 2015, PLOSONe

Avian Egg Odour Encodes Information on Embryo Sex, Fertility and Development



GCMS :

- Benzaldehyde phenol
- acetophenone
- 2-nonanone
- 2-decanone
- 2-undecanone

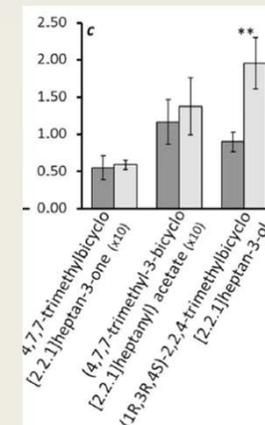


Les oeufs d'un jour et de 8 jours

Costanzo et al., 2016, PLOSONe

The Odour of Sex: Sex-Related Differences in Volatile Compound Composition among Barn Swallow Eggs Carrying Embryos of Either Sex

(1R,3R,4S)-2,2,4-trimethyl bicyclo [2.2.1]heptan-3-ol



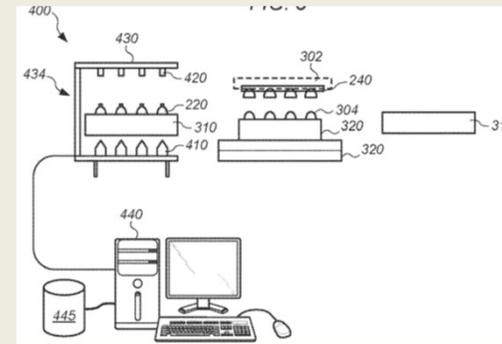
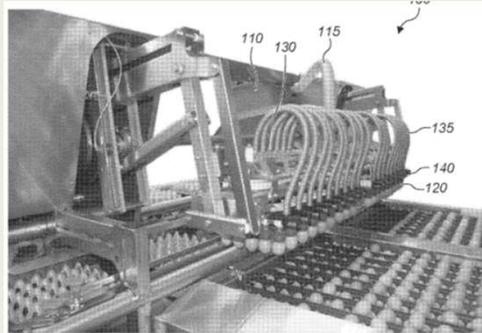
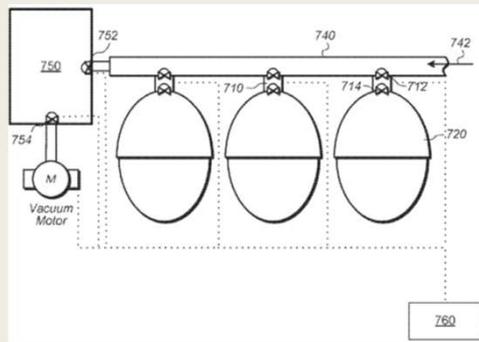
Méthode physico-chimique

➤ Détection des substances volatiles sexuellement dimorphiques dégagées par les œufs mâles et femelle

Vital Farm & Novotrans Group S.A. (Corcelles, CH), OVABRITE, INC. (Austin, TX, US)

Pub. No.: US 2019/0174726 A1
Pub. Date: Jun. 13, 2019

Inventors: **Paul Knepper**, Austin, TX (US);
Matthew O'Hayer, Austin, TX (US);
Jonathan Hoopes, Austin, TX (US);
Eran Gabbai, Maas (IL)



Système d'échantillonnage

- Source de vide
- Système pour collecter le gaz
- Membrane : capture des SOV

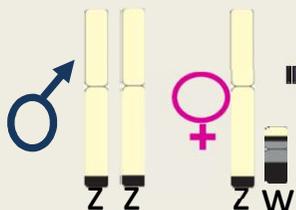
Système de détection

- Transmetteur électromagnétique
- Détecteur
- Ordinateur



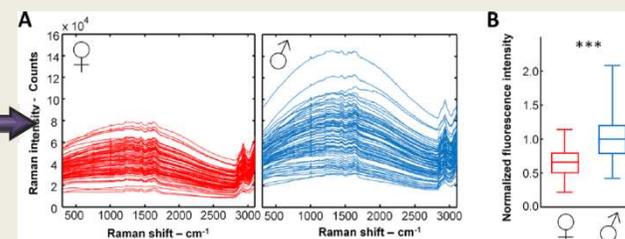
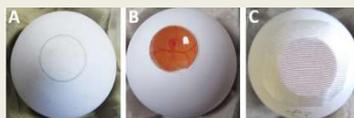
Approches Physiques (différents types de spectroscopie, RMN, IRM, autres)

