



## ➤ Les défis de l'ovosexage précoce

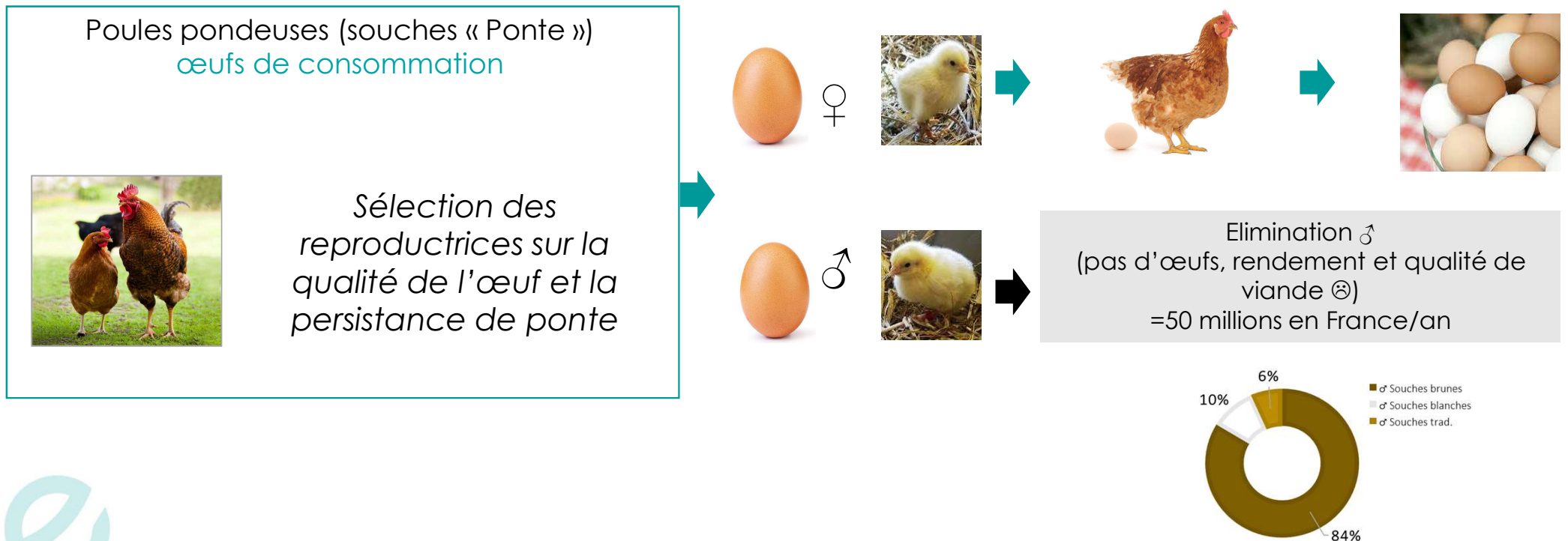
**Sophie REHAULT-GODBERT**

UMR Biologie des Oiseaux et Aviculture  
INRAE Centre Val de Loire  
37380 Nouzilly, France



# ➤ Historique et origine de la problématique en filière avicole

Quand les caractéristiques phénotypiques et physiologiques d'un sexe ne remplissent pas les critères de productivité et/ou de qualité du produit fini...



- 1 Élevage des frères de pondeuses
- 2 Souches mixtes
- 3 **Ovosexage (sexage *in ovo*)**



En cours de déploiement sur de nombreux couvoirs en France (décret du 05/02/2022)

- pas de modification majeure de l'organisation de la filière « œuf »
- pas de nécessité de mise en œuvre de nouveaux marchés en filière « volaille de chair »
- concentration des efforts chez les accouveurs

## ➤ Développement des techniques. En pratique (1/2)

### Démarche initiale

**Etape 1:** Etre capable de déterminer le sexe de l'embryon (PCR, anatomie)

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

**Etape 3:** Valider les marqueurs sur un grand nombre d'œufs provenant de souches de poules pondeuses génétiquement différentes et présentant des caractéristiques variées (poids/forme/propreté/couleur de coquille) voire chez d'autres espèces d'oiseaux (*Anas platyrhynchos*)

