

Avancées concernant les méthodes d'ovosexage des poussins

Résumé

Les poules pondeuses ont été sélectionnées sur leur capacité de production d'œufs pour la consommation. Toutefois, les poussins mâles des souches « ponte » sont éliminés à l'éclosion du fait de leur faible rendement en viande. Avec l'augmentation de la sensibilité sociétale à la cause animale, le principe de faire naître des animaux pour les éliminer aussitôt est rejeté par les citoyens. L'annonce de l'interdiction de l'élimination des poussins mâles de souche ponte d'ici fin 2021 par les ministres de l'agriculture français et allemand le 16 octobre 2019 a accéléré considérablement la recherche d'alternatives. L'adoption d'une technique relèvera de différents critères d'ordre éthique, économique et sanitaire. Des solutions technologiques permettant de déterminer le sexe de l'embryon précocement afin d'éliminer les œufs « mâles » le plus tôt possible, commencent à apparaître sur le marché tandis que d'autres sont encore au stade de développement. Les solutions sont basées sur le développement d'outils permettant de détecter des différences dimorphiques moléculaires (hormones, métabolites, génétiques) et s'appuient sur des approches de prélèvement/dosage ou des technologies globales appliquées à l'œuf entier. Les méthodes physiques basées sur l'imagerie hyperspectrale, la spectroscopie Raman ou le proche infrarouge..., ont l'avantage d'être sans contact. Ce sont celles qui ont probablement une plus forte chance de remplir à terme toutes les conditions du succès.

Introduction

Le ministre de l'Agriculture, Didier Guillaume a annoncé le 28 janvier 2020, le lancement d'un plan sur le bien-être animal dans lequel figure l'interdiction de l'élimination des poussins mâles de souche ponte d'ici fin 2021, ce qui a précipité la recherche d'alternatives pour un déploiement rapide.

Les alternatives à cette pratique sont l'élevage de ces poussins mâles pour la chair, ou l'utilisation de souches génétiques « à double fin » dites souches mixtes, les femelles assurant la production d'œufs et les mâles, la production de viande. L'élevage des mâles issus des souches ponte actuellement disponibles ne semble pas envisageable à court terme à grande échelle pour l'ensemble de la filière au regard de leur faible rendement en viande. Ceci nécessiterait une réorganisation importante des filières avicoles ponte et chair, avec le développement de nouveaux marchés capables de valoriser ces produits, à un prix supérieur et avec une qualité sortant des standards classiques. C'est une solution qui peut s'avérer intéressante à petite échelle. Il en est de même pour l'élevage de souches mixtes qui engendre un surcoût sur les produits et également une réorganisation des filières.

Le sexage *in ovo*, c'est-à-dire la détermination du sexe, et l'élimination des mâles avant l'éclosion constitue la solution retenue pour une application à grande échelle. Il pourra aussi servir potentiellement à une filière de souche mixte si le sexage des jeunes poussins n'est pas aisé.

1. Les critères de choix d'une technique d'ovosexage

La mise en place d'une technique de sexage sur de jeunes embryons est une alternative qui représente un intérêt en évitant l'élimination de poussins éclos. Toutefois son succès va dépendre de différents critères d'ordre éthique, économique et sanitaire (Tableau 1).

1.1. Critères éthiques

La question de la précocité de la détermination du sexe est importante, au regard de la sensibilité de l'embryon aviaire qui acquiert la capacité de ressentir la douleur au cours de son développement embryonnaire. Toutefois, la définition du stade exact à partir duquel l'embryon ressent la douleur, est controversée. Selon Bjørnstad et al. (2015), les premiers nerfs sensoriels afférents chez le poulet se développent à partir du 4^{ème} jour de l'embryon; cependant, la connexion synaptique avec la corne dorsale n'est pas établie avant le 7^{ème} jour, ce qui rend impossible la perception de la douleur pendant la première semaine de développement. D'autres travaux indiquent une zone d'incertitude ou « zone grise » quant à la perception de la douleur par l'embryon entre 7 et 14 jours (Eide and Glover, 1995 ; Rosenbruch, 1997).