➤ Détection par spectroscopie Raman à J 3,5 d'incubation (*Galli et al., 2016*)



Quantité différente d'ADN de 2% dans le sang entre les deux sexes

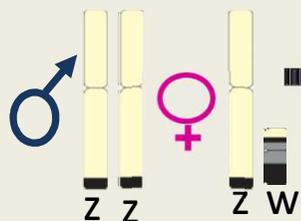
- découpage d'un trou dans la coquille
- détection d'un vaisseau sanguin
- envoie de la lumière laser
- détection du rayonnement Raman diffus, analyse du spectre
- Fermeture du trou, incubation



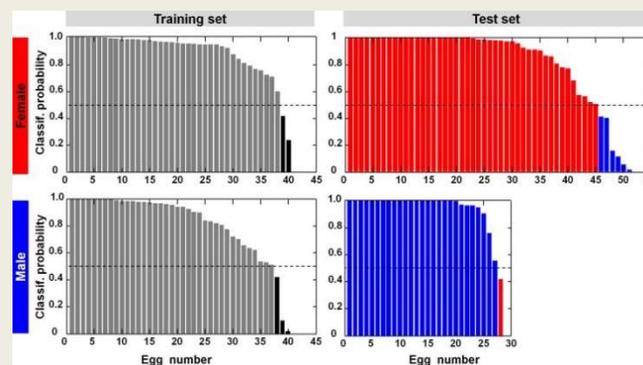
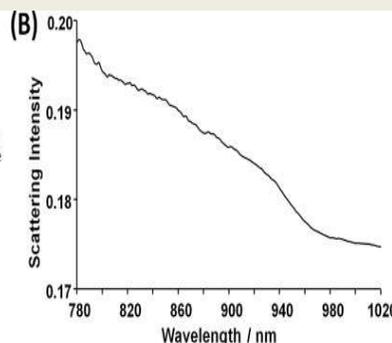
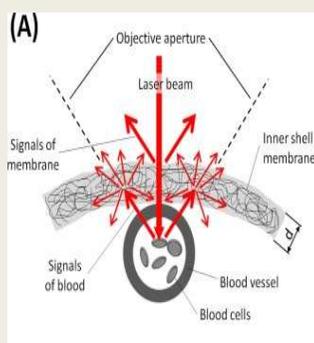
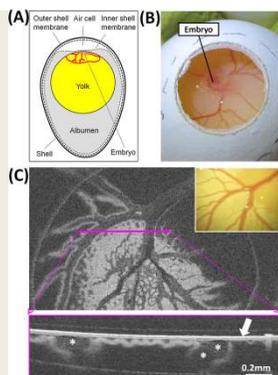
- précision 90%
- **l'éclosabilité 81%**
- permet en même temps la détection du sexe et des œufs infertiles
- prototype est en cours du développement
- méthode invasive, mais sans contact avec embryon

Approches Physiques (différents types de spectroscopie, RMN, IRM, autres)

- Détection par fluorescence et spectroscopie Raman proche d'infrarouge à travers la membrane de la coquille à J 3 d'incubation (*Galli et al., 2018*)



Quantité différente d'ADN de 2% dans le sang entre les deux sexes



- précision 90%
- Pas d'impact sur l'éclosabilité
- permet en même temps la détection du sexe et des œufs infertiles
- Méthode peu invasive, sans contact avec embryon

Approches Physiques

➤ **Détection par l'analyse hyperspectral avant la mise en incubation Hypereye** (Ngadi et al., 2016)
 Google Patents, <https://www.google.com/patents/US20160239953>.)