### Enjeux

- Précoce ( $\leq 6$  jours d'incubation) car controverse sur l'apparition de la douleur chez l'embryon après 6 jours
- Non invasif (absence d'impact sur le développement et la viabilité de l'embryon et des animaux après éclosion)
- Rapide, précis et efficace
- Applicable sur le terrain, sur souches diverses
- De coût acceptable pour les professionnels et le consommateur

## ➤ Développement des techniques. En pratique (2/2)

Le développement des techniques d'ovosexage est basé sur la détection de différences existant entre les œufs contenant un embryon ♂ ou un embryon ♀ = **dimorphisme sexuel**

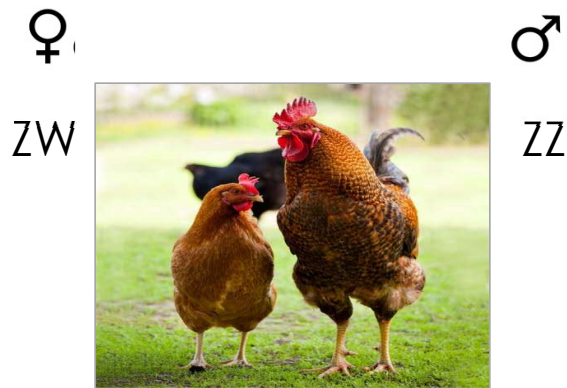
- 1 **génomique** (chromosomes sexuels/gonosomes)
- 2 **anatomique** (développement de l'appareil reproducteur (gonades))
- 3 **phénotypique** (couleur des plumes, cinétique de croissance, proportion de gras, etc.)
- 4 **moléculaire** (lipides, protéines, gènes, hormones, métabolites...)

Certains de ces caractères ne sont visibles/déTECTABLES que tardivement au cours de l'incubation et résultent de l'activation du génome et du métabolisme embryonnaire



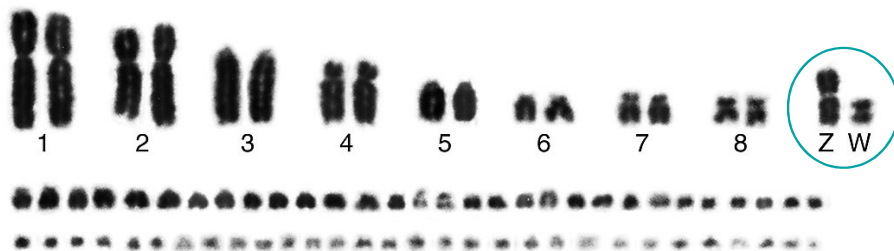
# 1 Différences génomiques liées aux chromosomes sexuels (1/2)

Héritage des chromosomes sexuels ♂ (ZZ) et ♀ (ZW) dès la fécondation dans l'appareil de reproducteur de la poule (23h avant la ponte)



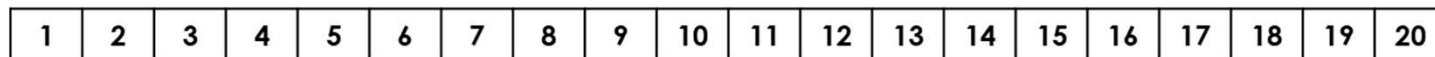
Différence de taille (Z=12W) et du nombre de gènes (W=179 gènes; Z=1671 gènes)

Différence de spécificité de gènes



# 1 Différences génomiques liées aux chromosomes sexuels (2/2)

Détection de gènes spécifiques des chromosomes Z et/ou W par PCR sur l'ADN des cellules embryonnaires ou extra-embryonnaires

