

ANESTHESIE ELECTRIQUE D'EMBRYONS DE POUSSINS MALES AU DEUXIEME TIERS DE L'INCUBATION DANS LE RESPECT DU BIEN-ETRE ANIMAL

-

DE LA RECHERCHE FONDAMENTALE A LA PRATIQUE A HAUT RENDEMENT

Laura Zumbink¹, Anke Förster¹, Jörg Hurlin¹

¹*Agri Advanced Technologies GmbH - Hogenbögen 1 – 49429 VISBEK, Germany*
laura.zumbink@agri-at.com

RÉSUMÉ

Pour mettre fin à l'élimination des poussins mâles d'un jour, des méthodes d'identification rapides et fiables du sexe de l'embryon avant le développement d'une sensibilité à la douleur ont été recherchées. Si diverses études excluent la sensation de douleur avant le 7^e jour d'incubation, il n'existe aucune donnée fiable du 7^e au 15^e jour. Aucune méthode de sexage in ovo commercialisable, actuellement utilisée, n'est applicable avant le 7^e jour d'incubation. La question se pose : comment traiter les embryons mâles écartés après le 7^e jour d'incubation. Un flux électrique a été étudié pour anesthésier des embryons mâles afin d'éviter une éventuelle sensation de douleur pendant la fin du développement. Un courant de 110 V AC a été appliqué pendant 2 secondes à 304 et 56 œufs embryonnés. Après étude statistique, les réactions associées à une éventuelle conscience de la douleur étaient absentes chez 99,3 % des embryons examinés. Sur la base de ces résultats, le système "STUNNY" a été construit par AAT GmbH, en Allemagne, et testé dans un couvoir français. Cette étude terrain a confirmé qu'il est possible d'anesthésier les embryons dans le respect des exigences du bien-être animal. L'unité d'étourdissement à haut débit est associée à l'unité hyperspectrale de détermination du sexe in ovo pour une manipulation respectueuse des embryons mâles, et constitue ainsi une étape importante pour le respect du bien-être animal dans l'industrie des poules pondeuses.

ABSTRACT

Electrical anaesthesia of male chicken embryos in the second third of the incubation in compliance with animal welfare – from basic research to high-throughput operation

As the killing of male day-old chicks should be ended as soon as possible, practical methods are being sought to reliably and quickly determine the sex of the embryo before pain sensitivity is developed. While various studies exclude pain sensation in the first third of incubation, there is no clear evidence on pain sensation in the period from day 7 to 15. None of the currently used market-ready methods of in ovo sex determination is applicable in the first trimester. The question arises as how to handle the rejected male embryos in methods that are used from day 7 of incubation onwards. Electrical current flow was investigated as a method for anaesthesia of chicken embryos to avoid a possible pain sensation during the ending of the development. A current flow at 110 V AC was applied for 2 seconds to 304 and 56 embryonated eggs. The results were evaluated using descriptive statistics. Under these conditions embryonic reactions associated with possible awareness of pain were absent in 99.3% of the examined embryos. Based on these findings the high-throughput system for practical use "STUNNY" was constructed by AAT GmbH, Germany, which was tested in a French hatchery. This practical study confirmed that embryos can be anaesthetised in compliance with animal welfare requirements using the method of electrical anaesthesia with a high-throughput system. The stunning unit complements the hyperspectral in ovo sex determination unit by respectful handling of male embryos, and thus provides an important further step for welfare-friendliness in the laying hen industry.

INTRODUCTION

Les méthodes actuellement commercialisées pour la détermination du sexe in ovo des poules pondeuses sont mises en œuvre au deuxième tiers de l'incubation (Bourin et al., 2020 ; Preisinger, 2020 ; Richard, 2020). Il a été scientifiquement prouvé que la douleur n'est pas perceptible par les embryons au cours du premier tiers de l'incubation et qu'elle existe au troisième tiers. Pour le deuxième tiers (jour 7 à 14), il n'est pas certain que la douleur soit perceptible (Chumak, 1961 ; Mellor et Diesch, 2007 ; Bjørnstad et al., 2015 ; Deutscher Bundestag, 2017 ; Bartels et al., 2020). Une procédure d'étourdissement doit être utilisée pour insensibiliser les embryons avant élimination. Le règlement CE n° 1099/2009 autorise l'étourdissement et la mise à mort simultanés par perturbation mécanique. Cependant, cette méthode, perçue comme immorale n'est plus acceptée par la société (Hirt, 2004 ; Leenstra et al., 2011). On cherche donc une nouvelle méthode d'étourdissement qui soit plus humaine du point de vue du bien-être animal et qui soit mieux acceptée par la société.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Développement du concept d'étourdissement