Les directives du Comité consultatif sur la recherche animale du National Institutes of Health pour l'élimination des fœtus de rongeurs indiquent, quant à elles, qu'à environ 60% de la période de développement embryonnaire, le cerveau des rongeurs est fonctionnel et donc que la probabilité qu'un fœtus perçoive une douleur doit être prise en compte. L'extrapolation de ces lignes directrices à une période de développement de 21 jours chez le poulet indiquerait que les procédures au-delà du

13^{ème} jour de développement embryonnaire devraient accorder une attention particulière à la capacité de l'embryon à percevoir la douleur ("iacuc-guidelines-on-euthanasia-of-chicken-and-embryos.pdf," 2012 ; "UseofChickenAvianEmbryosApproved18May2017.pdf," 2017). Les experts de l'EFSA estiment quant à eux, que durant les deux premiers tiers de la gestation, les fœtus d'animaux n'éprouvent pas de douleur, de souffrance ou de détresse car les structures anatomiques et neurologiques concernées ne se développent qu'au cours du dernier tiers de la gestation (EFSA, 2017).

Il est ainsi nécessaire d'éliminer les œufs embryonnés mâles en utilisant une méthode tenant compte de la sensibilité de l'embryon au stade d'application. La procédure couramment appliquée pour mettre fin aux expériences menées sur les œufs fécondés est la congélation de l'œuf entier contenant l'embryon. D'après les lignes directrices de l'American Veterinary Medical Association (AVMA), pour les embryons de plus de 10 jours d'incubation, les embryons doivent être euthanasiés avec les mêmes méthodes que celles utilisées chez les poussins éclos (Aleksandrowicz and Herr, 2015). Des méthodes appropriées devront donc être appliquées selon le stade embryonnaire. L'AVMA (2013) préconise l'administration d'anesthésiant, la décapitation ou l'exposition prolongée au CO₂ pour les embryons de plus de 10 jours. Pour ces mêmes embryons, le règlement 1099/2009 (CE) No1099/2009 du Conseil du 24 septembre 2009 sur la protection des animaux au moment de leur mise à mort préconisent le broyage, la dislocation du cou,

la percussion de la boîte crânienne suivie de l'élongation et le gaz. La mise en place de voies de valorisation sera un plus.

1.2. Critères économiques

La mise en place de l'ovosexage sous-tend des charges supplémentaires pour les couvoirs pour l'achat et le fonctionnement du matériel de sexage et d'élimination des embryons, avec une révision complète du process et de la logistique (sortie des œufs pour le sexage, remise en incubation pour les embryons femelles uniquement) et des moyens humains supplémentaires pour cette nouvelle étape. D'un autre côté, ces surcoûts pourront être compenser en partie par le tri les œufs en cours d'incubation permettant une économie d'énergie du fait d'une plus faible quantité d'œufs à incuber et par également éventuellement la valorisation des embryons mâles dans d'autres filières. Par ailleurs, cette technique nécessitera des adaptations au sein de la filière, avec notamment la gestion des coqs nés après sexage si la méthode utilisée n'est pas fiable à 100 %.

1.3. Critères sanitaires

Selon la méthode de sexage, des impacts sont susceptibles d'apparaître au niveau sanitaire, avec des conséquences sur le développement embryonnaire, la qualité du poussin et plus tard l'intégrité physique des adultes. Les points critiques sont l'ouverture de la coquille, la facilité à nettoyer le matériel et le risque de sa contamination pendant son usage (Tableau 1).