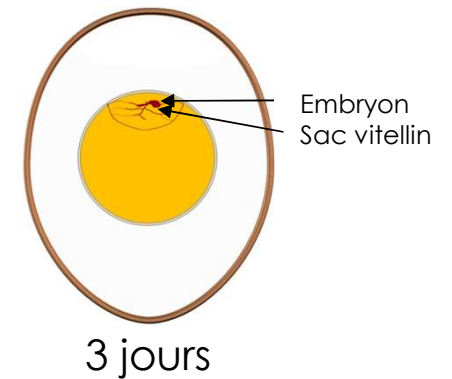


Chromosomes



Détection de gènes W/Z par PCR  
**Caractéristiques:** collecte du Liq.  
Allantoïque/ **semi-invasif** / toute souche

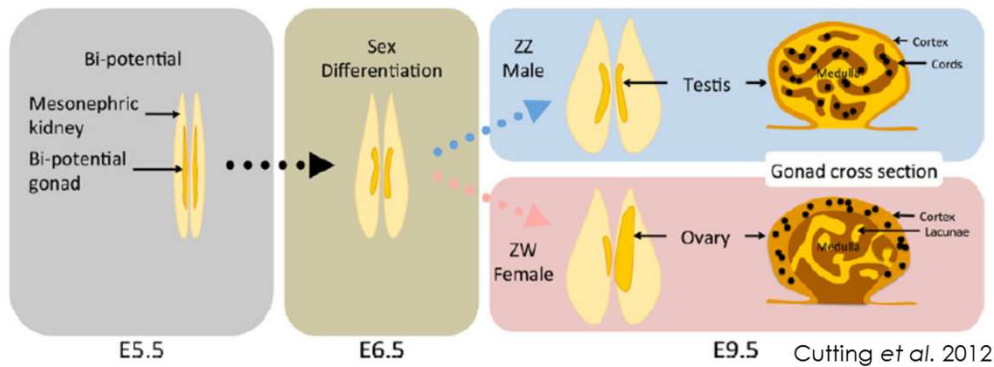
- Le liquide allantoïque ne se développe qu'à partir du 6<sup>ème</sup> jour d'incubation
- D'autres structures contiennent de l'ADN avant le 6<sup>ème</sup> jour (embryon, sac vitellin) mais processus de collecte prédit pour être très invasif



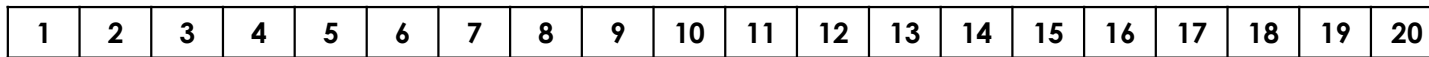
## ② Différences anatomiques (développement de l'appareil reproducteur)

Jour  
6,5

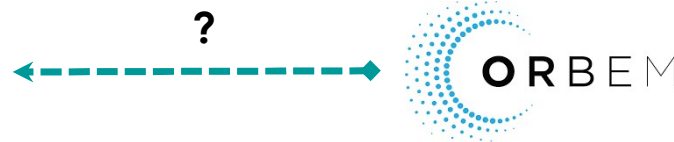
La différenciation anatomique des gonades commence à partir de 6,5 jours d'incubation



→ Différenciation morphologique détectable à l'œil nu, après dissection, dès 9,5 jours



Anatomie  
(gonades)



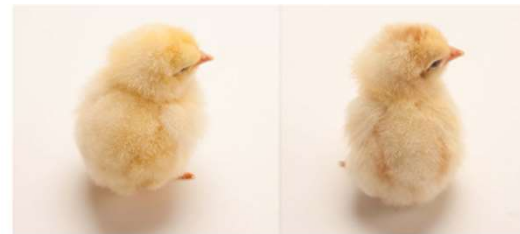
Imagerie IRM  
**Caractéristiques:** non-invasif / toute souche

### ③ Différences phénotypiques (couleur des plumes; yeux (canard))

Souche brune

♀

♂



1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----



Phénotype  
(couleur des  
plumes)