Une des méthodes actuellement commercialisée pour la détermination du sexe in ovo est l'imagerie hyperspectrale pour les lignées de pondeuses issues de génotypes dont la couleur de plumage est liée au sexe, au 13^{ème} jour d'incubation, comme décrit par Göhler et al. (2017). Les méthodes d'étourdissement envisagées sont le courant électrique, le CO₂, la basse pression et l'utilisation d'anesthésiques. Différentes approches d'étourdissement électrique ont été testées afin de trouver une méthode applicable aux embryons mâles. L'étourdissement en bain d'eau électrisée est une procédure courante chez les poulets de chair et les poissons (Prinz et al., 2012 ; Reimers, 2008 ; Retter, 2014). Ce système d'étourdissement a été testé sur des œufs embryonnés placés entre deux électrodes à plaques dans un bassin d'eau. Dans une deuxième approche, une électrode a été appliquée sur chaque pôle, à l'extérieur de la coquille de l'œuf. Ces deux méthodes se sont avérées inappropriées car la coquille protège efficacement l'embryon. La perforation de la coquille avec une électrode sur chaque pôle est nécessaire pour conduire le flux électrique vers l'embryon (Fig. 1). Les premières expériences ont montré des résultats très prometteurs avec un flux de 2 secondes à 110 V et 50 Hz sinusoïdal. Par conséquent, un dispositif manuel a été mis au point, afin de contrôler les profondeurs de pénétration des électrodes pour différentes tailles d'œufs.

1.2 Preuve de concept

Deux essais ont permis de vérifier l'adéquation du concept d'étourdissement dans des conditions de laboratoire. Pour les deux essais, des œufs à couver Lohmann Brown (respectivement 298 et 49 œufs dans les essais 1 et 2) au 13^{ème} jour d'incubation ont été testés. Le rythme cardiaque des embryons a été mesu-

ré à l'aide d'un oscillographe et la température de la coquille avec un thermomètre infrarouge. Chaque œuf a été placé sur le banc d'essai et les électrodes ont été insérées à travers la coquille de l'œuf à chaque pôle. Pendant l'application de 2 secondes, l'intensité du courant a été enregistrée. Après le traitement, la coquille a été ouverte et l'embryon, le liquide et le jaune ont été placés sur une boîte de Pétri. Les embryons ont été évalués visuellement pendant au moins 60 secondes selon les critères suivants : ouverture du bec, mouvement de la tête, des ailes, des doigts/des pattes et réaction à une stimulation mécanique avec une pince. Dans l'essai 1, 13 œufs de l'échantillon non traités ont été évalués comme témoins. Un embryon était considéré anesthésié avec succès s'il ne présentait pas de mouvements spontanés ou de réactions à la stimulation mécanique.

La deuxième série d'essais a été menée pour déterminer si les électrodes pouvaient toucher et blesser l'embryon. À cette fin, le courant électrique a été appliqué à des œufs pré-perçés sur le banc d'essai orienté horizontalement. Avant le déclenchement du flux électrique, des parties de la coquille de l'œuf ont été retirées afin de permettre l'observation de l'embryon. À part cela, la procédure était la même que pour le premier essai. Des études statistiques ont été utilisées pour déterminer les paramètres de distribution et les mesures de variation des variables (Tableau 1). En appliquant le tableau de contingence, le test du khi-deux et les mesures d'association phi et V de Cramer, il a été déterminé si les variables indépendantes "battement de cœur", "courant maximal" et "température de l'œuf" avaient chacune un impact significatif sur la variable dépendante, le résultat de l'anesthésie. La régression logistique binaire a examiné l'association des trois variables indépendantes (rythme cardiaque, courant, température) avec la variable dépendante codée binaire (résultat de l'anesthésie). En outre, les cinq critères ont été évalués et comparés entre eux à l'aide des mesures d'association phi et V de Cramer. Le niveau de signification a été fixé à $p < 0,05$.

1.3 Unité d'étourdissement à haut débit

Les résultats de ces essais ont servi de base pour développer un système à haut débit entièrement automatisé, actuellement utilisé dans les couvoirs. En collaboration avec un institut indépendant pour le bien-être animal (bsi Schwarzenbek), le système à haut débit a été évalué sur la base d'examens cliniques d'embryons et de l'analyse des cadences. Des échantillons d'œufs ont été examinés cliniquement après le traitement. L'intensité électrique du dispositif a été vérifiée avec des appareils externes et de nombreux tests de perforations de coquille ont été mesurés (cf. von Wenzlawowicz, 2021).