Tableau 1 : Identification de différents critères à considérer pour le choix des techniques d'ovosexage

Domaines	Critères	Indicateurs
Ethique	Acceptabilité	<ul style="list-style-type: none"> - Précocité de la détection - Méthode d'élimination
Économie	Charges d'investissement directes et de fonctionnement	<ul style="list-style-type: none"> - Coûts : matériel (sexage, élimination), conception du couvoir - Coût : fluides, main-d'œuvre (temps et qualification)
	Productivité du couvoir	<ul style="list-style-type: none"> - Performances d'éclosion - Taux d'erreur (mâles à élever, femelles détruites) - Taux d'occupation des cellules
		<ul style="list-style-type: none"> - Vitesse de traitement (temps technique de l'analyse)
	Performance des produits	<ul style="list-style-type: none"> - Viabilité des poulettes (J7 et J18)
	Valorisation des coproduits	<ul style="list-style-type: none"> - Voie de valorisation des œufs mâles triés
Santé	Développement embryonnaire	<ul style="list-style-type: none"> - Viabilité des embryons
	Qualité sanitaire et physique des poussins	<ul style="list-style-type: none"> - Contamination par le matériel - Qualité sanitaire et physique du poussin
	Intégrité des adultes	<ul style="list-style-type: none"> - Absence d'effet sur la poule et descendance

Ainsi, les solutions les plus viables devront permettre un tri le plus précocement possible, fiable, sans impacts négatifs sur l'embryon, le poussin et la poule, rapide, utilisable à grande échelle par les couvoirs et économiquement acceptable par l'ensemble des acteurs de la filière tout en limitant les surcoûts pour le consommateur. Les techniques d'ovosexage qui font l'objet de recherches connues ou des communications récentes sont présentées ci-après

2. Les techniques actuelles pour réaliser l'ovosexage

Chez les oiseaux, contrairement aux humains et aux mammifères, les mâles sont homogamétiques avec deux chromosomes sexuels Z, tandis que les femelles sont hétérogamétiques avec un chromosome sexuel Z et un chromosome sexuel W. Tous les autosomes sont identiques pour les mâles et les femelles. Alors que le chromosome déterminant le sexe chez les oiseaux est situé dans l'ovule, le sex-ratio des descendants n'est donc pas manipulable par le sexage préalable des spermatozoïdes et le tri qui s'ensuit comme cela peut être facilement pratiqué chez les animaux dont le mâle est hétérogamétique (Krautwald-Junghanns et al., 2018).

Ces dernières années, de nombreuses méthodes ont été testées et mises au point avec plus ou moins de succès, pour identifier le sexe de l'embryon de poulet avant l'éclosion. Ces méthodes peuvent être classées en deux catégories : les méthodes non spectrales (méthodes moléculaires portant sur l'odeur des œufs, les hormones, les métabolites, ou s'appuyant sur la détection des chromosomes sexuels...) qui s'accompagnent le plus souvent d'un prélèvement de cellules ou de liquide extra-embryonnaires plus ou moins invasifs, et les méthodes spectrales et d'imagerie (imagerie hyperspectrale, spectroscopie RAMAN, spectrométrie infrarouge...) qui considèrent un signal global de l'œuf (ou un lien avec un facteur spécifique comme la couleur des plumes) et sont sans contact.

2.1. Les méthodes non spectrales

2.1.1. Chromosomes sexuels ZZ/ZW

Les séquences répétées d'ADN peuvent être utilisées pour effectuer le typage sexuel des oiseaux. Des séquences d'ADN spécifiques sont généralement détectées à l'aide de la réaction en chaîne de la polymérase (PCR). Des études visant à identifier des biomarqueurs génétiques sont ainsi publiées depuis 1995 (Petitte et Kegelmeyer, 1995). He et al. (2019) ont récemment développé deux nouveaux tests basés respectivement sur les techniques PCR et Q-PCR. Cette méthode est invasive. La société française Tronico expérimente en France cette méthode en lien avec les travaux de He et al. (2019) (Tableau 2). Les recherches en sont au stade expérimental.