Méthodes hyperspectrales  
**Caractéristiques:** non-invasif /  
souche brune

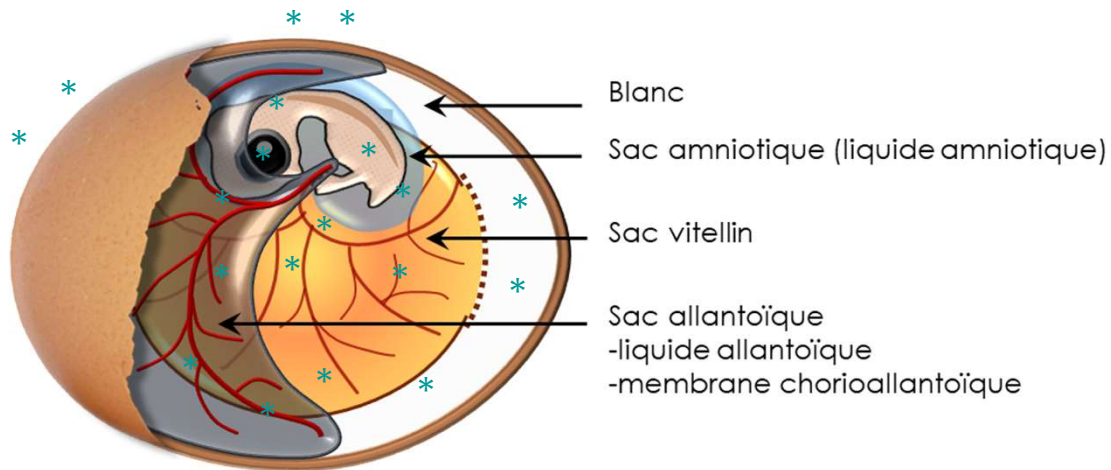


## ④ Différences moléculaires (gènes, protéines, métabolites, lipides, hormones...) (1/2)

→ Assimilation du jaune et du blanc différente entre les ♂ et les ♀  
(liée à des métabolismes ♂ et ♀ différents)

→ Excretion/secrétion/diffusion de molécules (\*) ♂ et ♀ dans le  
jaune / le blanc, à travers la coquille, et dans les structures extra-  
embryonnaires

Différence de  
profils moléculaires



Jour 3

Jour 1

Jour 5

©INRAE, M. Da Silva

## ④ Différences moléculaires (gènes, protéines, métabolites, lipides, hormones...) (2/2)



1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----



Moléculaire  
(Hormone)



Dosage du sulfate d'estrone (spécifique des ♀ dans le liquide allantoïque)  
**Caractéristiques:** semi-invasif / toute souche

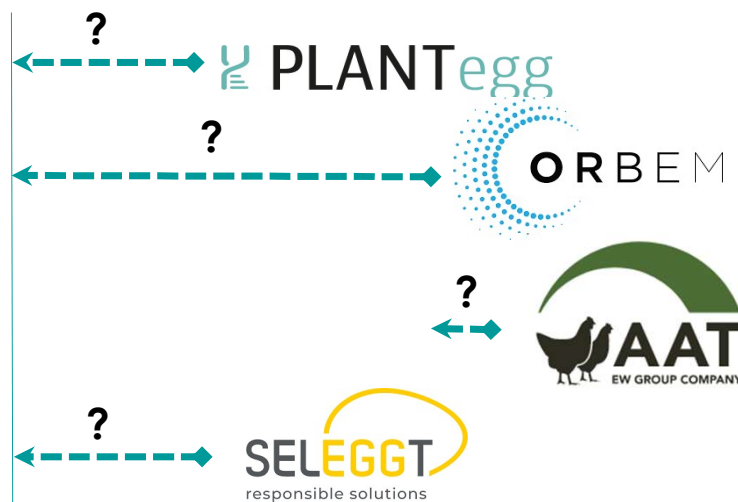
→ Le liquide allantoïque ne se développe qu'à partir du 6<sup>ème</sup> jour d'incubation

## > BILAN

Des outils qui dépendent du stade de développement des différentes structures embryonnaires/extra-embryonnaires avec des possibilités de détection à 6 jours d'incubation



1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----



- Chromosomes
- Anatomie (gonades)
- Phénotype (couleur des plumes)
- Moléculaire (Hormone)



Quid des biomarqueurs du sexe et des techniques d'ovosexage à des stades  $\leq 6$  jours d'incubation ?