L'université McGill de Montreal, R&D et commercialisation supportés par Poultry Industry Council d'Ontario , Livestock Research Innovation Corporation, Matrixspec Solutions Inc

Hyperspec™ spectrograph, Headwall Photonics Inc. (USA)

900 nm to 1700 nm and a spectral resolution of 2.8 nm

Caractéristiques analysées :

- 1-Arithmetic Mean Spectral image features, AMS
- 2-Trim Mean Spectral image features, TMS
- 3-Information Entropy Spectral image features, IES
- 4-Energy Spectral image features, ES
- 5-Homogeneity Spectral image features, HS
- 6-Contrast Spectral image features, CS

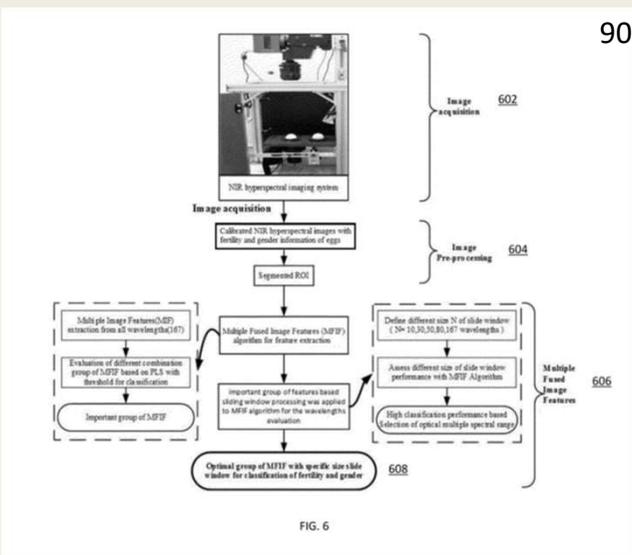


FIG. 6

Egg	Window size	Starting band for the highest results	Accuracy (%)	
Brown**	10	85	69.13	
	336	30	60/74/77/79	83.04
		50	64	92.17
		80	1/25/28/29	95.65
	167		98.7	
	White***	10	27	73.83
336		17/27	86.45	
		50	27	93.93
80		1	100	
167			99.53	

- précision 99%
- permet en même temps la détection du sexe et des œufs infertiles avant l'incubation
- l'éclosabilité n'est pas altérée
- méthode non invasive!
- Vitesse 30000-50000/heure
- le développement du prototype est annoncé



Approches Physiques

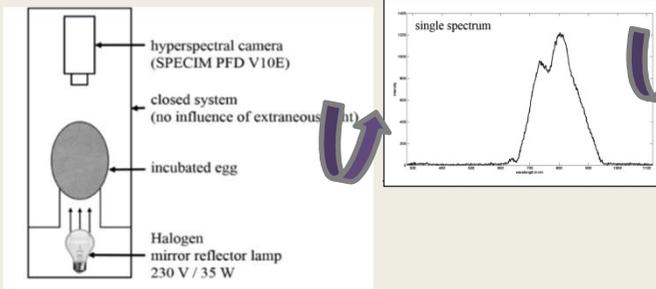
➤ Détection par analyse hyperspectrale de la différence de couleur du plumage à J 14 d'incubation

Les œufs marrons Lohmann Tierzucht GmbH : jaunes vers le bas ♂
marrons vers le bas ♀



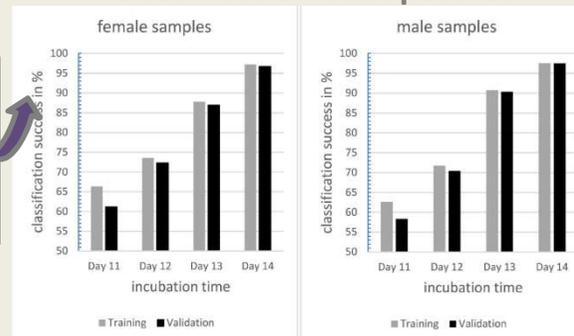
- méthode optique
- détection par analyse hyperspectral

