

La question de la sensibilité de l'embryon dans le cadre de l'ovosexage

Etat des connaissances

BOURIN M.¹, REHAULT-GODBERT S.², GAUTRON J.², BOISSY A.³, TERLOUW C.³, MARGUERIE J.⁴, QUENTIN M.¹

Contact : bourin@itavi.asso.fr

¹ ITAVI – NOUZILLY

² INRAE – NOUZILLY

³ INRAE – SAINT-GENES-CHAMPANELLE

⁴ Réseau Cristal - BRESSUIRE



Etude financée par :



Résumé

L'élimination des poussins mâles est interdite en France depuis le 1er janvier 2023, et cette loi concerne principalement les poules brunes, représentant 85% à 90% de la production nationale. L'ovosexage a émergé ces dernières années comme étant une solution pour répondre à cette réglementation. Des études montrent que la plupart des consommateurs européens, notamment en France (55%), en Suisse (25%) et en Allemagne (70%), sont mal informés sur l'élimination des poussins mâles et ceux qui sont informés soutiennent des alternatives comme l'élevage des frères de poules ou la détermination du sexe in ovo. Cet intérêt croissant souligne un enjeu éthique majeur, directement lié au stade de développement embryonnaire et aux capacités sensorielles potentielles des embryons. D'un point de vue anatomique, le développement embryonnaire des poulets se déroule en plusieurs phases, avec un développement progressif du système nerveux, et des capacités de perception de la nociception ont été mises en évidence chez certains individus dès le 15ème jour de développement. Bien que les embryons semblent ne pas être conscients avant le 15ème jour, des incertitudes subsistent sur leur perception de la douleur entre le 8ème et le 15ème jour. Des méthodes d'euthanasie adaptées aux stades embryonnaires sont recommandées, et de nouvelles techniques d'ovosexage non invasif sont en cours de développement pour concilier bien-être animal et acceptabilité par les consommateurs.

1. Contexte

Depuis les années 1950, l'industrie avicole s'est spécialisée ce qui a conduit à une distinction entre la filière des poules pondeuses avec une production d'œufs par poule qui a doublé, et celle des volailles de chair avec une vitesse de croissance des poulets qui a quadruplé dans le même temps. Cette spécialisation est la résultante d'une corrélation négative entre les critères de reproduction et de croissance. Pour la filière ponte, elle a abouti au constat d'une « non-valeur » du poussin mâle, frère des futures poules pondeuses en raison d'une croissance plus lente et de rendements en viande plus faibles que les volailles de la filière chair (Mueller et al., 2018). Plusieurs milliards de poussins mâles d'un jour sont donc éliminés chaque année dans le monde. En France, c'étaient plus de 50 millions de poussins mâles qui étaient tués chaque année. Un

constat dénoncé par les ONG de protection animale et un rejet de plus en plus important des consommateurs, le plus souvent peu informés de ces pratiques.

Des initiatives de recherche internationales se sont multipliées ces dernières années pour détecter le plus précocement possible le sexe des poussins « in-ovo », et certains états membres encouragent le développement d'alternatives permettant la fin de l'élimination systématique des poussins mâles d'un jour.

La première alternative à l'élimination des poussins vivants est l'élevage des « frères des poules ». Elle consiste à garder les poussins mâles nés en filière pondeuse, et à les élever pour leur chair. Elle reste peu pratiquée aujourd'hui car l'engraissement des poulets mâles n'est pas rentable en raison des coûts élevés résultant de la longue période

d'engraissement et d'une faible efficacité alimentaire, ainsi que du faible prix dû à la faible qualité de la viande et à l'aspect peu attrayant des produits. En effet, les carcasses des poulets mâles ont un os du bréchet proéminent et les filets sont très peu épais (Mueller *et al.*, 2018).

Une autre possibilité est d'élever des souches dites « Mixtes » (Duales ou à double fin). Il s'agit de croisements entre des souches de lignée ponte et de lignée chair. Un compromis par rapport aux lignées spécialisées de pondeuses et de poulets de chair, avec des performances limitées en ponte et en engraissement. Moins d'œufs (près de 25% de moins) pour les poules et un engraissement qui devra être prolongé au-delà des 5 semaines standard pour les mâles, impliquant des coûts de productions élevés (Mueller *et al.*, 2018).

Des méthodes s'intéressent aussi à la détection du sexe du poussin dans l'œuf, permettant d'écarter les œufs contenant des poussins mâles avant l'éclosion. Deux types de techniques d'ovosexages sont utilisées aujourd'hui (Rehault-Godbert *et al.*, 2023) :

- Détection de marqueurs biologiques (ADN, hormones, métabolites) : prélèvement de liquide allantoïque pour identifier le sexe via des marqueurs chromosomiques ou moléculaires.
- Analyse phénotypique par imagerie : identification du sexe grâce à des différences physiques précoces (duvet, yeux, organes reproducteurs) détectées via l'imagerie hyperspectrale, l'IRM ou des technologies émergentes telles que les radiofréquences.
- Biotechnologies (peu acceptées en Europe) : inversion du sexe via des conditions d'incubation modifiées ou édition génétique introduisant un marqueur fluorescent sur le chromosome Z. Ces approches restent controversées en raison de leurs implications éthiques et sociétales.

Un décret paru le 5 février 2022 au journal officiel acte la fin progressive de la mise à mort des poussins mâles dans les filières des poules pondeuses françaises. Les couvoirs français avaient jusqu'à la fin de l'année 2022 pour se préparer et installer le matériel nécessaire à la mise en œuvre de méthodes alternatives.