2. RESULTATS ET DISCUSSION

Dans la première série d'expériences, 99,3 % des embryons traités ont été classés comme ayant été anesthésiés avec succès (tableau 2). Chez 29 embryons (10,1 %), des mouvements ont été observés,

cependant, ces embryons ont été considérés comme anesthésiés car les mouvements différaient significativement de ceux d'un embryon non traité. Les mouvements étaient saccadés et n'ont duré que 3,5 secondes (en moyenne) après le retrait des embryons de l'œuf, ils ont donc été considérés comme des réflexes et non comme un mouvement conscient.

Pour les variables "rythme cardiaque", "courant maximal" et "température de l'œuf", aucune corrélation significative n'a été établie avec le résultat de l'anesthésie. Les groupes traités et témoins différaient significativement dans les cinq critères d'évaluation. Les cinq critères étaient fortement associés au traitement. Dans la deuxième série de tests, aucune blessure causée par les électrodes n'a été détectée chez les embryons observés. À travers la fenêtre réalisée dans la coquille, on a observé que les embryons manifestaient une courte crampe pendant le passage du courant, après quoi ils étaient inanimés. Cependant, la fenêtre ne pouvait être réalisée dans le montage expérimental qu'après que les électrodes aient pénétré dans la coquille de l'œuf. Aucune lésion de l'embryon avant la perfusion électrique n'a été observée. (Zumbrink et al., 2020). Sur 49 traitements, 48 embryons ont été classés comme ayant été anesthésiés avec succès (tableau 3). Après le traitement dans la machine à haut débit, les embryons examinés cliniquement ont été considérés comme anesthésiés avec succès en raison de l'absence de mouvements et de réactions, selon Zumbrink et al. (2020). Le niveau de réussite de la machine n'a pas pu être représenté de manière analogue aux essais. Pour la machine, la fonctionnalité, les valeurs mesurées et la documentation ont été essentiellement testées. Seul un petit échantillon d'embryons a été examiné visuellement, comme lors des essais. Cependant, étant donné que la machine fonctionne de manière fiable selon la procédure conçue lors de l'essai, on peut supposer un niveau d'efficacité tout aussi élevé (>99%). Dans son ensemble, l'appareil d'étourdissement a été jugé conforme pour un étourdissement efficace des embryons dans l'œuf au 13^{ième} jour d'incubation. D'un point de vue pratique, l'étourdissement et la mise à mort simultanés par perturbation mécanique est non seulement autorisée par la loi (Règlement CE 1099/2009 ; TierSchlV), mais elle est également considérée comme un moyen rapide et sûr de mettre fin au développement embryonnaire sans souffrance (Jaksch, 1981 ; Bandow, 1987, loc. Cit. à Close et al., 1997 ; Hirt, 2004 ; AVMA ; 2020). Cependant, cette pratique est souvent jugée contraire à la déontologie (Jaksch, 1981 ; Gassmann-Langmoen et Schatzmann, 1990, loc. Cit. à Hirt, 2004). Les personnes interrogées dans les sondages préfèrent majoritairement l'utilisation du CO₂ (Leenstra et al., 2011), bien que cette dernière soit critiquée d'un point de vue scientifique (Schatzmann 1997, loc. Cit. to Hirt, 2004; Hirt, 2004; Lourens and Gerritzen, 2009). Le gaz et la réfrigération n'ont pas été utilisés parce que les procédures prennent beaucoup de temps et que le moment de l'étourdissement