Par ailleurs, Margulis and Danielli (2019) ont basé leur étude sur le principe de transfert d'énergie de résonance fluorescente FRET (*i.e.* un court oligonucléotide marqué avec une molécule fluorescente à des positions particulières). La détection optique directe du signal fluorescent élimine la nécessité des étapes analytiques, telles que l'électrophorèse sur gel, et donc raccourcit la durée de l'analyse. Cette méthode permet de déterminer le sexe du poussin au stade embryonnaire de 17 jours, ce qui est très tardif, en 13 min, avec une sensibilité et une spécificité de 100%, et de manière invasive

2.1.2. Hormones

Tran et al (2010) ont mis au point un test permettant de distinguer les œufs embryonnés mâles et femelles en fonction de la concentration en œstrogènes de leur liquide allantoïdien à 17 jours d'incubation. Les résultats ont confirmé que les œstrogènes sont d'excellents marqueurs chimiques permettant de séparer les mâles des femelles, et qu'il n'y a eu aucun effet de la méthode de prélèvement sur l'éclosabilité (Tran et al., 2010). Toutefois, cette technique est invasive et réalisée à 17 jours d'incubation sur des embryons supposés capables de ressentir la douleur. En utilisant le même principe, Weissmann et al. (2013, 2014) ont conclu que la méthode pouvait être effectuée sur des embryons de poulets au stade de 9 jours par la mesure du sulfate d'œstrone dans le liquide allantoïque avec une précision de 84% à 8 jours et 98 à 100% à 9 jours selon les souches de reproductrices. Toutefois, les résultats ont indiqué une réduction du taux d'éclosion (1,4 à 12,7 points selon la souche) due à l'échantillonnage du liquide allantoïque.

En utilisant ce principe, la méthode développée par le consortium SELEGGT (Allemagne) est opérationnelle mais avec une cadence qui est faible (Tableau 2). Elle est basée sur la concentration en œstrogènes du liquide allantoïque au 9^{ème} jour d'incubation, avec une précision de 97% et un coût annoncé par œuf de 1 à 3 centimes d'euro. SELEGGT travaille actuellement à améliorer la rapidité du process, actuellement de 3 000 œufs par heure, en vue d'une application dans les couvoirs.

2.1.3. Marqueurs métaboliques

Bruin and Shutterheims (2014) ont déposé un brevet dans lequel est décrit une méthode de dosage de glucose et d'acides aminés dans le liquide allantoïque avec des différences entre les mâles et les femelles. Leur hypothèse est que ces différences pourraient refléter un métabolisme et une utilisation ou efficacité d'utilisation des nutriments de l'œuf différentes entre les mâles et les femelles.

La société In Ovo BV- Détection de biomarqueurs (<https://project.inovo.nl/>), basée aux Pays-Bas, spin-off de l'université de Leyde, utilise également la méthode de détection de biomarqueurs dans l'œuf embryonné de 9 jours. Sont détectés des sucres et acides aminés, et leurs

précurseurs et métabolites (Brevet WO 2014/0211715 A2) (Tableau 2). In Ovo affirme que sa technique de détermination du sexe des poulets est capable de déterminer le sexe d'un œuf en quelques secondes. La société va recevoir prochainement une dotation de 2,5 millions d'euros du Conseil européen de l'innovation (EIC) pour un projet pilote d'accélération.

2.1.4. Composés volatils

Les substances volatiles émises par les œufs en cours d'incubation à travers les pores de la coquille transmettent des informations sur leur fertilité, ainsi que sur le sexe dès le premier jour d'incubation, avec un taux de réussite amélioré au 8^{ème} jour chez la caille japonaise (Webster et al., 2015).

Un brevet a été déposé en 2018 (WO 2018/023105 AI) (Novatrans Group S.A.) : la méthode comprend un dispositif de collecte de gaz avec une membrane capable de capturer les composés organiques volatils, un émetteur et un détecteur de rayonnement électromagnétique. L'émetteur fonctionne dans la gamme des Téra hertz, des micro-ondes ou des infrarouges. L'utilisation de ce brevet pour un développement n'est pas connue.

2.1.5. Édition du génome

Le marquage génétique des chromosomes sexuels est également discuté comme une voie possible pour la détermination du sexe *in ovo* chez le poulet. Les études de Quansah et al. (2013) et Doran et al. (2017) se sont concentrées sur la production de poules génétiquement modifiées, et ont décrit le marquage du chromosome Z des poules reproductrices.