Ainsi l'élimination des poussins mâles est interdite en France depuis le 1er janvier 2023. Cette nouvelle loi concerne uniquement les poules brunes (pour lesquelles une solution commerciale existe), soit 85% à 90% de la production française. Avec ce décret, la France a suivi les décisions déjà prises en Europe par l'Allemagne et la Suisse sur la non élimination des poussins mâles.

L'ovosexage est une technique de choix pour répondre à cet objectif car elle ne nécessite pas de changement organisationnel majeurs dans les filières de production ou de nouveaux marchés de valorisation. Cette technique implique toutefois l'élimination des œufs mâles qui n'est pas sans poser de nouvelles questions éthiques. Il est nécessaire de prendre en compte la sensibilité de l'embryon qu'il soit mâle (car éliminé avant éclosion) ou femelle (dans le cas d'une méthode d'ovosexage invasive) mais son évaluation reste complexe. Par ailleurs, l'élimination de ces œufs embryonnés engendre des déchets qui pourront être valorisés au même titre que les œufs embryonnés non éclos issus de ces mêmes couvoirs (déchets de catégorie 2) en vue de certaines utilisations autres que l'alimentation des animaux (engrais organiques, conversion en biogaz, compostage...).

L'objectif de cette synthèse est de faire un point bibliographique le plus large possible de nos connaissances sur la sensibilité de l'embryon.

2. Développement de l'embryon et de son système nerveux : une approche anatomique du développement et de la sensibilité

Hamburger et Hamilton (1951) ont décrit trois phases principales du développement embryonnaire des poulets (précoce, moyen, tardif), couvrant toute la période d'incubation de 21 jours. Les deux premières phases concernent la formation des organes et systèmes, tandis que la dernière phase concerne leur croissance et maturation. Leur tableau des stades, composé de 45 étapes (HH), est couramment utilisé pour classer ce développement. Eyal-Giladi et Kochav (1976) ont, quant à eux, détaillé les premières phases préoviposition en 14 stades, la combinaison des deux étant une référence exhaustive du développement embryonnaire (Hamburger & Hamilton, 1951; Eyal-Giladi & Kochav, 1976).

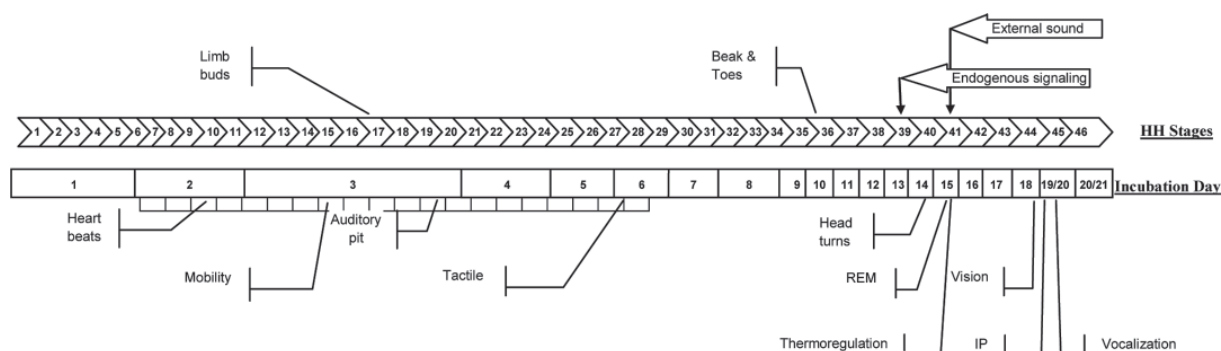


Figure 1 : Chronologie et début des principales étapes fonctionnelles du développement embryonnaire. HH = Hamburger et Hamilton ; REM : rapid-eye movement ; IP : internal pipping (Tong *et al.*, 2013).

Le développement des organes commence rapidement, avec un cœur battant à 44 heures d'incubation, des bourgeons des membres et une fosse auditive visibles dès le troisième jour. Les organes reproducteurs et les mouvements volontaires se développent aux jours 5 et 6, et à J7, le cœur est entièrement enfermé dans la cavité thoracique, les bourgeons des plumes apparaissent. Le bec se durcit à J10 et l'embryon adopte sa position d'éclosion à J14. L'activité cérébrale débute à J15 avec les mouvements oculaires rapides (REM), signalant la préparation à l'éclosion (Mellor *et al.*, 2010; Mellor & Diesch, 2007; Tong *et al.*, 2013) (Figure 2).

Le développement du système nerveux central (SNC) chez l'embryon de poulet débute dès le deuxième jour d'incubation et atteint sa maturité avant l'éclosion à J21. À partir du troisième jour, les mouvements spontanés de l'embryon sont visibles, témoignant de l'interaction entre les systèmes squelettique, musculaire et nerveux (Tong *et al.*, 2013). Les activités neurologiques sensorielles se manifestent progressivement : le sens tactile à partir de J6, la proprioception entre J8 et J10, le goût vers J12, l'audition de J12 à J14, la vue à J18, et l'olfaction à J20 (Tong *et al.*, 2013).