Présentation des travaux du programme européen PPILOW



# > WP5 innovative alternatives to the elimination of one-day-old male layer chicks

Leader: Brieuc Desaint ITAB, France



PPILOW



Leader :  
INRAE

→ Objectif 1. Evaluation de souches mixtes (nouveaux croisements)



→ Objectif 2. Développement d'outils d'ovosexage

**Sous-tâche 1:** identification de biomarqueurs précoces du sexe in ovo = répertoire de molécules sexuelles dimorphiques (invasif)

**INRAE**

Centre Val de Loire, Nouzilly

**Sous-tâche 2:** Développement d'une technique d'ovosexage utilisant les ondes radiofréquences (non invasive)



Laboratoire d'Analyse et  
d'Architecture des Systèmes,  
Toulouse



# > WP5 innovative alternatives to the elimination of one-day-old male layer chicks

Leader: Briec Desaint ITAB, France



PPILOW

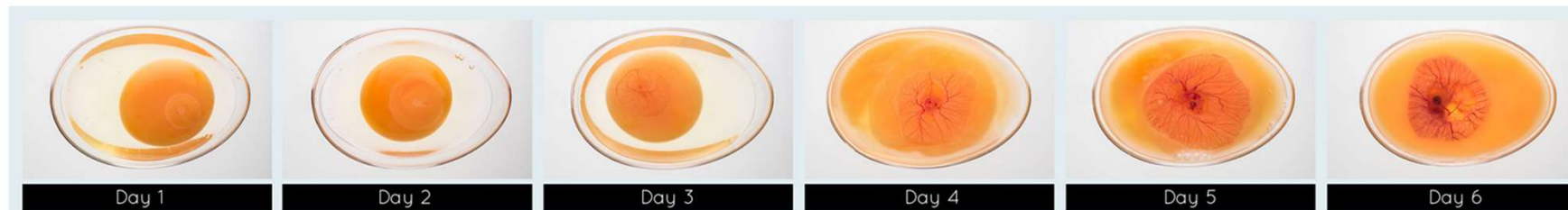


Leader :  
INRAE

**Sous-tâche 1:** identification de biomarqueurs précoces du sexe in ovo ( $\leq 6$  jours)

**INRAE**

Invasif: collecte des différentes structures de l'œuf ; identification du sexe de l'embryon (à partir de cellules embryonnaires ou extra-embryonnaires)



©ATT, ew group company

= répertoire de molécules sexuelles dimorphiques (gènes, protéines, lipides, métabolites et hormones...)

= intégration des résultats pour définir la structure ayant le profil dimorphique le + marqué (pour le dev. le techniques d'ovosexage ciblées sur cette structure)