Doran et al. (2017) ont démontré qu'un marqueur lié au chromosome sexuel Z peut être appliqué avec succès *in ovo* pour identifier les embryons mâles avant même l'incubation. Il s'agit d'une protéine fluorescente qui est insérée dans le chromosome Z des femelles reproductrices, et transmis uniquement à la descendance mâle. Il serait possible de détecter l'expression de ce marqueur dans les embryons mâles à tout moment, de la ponte à l'éclosion.

Le projet EggXYt (Israël) est basé sur cette technique génétique de marquage des chromosomes sexuels (Tableau 2). Il présente l'intérêt d'être non invasif et réalisé le jour de ponte avec une grande précision, mais a peu de chance d'être accepté du fait d'une manipulation génétique (donc OGM). Cette méthode n'est à ce jour pas commercialisée.

2.2. Les méthodes spectrales

Différentes méthodes optiques et d'imagerie ont été utilisées avec succès chez les oiseaux, avec l'avantage d'une application sans contact.

2.2.1. Spectroscopie par diffraction et imagerie hyperspectrale

Rozenboim and Dor (2011, 2016) ont déposé un brevet sur la méthode de spectrométrie par diffraction (méthode hyperspectrale non invasive) (US 9,435,732 B2), avec l'utilisation d'un algorithme de réseau neuronal comparant le spectre de l'œuf testé à une bibliothèque spectrale. Ceci permettrait, selon les auteurs, une capacité de prédiction supérieure à 90 % de la détection du sexe le 12^{ème} jour après la ponte.

La technologie spectrale Hypereye (Canada) (<https://patents.google.com/patent/US20160239953>) serait ainsi capable d'identifier à la fois le sexe et la fertilité de 30 000 à 50 000 œufs à couvrir par heure, avant la mise en incubation, avec une précision de 95 à 99 % et un coût par œuf estimé à environ 5 cents CAD (Tableau 2). Des prototypes ont été testés dans les couvoirs de l'Ontario avec une date de commercialisation qui était prévue pour 2019, mais sans toutefois de nouvelles depuis.

Par ailleurs, Göhler et al. (2017) ont décrit une technique optique non invasive pour la détermination du sexe dans les lignées de pondeuses présentant un dimorphisme sexuel reposant sur la couleur des plumes (souches brunes) pour des embryons âgés de 11 à 14 jours, et avec une précision globale d'environ 97 %. L'entreprise Agri Advanced Technologies GmbH (AAT), en Allemagne, a mis au point un prototype avec cette méthode pour des embryons âgés de 13 jours, et avec une précision globale d'environ 97 % (plus de 20 000 œufs testés par heure et par machine) (Tableau 2). L'intérêt de cette méthode est sa rapidité et son caractère non invasif qui n'entraîne aucun risque de contamination ni de blessure pour l'embryon. La détection est toutefois tardive. Son coût est de 0,5 à 1 centime par œuf commercialisé. Une technique d'électronarcose pour l'élimination des embryons mâles est en cours de développement avec l'Université de Göttingen.

2.2.2. Spectroscopie dans l'infra-rouge et dans le visible

L'hétéromorphie des chromosomes Z et W est mesurable par spectroscopie infrarouge (FT-IR). Steiner et al. (2011) ont indiqué que cette méthode permettait de déterminer le sexe des disques germinaux non incubés en quelques secondes, grâce à la détermination précise des contenus d'ADN dans les cellules de blastoderme des deux sexes. Cette méthode reste invasive et aucune commercialisation n'est connue pour l'instant.