Les mouvements de l'embryon se développent en plusieurs étapes : tronc à J3, mouvements corporels généralisés à J7, mouvements unilatéraux des membres à J8, et mouvements bilatéraux simultanés à J9. Ces mouvements atteignent leur pic vers J12 et s'arrêtent juste avant l'éclosion (Wu *et al.*, 2001). Parallèlement, l'amnios, membrane entourant l'embryon, effectue ses propres contractions, dont l'activité atteint son maximum à J9 avant de diminuer progressivement pour s'arrêter à J18. Ce mouvement de l'amnios facilite le balancement de l'embryon et prévient l'adhérence aux membranes

embryonnaires, complétant ainsi les mouvements embryonnaires (Wu *et al.*, 2001).

Le développement précoce des neurones pose un défi important, car ils doivent étendre leurs axones à travers un environnement complexe. Par exemple, les nerfs rachidiens, responsables de la sensibilité périphérique des membres, se développent dès les premiers stades embryonnaires, à partir du quatrième jour. Les axones longitudinaux se développent ensuite en un faisceau unique jusqu'à J10, puis se subdivisent en différentes structures (Figure 3) (Eide and Glover, 1995; Tonsey, 1991).

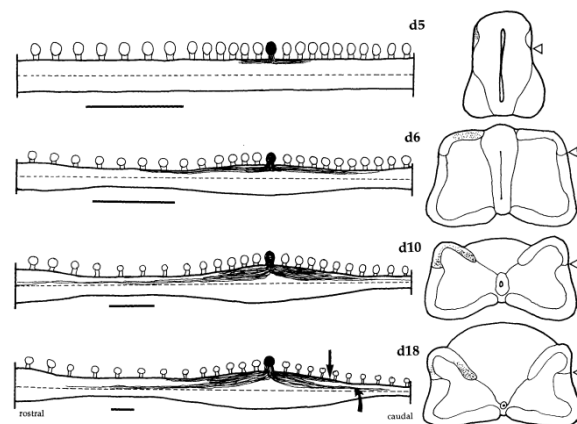


Figure 3 : Schéma illustrant l'extension longitudinale et la distribution transversale des axones sensoriels afférents aux stades de développement indiqués. Les dessins de gauche représentent les axones longitudinaux d'un côté de la moelle épinière, vus de la surface dorsale. Les sections transversales prises aux niveaux indiqués sont illustrées dans les dessins de droite. Le tractus de Lissauer (flèche droite) et le funicule dorsal (flèche courbe) ne sont distincts qu'après le 10e jour (Eide and Glover, 1995).

Dans le système ganglionnaire de la racine dorsale en développement, George *et al.* (2010) ont montré que les neurones sensoriels sont produits en deux vagues distinctes. Les neurones TrkB+ et TrkC+ de grand diamètre, responsables de la transmission des informations proprioceptives et mécanocéptives, sont générés en premier, à partir du 3^e jour

d'incubation, aux stades 16 et 19 de Hamburger/Hamilton, respectivement.

Les neurones TrkA+ de petit diamètre, qui transmettent la sensation de douleur et de température, émergent lors de la deuxième vague de neurogenèse, débutant au stade 25 et s'étendant du 5^e au 7^e jour d'incubation.

Entre les jours 8 et 10, le système nerveux de l'embryon devient plus complexe, atteignant une organisation proche de celle du système adulte. À J8, la prolifération neuronale est presque achevée, indiquant que l'embryon possède la majorité des neurones qu'aura la moelle épinière adulte (Hamburger, 1952). Les nerfs périphériques se sont développés et ont établi des connexions avec des structures non nerveuses, et les trajets de fibres intra-centraux forment ou ont formé leurs connexions synaptiques spécifiques. Ces observations neuroanatomiques suggèrent la **présence précoce de connexions nerveuses dès J7, permettant la sensibilité, voire potentiellement la douleur. Cependant, la simple existence de ces connexions ne prouve pas la capacité de l'embryon à ressentir la douleur.**

3. Comment évaluer la sensibilité des embryons ?

3.1. Les notions de nociception et de douleur

Les neurones spécialisés du système somatosensoriel, appelés nocicepteurs, sont activés par des stimuli nocifs, susceptibles de causer des dommages tissulaires. Ils se trouvent dans la peau, les articulations, les muscles et les organes internes, et réagissent à des stimuli tels que la température (thermorécepteurs), des substances chimiques (chimiorécepteurs) et la pression (mécanorécepteurs). D'autres récepteurs, sensibles au toucher, appartiennent au système somatosensoriel non nociceptif. Lorsque les nocicepteurs sont activés au-delà d'un certain seuil, ils provoquent la perception de la douleur. La douleur, liée à un potentiel dommage tissulaire, alerte l'organisme, la rendant difficile à ignorer.

Les nocicepteurs transforment un stimulus nocif en message nerveux, transmis ensuite à des neurones spécialisés appelés nocicepteurs secondaires, situés dans la corne dorsale de la moelle épinière. Ces signaux sont relayés vers diverses structures cérébrales qui forment la "matrice de la douleur", un réseau comprenant des structures du tronc cérébral,

des régions sous-corticales et des zones corticales. La perception de la douleur résulte de l'activité coordonnée de ces régions, bien que la plupart ne soient pas spécifiques à la douleur. Par exemple, ces régions répondent également à des stimuli tactiles, auditifs et visuels de manière similaire aux stimuli nociceptifs.

L'Association internationale pour l'étude de la douleur précise que la douleur associe deux dimensions : la dimension sensorielle (nature, intensité, durée du stimulus) et la dimension motivationnelle-affective (le caractère désagréable) (Terlouw and Bourguet, 2022). Ainsi, la douleur est une expérience nociceptive couplée à une sensation affective négative, associée à des régions cérébrales distinctes pour chaque composante.