ou de la mort ne peut être clairement identifié (Lourens et Gerritzen, 2009, AVMA, 2020). Il en va de même pour la basse pression atmosphérique (Battula et al., 2008 ; Vizzier-Thaxton et al., 2010 ; Schilling et al., 2012 ; McKeegan et al., 2013). L'utilisation d'anesthésiants est d'une part coûteuse et d'autre part, ne permet pas l'utilisation des sous-produits dans les aliments pour animaux ou les aliments pour animaux de compagnie (AVMA, 2020). L'utilisation des résidus d'œufs à couvrir comme source de protéines de haute qualité est considérée comme pertinente par les personnes sondées (Leenstra et al., 2011) et rend le processus particulièrement durable et économe en ressources. Les résidus issus de l'étourdissement électrique sont, selon le règlement CE 1069/2009, classés en catégorie 3 et peuvent donc être utilisés comme source de protéines de haute qualité dans les aliments pour animaux. Les réflexes tels que le réflexe cornéen, qui peut être utilisé chez les oiseaux pour évaluer le niveau de narcotique (Heatley, 2008 loc. Cit. à Lierz et Korbel, 2012), ne sont pas encore développés chez les embryons au 13^{ième} jour d'incubation. À l'inverse, Prinz et al. (2012) ont conclu que les réflexes ne peuvent pas être utilisés pour évaluer l'état d'anesthésie des poulets de chair. Cependant, cet essai porte sur des embryons et un EEG ne peut être mesuré à cet âge (Mellor et Diesch, 2007). Selon Chumak (1961) et Aleksandrowicz et Herr (2015), l'absence d'ouverture du bec, de mouvements de la tête, des ailes, des doigts ou des pattes et de réaction à une stimulation mécanique peuvent servir de base pour évaluer la réussite de l'anesthésie. Les cinq critères retenus se sont avérés très pertinents pour l'évaluation. L'évaluation statistique avec phi et V de Cramers a montré une forte corrélation entre le traitement et les cinq critères ($r = 0,872$ pour l'ouverture du bec et $r = 0,959$ pour les quatre autres critères).

Zumbrink et al. (2020) ont conclu que la mesure de l'ampérage en tant que moyenne quadratique donne des valeurs plus fiables que les mesures de la valeur maximale qu'ils ont utilisées. Par conséquent, la mesure de la moyenne quadratique a été mise en œuvre pour la machine à haut débit. Aucune des études n'a permis de déterminer une valeur seuil, un résultat efficace est obtenu avec un courant électrique stable généré pendant les deux secondes. (Zumbrink et al., 2020 ; von Wenzlawowicz, 2021).

CONCLUSION

En résumé, l'étourdissement électrique décrit dans cet article permet une anesthésie rapide, respectueuse et reconnue des embryons mâles dans l'œuf et a pour but de les mettre dans un état d'insensibilité temporaire avant élimination. Ils sont ainsi protégés de la perception de la douleur. La perfusion des œufs avec une tension appliquée de 110 volts peut garantir cet état. L'étude du système à haut débit a permis de conclure que la technologie entièrement automatisée met en œuvre le concept d'étourdissement comme il se doit et convient donc aux embryons de poussins mâles au cours du deuxième tiers de l'incubation.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aleksandrowicz, E., Herr, I., 2015. ALTEX 32(2), 143-147.
- American Veterinary Medical Association (AVMA), 2020.
- Bandow, J.H., 1987. Report for the Canadian Federation of Humane Societies, Ontario, Canada.
- Bartels, T., Wilk, I., Schrader, L., 2020. Friedrich-Loeffler-Institut, Greifswald – Insel Riems.
- Battula, V., Schilling, M. W., Vizzier-Thaxton, Y., Behrends, J. M., Williams, J. B., Schmidt, T. B., 2008. Poult.Sci., 87(6), 1202-1210.
- Bjørnstad, S., Austdal, L. P. E., Roald, B., Glover, J. C., Paulsen, R. E., 2015. J.Pharmacol.Exp.Ther., (355), 386-396.
- Bourin, M., Puterflam, J., Bouvarel, I., 2020. Tema, (54), 1-8.
- Chumak, V.I., 1961: In: Voprosy fiziologii i patologii tsentral'noi nervnoi sistemy cheloveka i zhivotnykh v ontogeneze. Sbornik, Moskva, 63-68.
- Close, B., Banister, K., Baumans, V., Bernoth, E. M., Bromage, N., Bunyan, J., Erhardt, W.E., Flecknell, P., Gregory, N., Hackbarth, H., Morton, D., Warwick, C., 1997. Laboratory animals, 31(1), 1-32.
- Deutscher Bundestag, 2017. Wissenschaftliche Dienste, Sachstand WD 8 - 3000 - 030/17.
- Gassmann-Langmoen, A.-B., Schatzmann, U., 1990. Stiftung Forschung 3R, CH-3110 Münsingen.
- Göhler, D., Fischer, B., Meissner, S., 2017. Poult.Sci., (96), 1-4.
- Heatley, J.J., 2008. In: BSAVA Manual of Raptors, Pigeons and Passerine Birds. Chitty, J., M. Lierz, BSAVA Publishing, Gloucester, UK, 97-113.
- Hirt, H., 2004. In: Situationsanalyse Schweiz 2004. Forschungsinstitut für biologischen Landbau (FiBL).
- Jaksch, W., 1981. International Journal for the Study of Animal Problems, 2(4), 203-213.
- Leenstra, F., Munnichs, G., Beekman, V., Van Den Heuvel-Vromans, E., Aramyan, L., Woelders, H., 2011. Animal Welfare, 20(1), 37-45.
- Lierz, M., Korbel, R., 2012. Journal of Exotic Pet Medicine, (21), 44-58.
- Lourens, A., Gerritzen, M.A., 2009. Animal Sciences Group van Wageningen UR, Lelystad.
- McKeegan, D. E. F., Sandercock, D. A., Gerritzen, M. A., 2013. Poult.Sci., 92(4), 858-868.
- Mellor, D.J., Diesch, T.J., 2007. New Zealand Vet.J., 55(2), 51-60.
- Preisinger, R., 2020. Schweizer Geflügelzeitung, 8/2020, 14-17.
- Prinz, S., Coenen, A., Ehinger, F., Van Oijen, G., Bessei, W., 2012. Arch.Geflügelk., 76(1), 63-71.
- Reimers, U., 2008. Tierärztliche Hochschule, Hannover.
- Retter, K., 2014. Tierärztliche Hochschule, Hannover.
- Richard, L., 2020. DGS-Magazin, 31/2020, 14-19.
- Schatzmann, U., 1997. In: Das Buch vom Tierschutz. Sambras, H.H., Steiger, A. (éditeur) Ferdinand Enke Verlag Stuttgart, 686-704.
- Schilling, M. W., Radhakrishnan, V., Vizzier-Thaxton, Y., Christensen, K., Joseph, P., Williams, J. B., Schmidt, T. B., 2012. Poult.Sci., 91(12), 3214-3222.
- Vizzier-Thaxton, Y., Christensen, K. D., Schilling, M. W., Buhr, R. J., Thaxton, J. P., 2010. J.Appl.Poult.Res., 19(4), 341-348.
- Von Wenzlawowicz, M., 2021. Available at: https://www.agri-at.com/images/flyer/Investigation_Report_BSI_Stunning_Chicken_Embryos.pdf
- Zumbrink, L., Brenig, B., Foerster, A., Hurlin, J., Von Wenzlawowicz, M., 2020. Europ Poult Sci, (84), 1-11.