Par ailleurs, Rahman et al. (2020) ont émis l'hypothèse que le développement embryonnaire (angiogenèse, érythropoïèse) des embryons mâles pourrait être différent de celui des embryons femelles et ce, dès les premiers jours d'incubation. Le taux d'hémoglobine (dosage indirect de l'érythropoïèse) pourrait ainsi être corrélé à des

différences de développement embryonnaire. En utilisant la spectroscopie dans le visible (ratio T575/T598), des différences dimorphiques sur le taux d'hémoglobine ont été observées dès 3 jours d'incubation. Cependant, alors qu'à trois jours d'incubation, le ratio T575/T598 est significativement plus faible chez les embryons mâles (plus grande absorbance de l'hémoglobine), le ratio devient plus élevé chez les mâles à 7 jours d'incubation, ce qui suggère une régulation au cours du développement embryonnaire. Cette variabilité peut s'avérer contraignante pour le développement d'outils d'ovosexage puisque la méthode doit être calibrée pour un âge donné. Cette méthode, au stade expérimental, est non invasive et présente une sensibilité intéressante pour différencier les taux de développement embryonnaire selon le sexe avant 7 jours d'incubation, sous réserve que ces différences mâles/femelles détectées soient transposables aux différentes souches de pondeuses. Il faut également s'assurer que la technique développée sur des œufs blancs soit adaptable aux œufs bruns sachant que la protoporphyrine, pigment de la coquille des œufs bruns, absorbe à peu près aux mêmes longueurs d'ondes que l'hémoglobine et pourrait interférer avec le signal.

2.2.3. Spectroscopie par fluorescence et Raman

La spectroscopie Raman, un autre type de spectroscopie vibratoire, utilise une lumière monochromatique pour éclairer l'objet examiné. Le spectre de la lumière diffusée est analysé en fonction de son interaction avec l'échantillon. Les spectres Raman sont uniques pour chaque molécule et sont souvent appelés « empreintes moléculaires ». Comme la composition biochimique des cellules des oiseaux femelles et mâles est légèrement mais significativement différente, la spectroscopie Raman permet une identification *in ovo* du sexe basée sur la

signature spectrale des cellules germinales ou sanguines (Krautwald-Junghanns et al., 2018) sachant que chez l'oiseau, les hématies sont nucléées. Galli et al. (2018) de l'université de Dresde (Allemagne), ont montré expérimentalement que la spectroscopie Raman et la spectroscopie par fluorescence dans le proche infrarouge peuvent être réalisées sur des vaisseaux extra-embryonnaires irrigués tout en laissant intacte la membrane interne de la coquille de l'œuf, avec un taux de sexage aux 3^{ème} et 4^{ème} jours d'incubation, supérieur à 90%.

3. Conclusion

Différentes démarches de sexage *in ovo* sont ainsi en cours de développement. Il est toutefois trop tôt pour avoir une idée précise des plus performantes. Une méthode hormonale est déjà sur les rails, et une autre, optique, en passe de l'être, avec pour chacune d'entre elles des inconvénients : la première est invasive et la seconde est tardive et applicable uniquement sur les souches brunes. Plusieurs développements sont en cours, et les méthodes spectrales présentant l'avantage d'être sans contact, ont probablement un bel avenir devant elles, avec un gros challenge qui est celui de la précocité de la mesure. En France, dans le cadre du projet européen PPILOW¹ (2019-2024), deux approches complémentaires et interactives sont actuellement explorées, avec le développement par le CNRS de mesures physiques, non invasives, basées sur la recherche de différences de propriétés diélectriques des œufs selon le sexe des embryons, et la caractérisation par l'INRAE des signatures omiques de l'œuf de ces mêmes embryons, de manière à identifier des biomarqueurs d'intérêt. La combinaison de différentes approches et le recours à l'intelligence artificielle permettront d'améliorer la précision de la détermination du sexe.

¹ Le projet PPILOW reçoit le soutien du programme Horizon 2020 Recherche et Innovation de l'Union Européenne sous l'accord de financement N°816172.