Il est donc crucial de ne pas confondre nociception et douleur. La nociception réfère à la perception sensorielle, avec activation des voies neuronales par des stimuli représentant un danger potentiel, mais sans nécessairement impliquer une expérience émotionnelle de douleur. La douleur, elle, est définie comme une expérience désagréable sensorielle et émotionnelle liée à un dommage tissulaire réel ou potentiel. Pour qu'une douleur soit ressentie, la conscience est nécessaire, car elle permet d'évaluer un stimulus comme désagréable.

Ainsi, un animal inconscient ne peut pas ressentir la douleur, même avec un système nerveux mature et des circuits de nociception fonctionnels. C'est pourquoi, pour déterminer si un embryon de poulet peut ressentir la douleur, il est indispensable de connaître son état de conscience.

3.2. Les réactions d'un embryon de poulet face à un stimulus nociceptif

L'acquisition de la capacité de nociception chez les embryons de poulet n'est pas encore complètement élucidée. Une étude de 2023 menée par Weiss *et al.* a exploré cette capacité à ressentir des stimulus nociceptifs en se basant sur des paramètres cardiovasculaires. Ils ont comparé les changements de pression artérielle et de fréquence cardiaque en réponse à un stimulus mécanique nocif appliqué à la base du bec d'embryons de poulet (entre 7 et 18 jours de développement) à ceux provoqués par un simple toucher (contrôle négatif). La pression artérielle moyenne a été identifiée comme le paramètre le plus sensible. Des augmentations significatives de la pression artérielle ont été observées à partir du 16^{ème} jour, et des modifications

significatives de la fréquence cardiaque ont été notées aux 17^{ème} et 18^{ème} jour. Dans certains cas, une réponse cardiovasculaire était possible dès le 15^{ème} jour. L'application de lidocaïne, un anesthésique local, avant le stimulus a significativement réduit la réponse cardiovasculaire au 18^e jour, confirmant que ces changements étaient liés à la nociception (Weiss *et al.*, 2023).

En parallèle, Süß *et al.* (2023) ont examiné les réponses comportementales des embryons de poulet à un stimulus nocif, en analysant les mouvements du bec après stimulation. Une augmentation significative des mouvements a été observée entre le 15^{ème} et le 18^{ème} jour, alors qu'aucune réponse comportementale n'a été détectée chez les embryons plus jeunes. Ces mouvements ont été interprétés comme une réponse à un stimulus nocif appliqué au bec, suggérant que la capacité de nociception se manifeste à partir du 15^{ème} jour de développement embryonnaire (Süß *et al.*, 2023).

3.3. Capacité d'interprétation des signaux nociceptifs et sensibilité embryonnaire

3.3.1. Chez les mammifères

L'avis de l'EFSA de 2017 sur le bien-être des animaux d'élevage durant l'abattage ou la mise à mort des femelles en gestation (bovins, porcins, ovins, caprins, chevaux) conclut que les fœtus dans le dernier tiers de la gestation possèdent les structures anatomiques et neurophysiologiques nécessaires pour ressentir la douleur. Cependant, les analyses électroencéphalographiques (EEG) révèlent que leur activité neurophysiologique n'indique pas une perception consciente, ce qui signifie le plus probablement que les fœtus ne peuvent pas ressentir la douleur (More *et al.*, 2017).

Le développement neurologique, évalué à partir de l'EEG, suit un schéma similaire chez diverses espèces mais le moment d'émergence de la conscience diffère en fonction de la maturité des animaux au moment de leur naissance, les plus matures pouvant montrer les premiers signes de conscience un peu avant la naissance et les moins matures plusieurs jours voire semaine après la naissance. Tout d'abord, l'EEG est isoélectrique (absence d'activité cérébrale), puis des pointes intermittentes apparaissent, suivies de périodes continues mais indifférenciées, toutes caractéristiques d'un état d'inconscience (Diesch *et al.*, 2007). Enfin, l'EEG se différencie finalement par

des schémas alternés de type sommeil à mouvements oculaires rapides (REM) et non REM, avec l'ajout ultérieur de caractéristiques indiquant la présence d'une conscience. La chronologie de ces changements apparaissant en fin de gestation ou au moment de la naissance, varie en fonction de la maturité neurologique à la naissance.

Chez les marsupiaux comme le wallaby, qui naissent extrêmement immatures, l'EEG reste isoélectrique (signe d'inconscience) jusqu'à environ 100-120 jours dans la poche de la mère. Puis il devient continu vers 150-160 jours, et la conscience émerge vers 160-180 jours. Le développement neurologique de ces jeunes se poursuit dans la poche après une courte gestation d'environ 28 jours. Les signes comportementaux, tels que l'ouverture des yeux et les premières sorties de la poche, apparaissent progressivement entre 140 et 190 jours d'âge.

Chez les rats, également immatures à la naissance, l'EEG est isoélectrique ou indifférencié, et la différenciation REM/non-REM (associée à la conscience) survient entre les 12^e et 18^e jours postnataux.

Pour les agneaux, espèce plus mature à la naissance, la différenciation REM/non-REM apparaît juste avant la naissance (environ 80 % de la gestation). Le fœtus est maintenu dans un état d'inconscience semblable au sommeil grâce à divers facteurs neuro-inhibiteurs présents in utero. La conscience n'émerge que quelques minutes après la naissance (Diesch *et al.*, 2007).