400 nm to 1,000 nm



Göhler et al., 2016

Classification des spectres



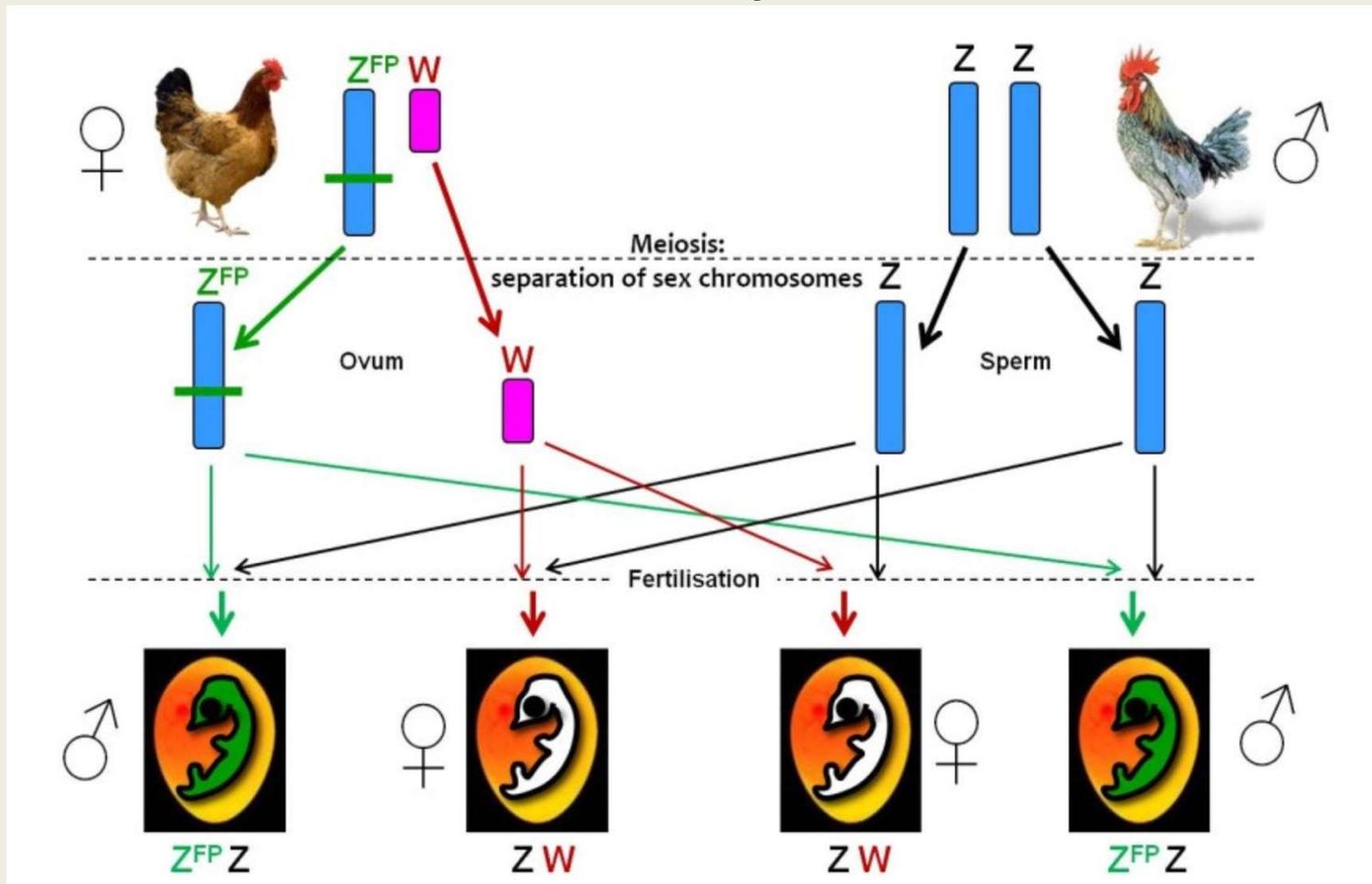
- précision 97%
- noninvasive
- **mais**
- convient aux souches avec la couleur du plumage liée au sexe
- détection tardive (j14 d'incubation)