Tableau 2 : Différentes méthodes d'ovosexage en fonction de leur degré de développement technologique

Société	Méthode	Principe	Stade développement technologique	Age détection	Méthode invasive	Précision
SELEGGT - Allemagne	Hormonale	Mesure du sulfate d'œstrone dans le liquide allantoïdien	Démarrage industriel	9j	OUI	97%
Agri Advanced Technologies - Allemagne	Imagerie hyperspectrale	Détermination du dimorphisme sexuel dans la couleur des plumes pour les souches brunes	Démarrage industriel	13j	NON	97%
In Ovo - Pays-Bas	Test moléculaire	Détection de biomarqueurs (sucres, acides aminés, leurs précurseurs et métabolites)	Prototype	9j	OUI	-
Hypereye - Canada	Imagerie hyperspectrale	Détermination de la fertilité et du sexe des embryon par spectroscopie	Prototype	Avant incubation	NON	95 - 99%
Tronico - SOO - France	Test moléculaire	Techniques PCR et Q-PCR pour détecter les chromosomes sexuels	Expérimental	9j	OUI	96,5%
Technische Universität Dresden - Allemagne	Fluorescence et spectroscopie Raman proche infrarouge	Les vaisseaux sanguins embryonnaires sont éclairés à travers la coquille intacte de l'œuf, à l'aide d'un laser proche infrarouge	Expérimental	3-4j	NON	> 90%
EGGXYT LTD - Israël	Technique génétique	Marquage fluorescent du chromosome sexuel mâle repérable dès la ponte	Expérimental	Avant incubation	NON	100%

Références bibliographiques

- Bjørnstad, S., Austdal, L.P.E., Roald, B., Glover, J.C., Paulsen, R.E., 2015. Cracking the Egg: Potential of the Developing Chicken as a Model System for Nonclinical Safety Studies of Pharmaceuticals. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 355, 386–396. <https://doi.org/10.1124/jpet.115.227025>
- Bruin and Shutterheims, 2014. <https://patentimages.storage.googleapis.com/d1/62/ac/ad0c7350f09cad/WO2014021715A2.pdf>
- Doran, T.J., Morris, K.R., Wise, T.G., O'Neil, T.E., Cooper, C.A., Jenkins, K.A., Tizard, M.L.V., 2017. Sex selection in layer chickens. *Anim. Prod. Sci.* 58, 476–480. <https://doi.org/10.1071/AN16785>
- EFSA, 2017. Animal welfare aspects in respect of the slaughter or killing of pregnant livestock animals (cattle, pigs, sheep, goats, horses). *EFSA Journal* 2017;15(5):4782.
- Eide, A.L., Glover, J.C., 1995. Development of the longitudinal projection patterns of lumbar primary sensory afferents in the chicken embryo. *J. Comp. Neurol.* 353, 247–259. <https://doi.org/10.1002/cne.903530207>
- Galli, R., Preusse, G., Schnabel, C., Bartels, T., Cramer, K., Krautwald-Junghanns, M.-E., Koch, E., Steiner, G., 2018. Sexing of chicken eggs by fluorescence and Raman spectroscopy through the shell membrane. *PLOS ONE* 13, e0192554. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192554>
- Göhler, D., Fischer, B., Meissner, S., 2017. In-ovo sexing of 14-day-old chicken embryos by pattern analysis in hyperspectral images (VIS/NIR spectra): A non-destructive method for layer lines with gender-specific down feather color. *Poult. Sci.* 96, 1–4. <https://doi.org/10.3382/ps/pew282>
- He, L., Martins, P., Huguenin, J., Van, T.-N.-N., Manso, T., Galindo, T., Gregoire, F., Catherinot, L., Molina, F., Espeut, J., 2019. Simple, sensitive and robust chicken specific sexing assays, compliant with large scale analysis. *PLoS ONE* 14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213033>
- iacuc-guidelines-on-euthanasia-of-chicken-and-embryos.pdf, n.d.
- Krautwald-Junghanns, M.-E., Cramer, K., Fischer, B., Förster, A., Galli, R., Kremer, F., Mapesa, E.U., Meissner, S., Preisinger, R., Preusse, G., Schnabel, C., Steiner, G., Bartels, T., 2018. Current approaches to avoid the culling of day-old male chicks in the layer industry, with special reference to spectroscopic methods. *Poult. Sci.* 97, 749–757. <https://doi.org/10.3382/ps/pex389>
- Margulis, M., Danielli, A., 2019. Rapid and Sensitive Detection of Repetitive Nucleic Acid Sequences Using Magnetically Modulated Biosensors. *ACS Omega* 4, 11749–11755. <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b01071>
- Petite, J.N., Kegelmeyer, A.E., 1995. Rapid sex determination of chick embryos using the polymerase chain reaction. *Anim. Biotechnol.* 6, 119–130. <https://doi.org/10.1080/10495399509525841>
- Quansah, E.S., Urwin, N.A., Strappe, P., Raidal, S., 2013. Progress towards generation of transgenic lines of chicken with a green fluorescent protein gene in the female specific (w) chromosome by sperm-mediated gene transfer. *Adv. Genet. Eng.* <https://doi.org/10.4172/2169-0111.S1.002>
- Rahman, A., Syduzzaman, M., Khaliduzzaman, A., Fujitani, S., Kashimori, A., Suzuki, T., Ogawa, Y., Kondo, N., 2020. Nondestructive sex-specific monitoring of early embryonic development rate in white layer chicken eggs using visible light transmission. *Br. Poult. Sci.* <https://doi.org/10.1080/00071668.2019.1702149>
- Rosenbruch, M., 1997. The sensitivity of chicken embryos in incubated eggs. *ALTEX* 14, 111–113.
- Rozenboim, I., Dor, E.B., 2016. Hyperspectral identification of egg fertility and gender. *US9435732B2*.
- Rozenboim, I., and E Ben Dor 2011 The use of reflectance spectroscopy for fertility detection in freshly laid egg and gender sorting in mid incubation period *Poult Sci* 90(E-suppl 1):98 (Abstr)
- Steiner, G., Bartels, T., Stelling, A., Krautwald-Junghanns, M.-E., Fuhrmann, H., Sablinskas, V., Koch, E., 2011. Gender determination of fertilized unincubated chicken eggs by infrared spectroscopic imaging. *Anal. Bioanal. Chem.* 400, 2775–2782. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-4941-3>
- Tran, H.T., Ferrell, W., Butt, T.R., 2010. An estrogen sensor for poultry sex sorting. *J. Anim. Sci.* 88, 1358–1364. <https://doi.org/10.2527/jas.2009-2212>
- UseofChickenAvianEmbryosApproved18May2017.pdf, n.d.
- Webster, B., Hayes, W., Pike, T.W., 2015. Avian Egg Odour Encodes Information on Embryo Sex, Fertility and Development. *PLOS ONE* 10, e0116345. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116345>