3.3.2. Chez les embryons d'oiseaux

Les poulets sont des espèces aviaires précoces et sont plus avancés morphologiquement au cours de leur développement que les espèces nidicoles. Les poussins éclosent avec des capacités fonctionnelles, comme se déplacer, se nourrir et prendre soin d'eux-mêmes. Il est donc **raisonnable d'émettre l'hypothèse** que la capacité neurologique des embryons à percevoir la douleur **pourrait être déjà présente avant l'éclosion**. Cependant, **le moment précis du développement embryonnaire** auquel cette aptitude est **suffisamment établie pour susciter une préoccupation** n'a pas encore été déterminé (ACUC, 2019).

Dans son avis de 2017, l'EFSA a extrapolé la période d'insensibilité des mammifères matures à la naissance, au poulet, déterminant un stade de développement comparable à celui défini par

l'ACUC, soit environ 13,8 jours d'incubation (66 % de la période totale de 21 jours).

3.4. Ce que nous apprennent les profils EEG pour les embryons d'oiseaux

Pour rechercher les traces de consciences chez l'embryon aviaire, plusieurs équipes de recherche ont mesuré les profils EEG des poulets de chair au cours de leur développement embryonnaire.

Peters *et al* (1965) ont mis en évidence des enregistrements électriques bipolaires des lobes cérébraux montrant que l'activité électrique spontanée apparaît chez l'embryon de poulet entre le 11^e et le 13^e jour d'incubation. En revanche, les schémas électroencéphalographiques (EEG) typiques du sommeil ou de l'attention n'émergent qu'après l'éclosion, dans les six premières heures. Les ondes lentes de faible amplitude correspondent au sommeil, tandis que les ondes rapides de faible amplitude traduisent un état d'attention comportementale. Ainsi, d'après Peters *et al* (1965), à 19 jours d'incubation, même si les embryons réagissent à une stimulation tactile, ces réactions sont probablement réflexes, leurs lobes cérébraux n'exprimant pas encore les ondes rapides associées à l'attention.

Les études de Peters *et al.* (1965) ont été reprises par Mellor et Diesch (2007), qui concluent que le cerveau des poussins est trop immature pour soutenir des états conscients pendant au moins la première moitié de l'incubation. Ils montrent que l'activité EEG évolue progressivement, avec une absence d'activité détectable avant le 13^e ou 14^e jour. À partir du 15^e jour, des pointes intermittentes apparaissent, suivies d'une activité EEG plus soutenue au 17^e jour. Ainsi, Mellor et Diesch (2007) suggèrent que les poussins ne peuvent pas présenter un état de conscience avant le 17^e jour et restent dans un état d'inconscience semblable au sommeil profond jusqu'à l'éclosion.

Une étude récente de Kollmansperger *et al.* (2023) a montré que l'embryon de poulet développe une activité cérébrale structurée autour du 13^e jour d'incubation embryonnaire, marquant l'apparition d'un EEG comparable, en amplitude, à celui observé juste après l'éclosion. Avant ce stade, les signaux restent faibles et ne permettent pas de supposer un traitement central de l'information. À partir du 13^e jour d'incubation embryonnaire, l'activité EEG reste dominée par des ondes lentes de type delta, indiquant un état proche du sommeil plutôt qu'une

forme d'attention ou de conscience. Même au 19^e jour d'incubation embryonnaire, les réactions aux stimulations tactiles semblent essentiellement réflexes, car les schémas EEG associés à la perception consciente ne sont pas encore présents. Bien que les nocicepteurs périphériques soient fonctionnels, rien n'indique que leurs signaux soient traités de manière centrale ou consciente avant l'éclosion. Ces éléments convergent vers une absence probable de traitement nociceptif conscient chez l'embryon avant et autour du 13^e jour d'incubation (Kollmansperger *et al.*, 2023).

3.5. L'action des neurosuppresseurs

La question se pose de savoir si les états EEG de type sommeil peuvent être maintenus chez l'embryon de poulet après le 17^e jour grâce à des neurosuppresseurs. C'est l'hypothèse développée par Mellor and Diesch (2007)

Adénosine et état de l'oxygène

L'adénosine semble jouer un rôle de modulateur de l'EEG et de neuro-suppresseur chez les embryons de poulets et les jeunes éclos, comme c'est le cas chez d'autres espèces de mammifères à différents stades de développement. Cette hypothèse repose sur des observations indiquant que les antagonistes des récepteurs de l'adénosine, tels que la caféine, favorisent l'éveil et perturbent le sommeil, tandis que les agonistes ont tendance à favoriser le sommeil (Dunwiddie & Masino, 2001; Obal & Krueger, 2003). Des études ont également montré que l'adénosine inhibe l'activité neuronale dans les noyaux cholinergiques, structures impliquées dans la régulation de l'éveil, et que son administration via dialyse dans ces régions induit le sommeil et réduit l'éveil mesuré par l'activité EEG (Rainnie *et al.*, 1994). Chez les moutons, l'adénosine joue un rôle inhibiteur dans le système nerveux central (SNC) pendant les cycles veille-sommeil et affecte les états de sommeil des fœtus d'agneaux (Mellor & Diesch, 2007). En outre, elle supprime l'activité EEG lors d'épisodes anoxiques et hypoxiques chez plusieurs mammifères, comme les agneaux, les chiens et les rats, où l'hypoxémie augmente les concentrations d'adénosine tandis que l'hyperoxémie les diminue (Mellor *et al.*, 2005). **Toutefois, les effets spécifiques de l'adénosine chez les oiseaux n'ont pas encore été démontrés.**