Approche par l'édition du génome

Doran T, ASAP Animal Production, 2016

Sex selection in layer chickens



Patent number WO 2018/216022 A1

International Publication Date 29 November 2018 (29.11.2018) W!P O PCT

Applicant: EGGXYT LTD [IL/IL]; Keren HaYessod 36,
9100760 Jerusalem (IL).

Inventor: OFFEN, Daniel; 10 Hayeshiva St., 3895500 Kfar HaRoe (IL).

- Choix de la protéine fluorescente
- Quels outils d'édition du génome
- Comment véhiculer le transgène
- Comment détecter la fluorescence

Développent :

- Transgène red fluorescent protein **RFP**
- Technologie CRISPR-Cas9
- Production des poulets transgéniques via cellules germinales primordiales
- Détection : excitation avec laser vert filtre rouge

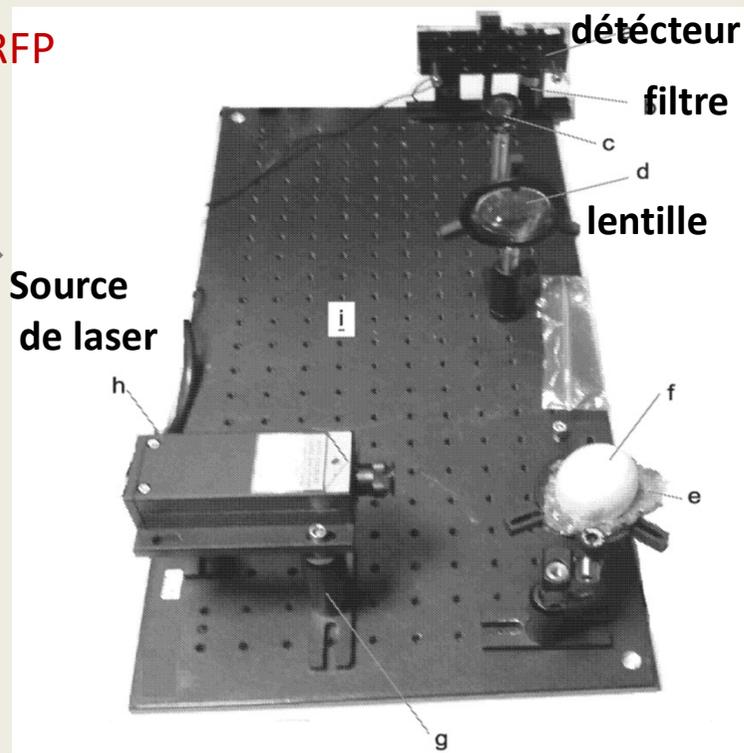
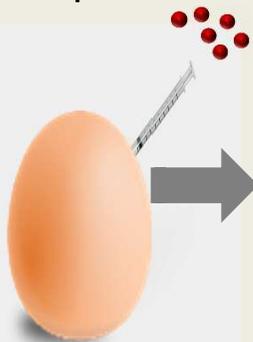