Références bibliographiques (suite)

- Weissmann, A., Foerster, A., Gottschalk, J., Reitemeier, S., Krautwald-Junghanns, M.-E., Preisinger, R., Einspanier, A., 2014. In ovo-gender identification in laying hen hybrids: Effects on hatching and production performance. Eur. Poult. Sci. 78. <https://doi.org/10.1399/eps.2014.25>
- Weissmann, A., Reitemeier, S., Hahn, A., Gottschalk, J., Einspanier, A., 2013. Sexing domestic chicken before hatch: A new method for in ovo gender identification. Theriogenology 80, 199–205. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.04.014>

Abstract : Advances in methods for ovosexing chicks

The laying hens were selected on their capacity to produce eggs for consumption. However, male chicks of the "laying" strains are eliminated at hatching due to their low meat yield. With the increase in societal sensitivity to the animal cause, the principle of giving birth to animals for immediate disposal is rejected by citizens. The announcement by the French and German agriculture ministers on 16 October 2019 of the end of the ban on the disposal of male broiler chicks by the end of 2021 has considerably accelerated the search for alternatives. The adoption of a technique will be subject to various ethical, economic and health criteria. Technological solutions for determining the sex of the embryo at an early stage in order to eliminate "male" eggs as early as possible are beginning to appear on the market, while others are under development. The solutions are based on the development of tools to detect molecular dimorphic differences (hormones, metabolites, genetics) and are based on sampling/dosing approaches or global technologies applied to the whole egg. Physical methods based on hyperspectral imaging, Raman spectroscopy or near-infrared spectroscopy... have the advantage of being non-contact. These are the ones that are likely to have a better chance of eventually fulfilling all the conditions for success.