Suppresseurs neurostéroïdiens et leurs sources possibles

Chez les embryons d'espèces aviaires, y compris les poulets domestiques, il existe des preuves que les neurostéroïdes supprimeurs agissent via le système inhibiteur GABA. Contrairement aux mammifères où les $3\alpha, 5\alpha$ -stéroïdes comme l'allopregnanolone et la pregnanolone sont impliqués, l'hormone principale chez les oiseaux est le $3\beta, 5\beta$ -stéroïde épipregnanolone. La progestérone peut également jouer un rôle en agissant sur ce système chez les oiseaux. De plus, comme pour le cerveau fœtal des mammifères, il est établi que la stéroïdogénèse de novo à partir du cholestérol se produit dans le cerveau des vertébrés aviaires (Tsutsui, 2001), notamment chez les adultes, qui produisent de la prégnénolone et de la progestérone à partir du cholestérol.

Chez les embryons de poussins, la progestérone dérivée du vitellus, ainsi que l'épipregnanolone, est probablement plus disponible au début et au milieu de l'incubation qu'avant l'éclosion. Cela est dû aux concentrations plus élevées de progestérone dans les couches externes et intermédiaires du vitellus par rapport aux couches internes (Hackl *et al.*, 2003; Möstl *et al.*, 2001), car l'utilisation progressive du vitellus se fait de l'extérieur vers l'intérieur. **Malgré la preuve d'une action neurostéroïdienne suppressive sur le SNC des poussins pré-éclos via le système GABA, aucune étude n'a encore examiné les effets spécifiques de l'épipregnanolone, de la progestérone ou de leurs antagonistes sur l'EEG des poussins à différents stades d'incubation (Mellor & Diesch, 2007)..**

Suppression thermique (chaleur)

Après le bêchage interne à J19 – J20 de l'incubation, les poussins pré-éclos répondent au refroidissement par des vocalisations de détresse accrues, comme le font les poussins après l'éclosion, et cela stimule la poule à se réinstaller sur ses œufs ou ses poussins pour les réchauffer, ce qui ramène les vocalisations à leur niveau initial. Ce refroidissement des poussins provoque des modifications de l'EEG et du comportement qui reflètent les transitions entre les états de sommeil profond non-REM et les états de sommeil paradoxal un peu plus éveillés. De ce constat, Mellor et Diesch, (2007) ont émis l'hypothèse que la chaleur a des effets neuro-supprimeurs chez les poussins également (Mellor and Diesch, 2007).

Cependant, ceci n'a pas été démontré chez les oiseaux.

Position du cou et suppression proprioceptive possible

Au fur et à mesure que l'incubation progresse, le poussin devient de plus en plus à l'étroit à l'intérieur de l'œuf. Dès le 17^{ème} ou 18^{ème} jour, son cou est replié sur le côté et sa tête se place sous la membrane de la chambre à air. Cette position du cou se maintient après le bêchage interne et externe et jusqu'à ce que le poussin s'échappe de la coquille après l'éclosion. Jusqu'à ce moment, les enregistrements électroencéphalographiques (EEG) suggèrent que des états d'inconscience semblables au sommeil prédominent, et il a été démontré que ces états peuvent être restaurés chez les poussins après l'éclosion en les replaçant dans cette position de flexion caractéristique (Bekoff and Kauer, 1984; Bekoff and Sabichi, 1987; Bour and Bakhuis, 1980).

De plus, cette position de flexion semble induire un sommeil qui peut empêcher l'éveil en réponse à des stimuli sonores, tactiles ou vibratoires qui seraient normalement efficaces chez des poussins non restreints. Partant de ces observations, Mellor et Diesch (2007) ont émis l'hypothèse que **la stimulation proprioceptive du cou replié pourrait jouer un rôle dans la prévention des états d'excitation chez les poussins en phase de pré-éclosion et d'éclosion. Cependant, cette hypothèse n'a pas encore été démontrée à ce jour.**

4. Des méthodes d'euthanasie des embryons

Bien que de nombreuses études indiquent une absence certaine de perception de la douleur chez l'embryon de poulet durant le premier tiers de l'incubation, il n'existe pas encore de données fiables concernant la période entre le 8^{ème} et le 15^{ème} jour d'incubation. Toutefois, il est établi que les embryons ayant dépassé 80 % de leur période d'incubation montrent une activité EEG soutenue, avec des augmentations d'amplitude qui suggèrent une possible perception de la douleur. Face à ces éléments, il est nécessaire de développer des procédures d'euthanasie respectueuses du bien-être animal et acceptables pour le consommateur afin

Ovosexage : perception des consommateurs et conditions d'acceptabilité

La question du sexe des embryons et des alternatives à l'élimination des poussins mâles reste un sujet sensible pour les consommateurs européens. Bien que les citoyens soient globalement favorables à des solutions alternatives, leur acceptabilité varie fortement selon le pays, la méthode utilisée et le stade d'incubation. En France, une enquête CSA (2021) révèle que 55 % des consommateurs sont informés de la problématique, dont 67 % la jugent « choquante ». Parmi les alternatives, l'élevage des poussins mâles est préféré (71 %), devant la détection du sexe avant éclosion (48 %), avec une préférence pour le stade J9 (29 %) plutôt que J13 (19 %).