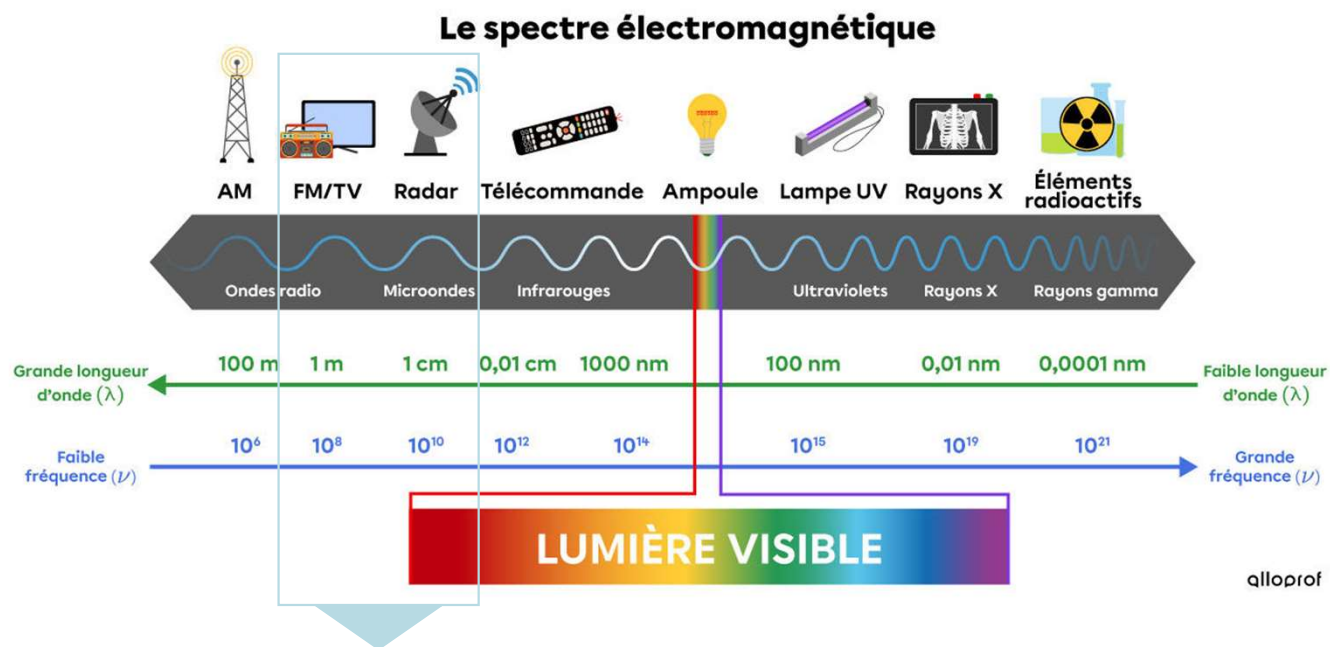
# WP5 innovative alternatives to the elimination of one-day-old male layer chicks

Leader: Briec Desaint ITAB, France



Leader :  
INRAE

**Sous-tâche 2:** Développement d'une technique d'ovosexage non invasive utilisant les ondes radiofréquences (RF et micro-ondes)