Patent number WO 2018/216022 A1

International Publication Date 29 November 2018 (29.11.2018) W!P O PCT

➤ Détection de la fluorescence

Cellules exprimant RFP



Intensité de fluorescence

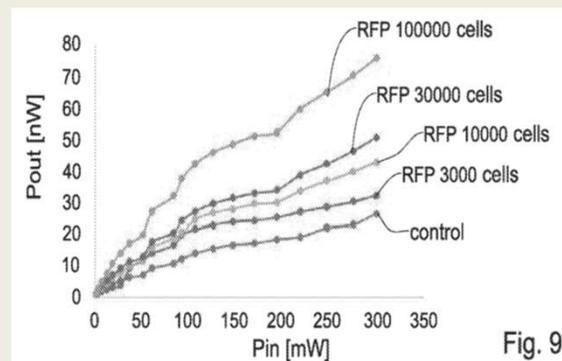


Fig. 9

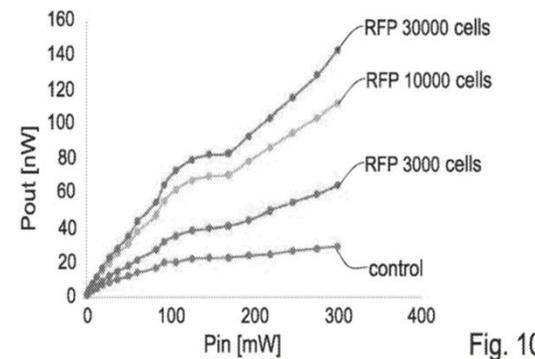
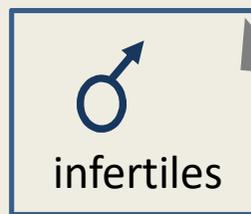


Fig. 10

Intensité de la source de lumière



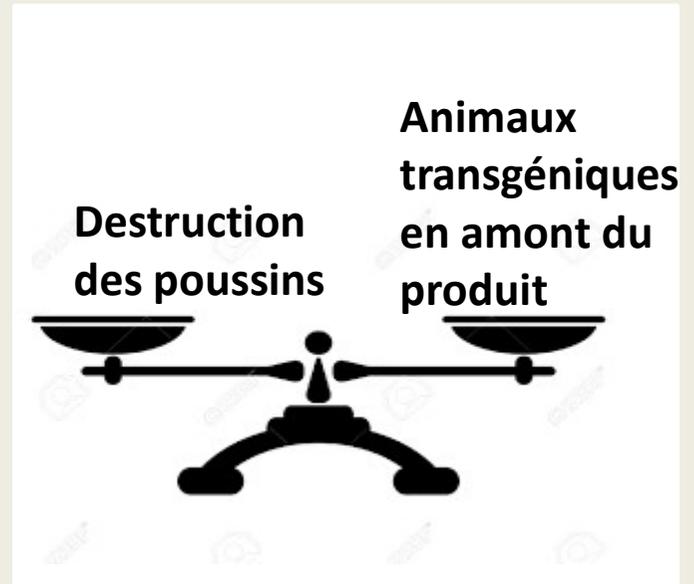
Approche par l'édition du génome

➤ Avantages :

- Méthode non-invasive
- Peut être 100 % précise
- Peut être rapide
- Peut être économiquement raisonnable

➤ Inconvénients :

- Difficilement acceptable en Europe :
- Des animaux transgéniques
- Quelles conséquences pour le génome?
- Nécessité de confiner les animaux, accès très réglementé
- Acceptabilité par la société?



LE SEXAGE IN OVO EN FRANCE, OU ON EST ?

PPILOW

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

WP5

➤ Projet Européen en cours de démarrage PPILOW :

LAAS CNRS, INRA, OVALIE Innovation

- Deux approches complémentaires et interactives
- ✓ Développement des mesures physiques, basées sur certaines différences attendues dans la signature électromagnétique des embryons mâles et femelles

Methodes non-invasives (CNRS LAAS, France)

- ✓ Caractérisation des signatures omiques du liquide allantoïque des embryons des deux sexes (INRA, BOA, France)

Identification de nouveaux biomarqueurs ou du set des biomarqueurs complémentaires



CONCLUSIONS



- Accélération du développement des procédés du sexage *in ovo* dans un contexte de la pression sociétale et médiatique autour des procédés actuels de la production des poules pondeuses



- Progrès dans le développement de différentes méthodes du sexage *in ovo*, mais aucune technique n'est complètement opérationnelle et rentable à ce jour.