Des travaux menés aux Pays-Bas (Gremmen *et al.*, 2018) et en Allemagne (Reithmayer *et al.*, 2021a, 2021b) confirment cette tendance à la préférence pour les méthodes précoces d'ovosexage (J1 à J4), mais soulignent l'absence de consensus clair sur une méthode. L'introduction d'images illustrant le développement embryonnaire renforce par ailleurs la préférence pour les techniques les plus précoces (Reithmayer *et al.*, 2021b). Les consommateurs « éthiques » (41 % de l'échantillon allemand) déclarent être capables d'ajouter plus de 8 € pour une boîte de 10 œufs si l'ovosexage intervient avant l'incubation, 6,80 € à J4 et 3,50 € à J9.

Enfin, bien que certaines options comme l'édition génomique soient envisageables sur le plan technique, elles restent peu acceptées socialement. La comparaison entre l'acceptation d'une méthode OGM et celle de l'élimination post-éclosion montre que l'éthique animale est parfois reléguée derrière des inquiétudes liées à la sécurité alimentaire. En somme, l'acceptabilité de l'ovosexage est marquée par des arbitrages complexes entre bien-être animal, stade embryonnaire, usages des sous-produits et attentes sociétales.

d'interrompre le processus d'incubation (Leary *et al.*, 2020 ; Zumbrink *et al.*, 2020).

L'American Veterinary Medical Association (AVMA) et l'Animal Care and Use Committee (ACUC) ont recommandé des protocoles d'euthanasie en fonction du stade de développement des embryons de poulet (ACUC, 2019, 2012 ; Leary *et al.*, 2020).

- Avant 13 jours, l'hypothermie, bien que non recommandée par les directives de l'AVMA, est utilisée pour les embryons de cet âge, supposés incapables de ressentir la douleur. Elle consiste à placer les œufs dans un congélateur à -20°C ou < 4°C pendant 4 heures. La mort doit ensuite être confirmée par décapitation, rupture de la membrane ou macération.
- Entre 13 et 17 jours : les embryons, pouvant potentiellement ressentir la douleur, doivent être euthanasiés par une méthode jugée acceptable selon les directives de l'AVMA. Cela inclut la dislocation cervicale, la décapitation, l'injection de barbituriques, l'inhalation de dioxyde de carbone (CO₂), l'inhalation de monoxyde de carbone (CO), l'anesthésie par inhalation et la macération à l'aide d'un équipement spécialisé.
- À partir de 18 jours : l'euthanasie peut être effectuée par l'inhalation de CO₂, l'administration d'agents anesthésiques ou la

décapitation. La respiration pulmonaire embryonnaire débutant au 7^e jour, l'environnement embryonnaire naturel peut contenir jusqu'à 14 % de CO₂. Ainsi, pour procéder à l'euthanasie, les œufs embryonnés doivent être exposés à des concentrations élevées de CO₂ (enceintes fermées). Les concentrations de CO₂ peuvent varier de 60 à 90 % avec une application de 5 à 20 minutes.

En 2020, Zumbrink *et al.* ont proposé une méthode d'anesthésie électrique applicable aux embryons mâles durant le deuxième tiers de la période d'incubation. Un courant de 110 V AC a été appliqué pendant 2 secondes aux œufs embryonnés, en insérant des électrodes à travers la coquille aux deux pôles de l'œuf. Les profondeurs de pénétration étaient fixées à 22 mm (pôle supérieur) et 12 mm (pôle inférieur) afin de traverser la chambre à air sans rapprocher excessivement les électrodes, pour éviter un court-circuit. La réussite de l'anesthésie a été évaluée selon cinq critères : absence d'ouverture du bec, de mouvement de la tête, des ailes, des doigts ou des pieds, et absence de réaction à une stimulation tactile (Aleksandrowicz and Herr, 2015). L'anesthésie était jugée efficace si aucun mouvement spontané et coordonné n'était détecté. Dans cette expérimentation, 99,3 % des embryons ont été considérés anesthésiés, et l'absence de réaction suggère qu'ils ne ressentaient pas la

douleur. L'échec dans 0,7 % des cas a été attribué à des conditions spécifiques, comme un volume élevé de blanc et de jaune entourant l'embryon qui pourrait avoir atténué l'effet du courant électrique.

Étant donné que la recherche est encore en évolution et que des différences spécifiques existent entre les espèces, l'euthanasie des embryons de volailles doit être réalisée sur la base des données les plus fiables disponibles, en veillant autant que possible à éviter toute souffrance. Les recommandations actuelles en matière d'euthanasie des embryons de poulet sont largement basées sur les directives de l'AVMA et de l'ACUC, antérieures aux derniers articles parus et dans lesquels une conscience avant 15 jours de développement embryonnaire semble très peu probable. Par ailleurs, les fondements scientifiques sur lesquels se basent l'ACUC et l'AVMA sont insuffisamment explicites, et les données disponibles dans la littérature restent limitées. Certaines méthodes préconisées entre 13 et 17 jours (ex. dislocation cervicale, injection de barbituriques) nécessitent l'ouverture de l'œuf, ce qui pose des questions de protection animale si l'embryon est viable. De même, les concentrations de CO₂ recommandées à partir de 18 jours ne sont pas clairement étayées. Des alternatives comme l'électronarcose apparaissent prometteuses mais demandent encore validation. Une actualisation rigoureuse des recommandations, intégrant les avancées en neuro-développement embryonnaire, est donc nécessaire.

5. Conclusion

La sensibilité de l'embryon est une question éthique liée à l'élimination des œufs embryonnés lors de l'ovosexage. En effet, le broyage des poussins mâles actuellement utilisé est une méthode de mise à mort efficace au regard de la protection animale mais est inacceptable pour les ONG de protection animale et les consommateurs.