**Intérêt des ondes RF**  
 -gamme de fréquence = non ionisant, pas de nocivité  
 -faible coût (à priori)



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

# WP5 innovative alternatives to the elimination of one-day-old male layer chicks

Leader: Briec Desaint ITAB, France

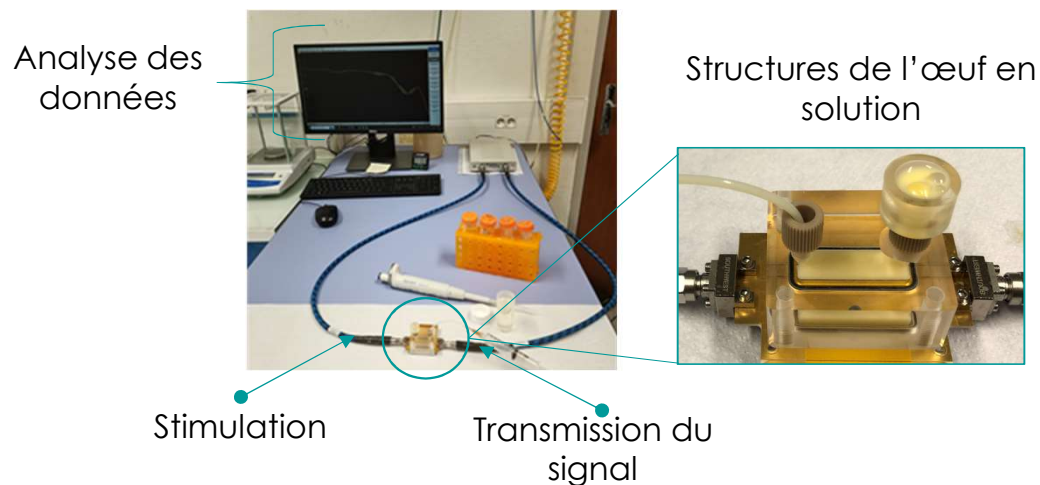


Leader :  
INRAE

**Sous-tâche 2:** Développement d'une technique d'ovosexage non invasive utilisant les ondes radiofréquences (RF et micro-ondes)



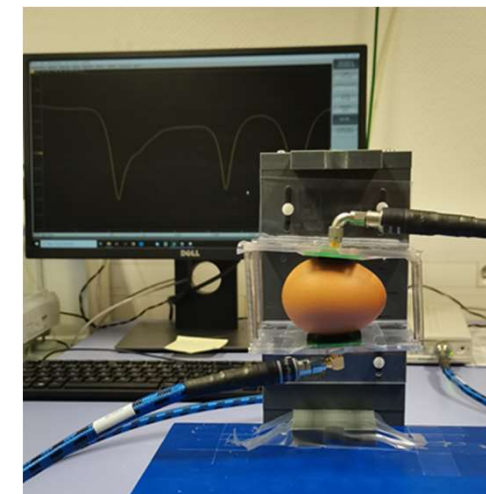
## Sur structures collectées de l'œuf (approche invasive)



Validation de l'approche RF pour discriminer le jaune et le blanc d'œuf:

Y. Kozhemyakin, S. Réhault-Godbert, D. Dubuc, K. Grenier. Millifluidic Sensor Designed to Perform the Microwave Dielectric Spectroscopy of Biological Liquids. 2022 European Microwave Conference, Sep 2022, Milan, Italy. ([hal-03805540](https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-03805540))

## Sur œuf entier (approche non invasive)



Set-up breveté  
FR3089298A1

Est-ce que les différences de profils RF peuvent s'expliquer par des différences moléculaires (Tâche 1) ?

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

## ➤ Take-home messages

Les méthodes de sexage in ovo reposent sur :

- Des différences liées aux chromosomes sexuels Z et W (J0)
- Des différences anatomiques (développement des gonades) (J6)
- Des différences phénotypiques (couleurs des plumes, etc.) (J12)
- Des différences moléculaires (J0?)
- Des différences métaboliques (cinétique d'utilisation des nutriments) (J0?)

Ces différences ♂ / ♀ apparaissent à des stades de développement spécifiques, ce qui risque de limiter les possibilités d'utiliser certaines approches d'ovosexage à des stades + précoces (car différences non visibles avant)

Mais il existe un potentiel pour certaines approches utilisables dès 6 jours d'incubation, voire avant 6 jours... (développement en cours)

## > Autres approches

### Orientation du sex-ratio en faveur des ♀

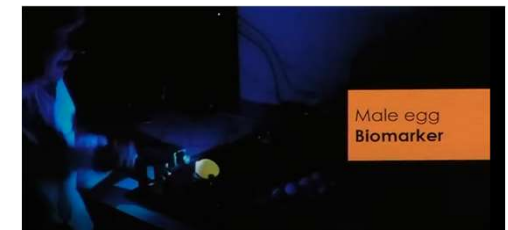


SOOS developed an incubation system that affect the sex development process in poultry embryo and turn genetic males into functional female chicks. Our system operate an incubation protocol that control a combination of:

- Temperature
- Humidity
- CO2 levels
- Sound Vibration

« During incubation, we influence the expression of genes responsible (DMRT1) for the development of the reproductive system...(to) transform male embryos into egg laying females »

### Edition de gènes: CRISPR/CAS9



Sexage avant incubation mais quelle acceptabilité d'un produit issu d'OGM ?

+ dépendance aux souches « éditées »...