Tableau 1. Paramètres de localisation et mesures de la variation du rythme cardiaque, de la température de la coquille et du courant dans la série d'essais 1

		Battement de cœur	Température de l'œuf	Intensité du courant
		BPM	°C	A
N		299	299	286
Moyenne		205	32.2	3.82
Médiane		204	32.5	3.83
Standard deviation		44	1.70	.716
Variance		1926	2.88	.512
Minimum		74	25.0	.65
Maximum		297	35.5	5.65
Percentiles	25	176	31.0	3.45
	50	204	32.5	3.83
	75	242	33.5	4.29

Tableau 2. Fréquences des mouvements survenus dans les groupes expérimentaux lors de l'essai 1

	N (%)	Ouverture du bec	Mouvement de la tête	Mouvement des ailes	Mouvement des doigts / pattes	Réaction à une stimulation mécanique
Anesthésié	283 (99.3)	4	22	6	7	5
Non-anesthésié	2 (0.7)	1	1	2	2	1
Témoin	13 (100)	10	12	12	12	12

Tableau 3. Distribution de la fréquence absolue et relative des résultats de l'anesthésie dans l'essai 2

	Absolue	Relative (%)	Cumulée (%)
Sans mouvement /anesthésié	47	95.9	95.9
Avec mouvement /anesthésié	1	2.0	97.9
Avec mouvement /non-anesthésié	1	2.0	100.0

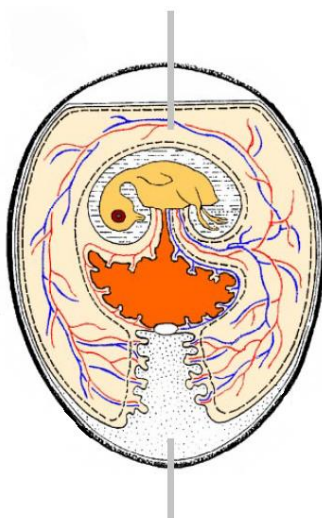


Figure 1. Schéma de la perforation électrique (modifié d'après Kalweit et Burmeister, 1995).