- Amélioration des techniques de détection dans des analyses spectrales et développement de nouveaux logiciels d'intégration du signal
- Développement des connaissances physiques, biochimiques et moléculaires de l'œuf

- La technique allemande utilisant l'approche biochimique est la plus sûre et la plus aboutie à ce jour et la plus proche de commercialisation. Elle est déjà effective à petite échelle

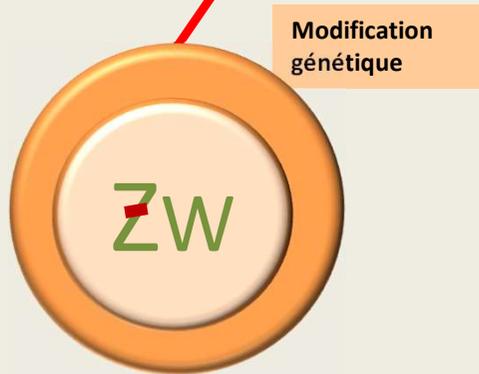
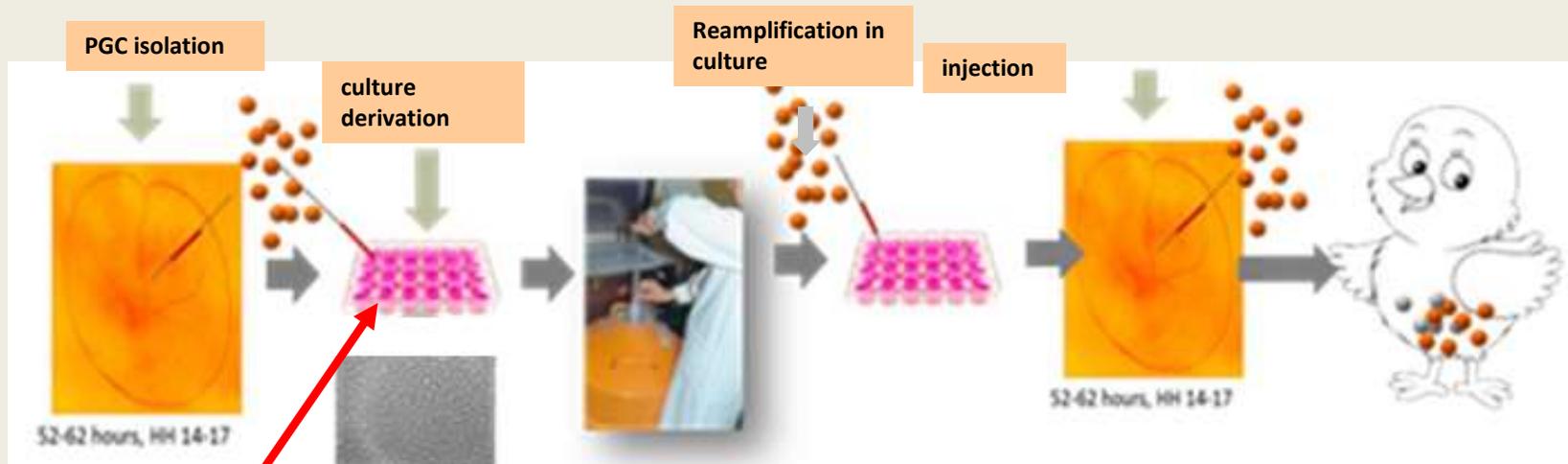
- Les approches physiques et physico-chimiques doivent cependant prendre le dessus dans l'avenir puisque noninvasives et plus précoces.

**La France a pris du retard dans le développement des procédés du sexage *in ovo*
Comment se positionner dans les années à venir?**

MERCI de VOTRE ATTENTION



Production des animaux édités



Modification génétique