Les travaux de recherche disponibles sur la question sont peu nombreux et parfois anciens. Si de nombreux faisceaux de présomptions laissent supposer que les embryons de poulets ne sont pas conscients avant le 15^{ème} jour d'incubation (EEG plats, présence éventuelle de neurosuppresseurs), il n'existe actuellement pas de résultats fiables sur la perception de la douleur pour la période comprise entre le 8^{ème} et le 15^{ème} jour d'incubation, ni dans les derniers jours d'incubation d'ailleurs, ou seule la capacité de nociception a été démontrée. Beaucoup

de questions restent en suspens et des recherches sont nécessaires pour lever ces zones d'ombres :

- Les nouvelles techniques d'EEG permettraient-elles aujourd'hui de mieux appréhender l'état de conscience des embryons à partir du 7^{ème} jour d'incubation ? En effet, les articles mentionnant ces EEG sont très anciens (datent des années 70), et les avancées sur ces méthodes ont été très importantes ces dernières années.
- Les neurosuppresseurs tels que l'adénosine, l'épipregnanolone, la progestérone D2 décrits chez les mammifères ont-ils les mêmes effets chez les oiseaux ?
- Les températures élevées (> à 36° C pour le poulet) avant l'éclosion permettent-elles de garder l'embryon dans un état de sommeil profond ?

Répondre à ces questions permettrait une avancée importante sur la compréhension des mécanismes qui sous-tendent l'état de conscience des embryons de poulet et le stade auquel cette conscience apparaît. Par ailleurs, la question de la sensibilité de l'embryon au cours de son développement ne peut pas être négligée car elle conditionne l'acceptabilité des techniques par le consommateur et le coût d'une future méthode !

Il semble néanmoins certain que cette conscience ne peut être présente avant 7 jours d'incubation et développer des nouvelles techniques capables de prédire précocement (jusqu'à 15 jours d'incubation) le sexe des embryons permettra de résoudre cette question de la sensibilité.

Ces nouvelles techniques devront également répondre à plusieurs enjeux, en plus de la précocité de la prédiction. En effet, il faudra qu'elle soit non invasive pour éviter des effets néfastes sur la qualité sanitaire des œufs à couvrir mais aussi sur la croissance, la productivité, la santé et le bien-être des futures poules pondeuses. Il sera nécessaire aussi que ces méthodes puissent être utilisées sur les œufs des souches présentes sur le marché, qu'elles soient aussi fiables et rapides pour répondre aux exigences des accoueurs en termes de cadence et de coût acceptable pour les professionnels et les consommateurs.

Plusieurs méthodes à l'étude actuellement pourraient répondre en partie à ces enjeux. C'est le cas de l'étude des différences moléculaires (gènes, métabolites, hormones...) entre les 2 sexes à des

stades précoces, mais aussi de l'édition de gènes. Parmi ces nouvelles méthodes, nous pouvons citer :

- L'identification de biomarqueur précoces du sexe in ovo (Projet PPILOW, INRAE, Sophie Réhault-Godberg, 2022) : cette méthode est invasive mais permettrait une prédiction du sexe avant 6 jours d'incubation.
- Le développement d'une technique d'ovosexage non invasive utilisant les ondes radiofréquences (Projet PPILOW, CNRS, 2022) avec une prédiction possible avant 6 jours
- Un sexage avant incubation grâce à l'édition de gène mais qui pose la question de l'acceptabilité d'un produit issu d'OGM et de la dépendance aux souches « éditées » pour mettre en oeuvre cette méthode.

D'autres méthodes visant à orienter le sexe-ratio en faveur des femelles sont aussi évaluées avec l'objectif de produire des volailles phénotypiquement

femelles capable de pondre des œufs à partir d'œufs génétiquement mâles. La société SOOS a mis au point une méthode basée sur l'émission d'ondes sonores les 16 premiers jours d'incubation permettant de modifier le sexe-ratio pour obtenir en moyenne 64 % d'œufs phénotypiquement femelles. Les femelles issues d'œufs génétiquement mâle ont à l'âge adulte les mêmes performances de ponte que les « vraies » femelles. Pour l'instant, cette méthode ne peut pas se substituer aux méthodes d'ovosexage (près de 35 % des œufs donnent des poussins phénotypiquement mâles), mais pourrait devenir complémentaire à ces méthodes à la condition de raccourcir le temps de traitement par les ondes sonores pour répondre aux enjeux de précocité de prédiction du sexe.

6. Remerciements

Ce projet a été conduit dans le cadre du projet CASDAR YOONG grâce aux financements de la DGER et du CNPO

Références bibliographiques

- ACUC, 2019. The Use of Chicken/Avian Embryos.
- ACUC, 2012. The Use and Euthanasia Procedures of Chicken/Avian Embryos.
- Aleksandrowicz, E., Herr, I., 2015. Ethical euthanasia and short-term anesthesia of the chick embryo. *Altex-Altern. Anim. Exp.* 32, 143–147. <https://doi.org/10/f7fw6j>
- Bekoff, A., Kauer, J., 1984. Neural control of hatching: fate of the pattern generator for the leg movements of hatching in post-hatching chicks. *J. Neurosci.* 4, 2659–2666. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.04-11-02659.1984>
- Bekoff, A., Sabichi, A.L., 1987. Sensory control of the initiation of hatching in chicks: effects of a local anesthetic injected into the neck. *Dev. Psychobiol.* 20, 489–495. <https://doi.org/10.1002/dev.420200503>
- Bour, H.L.M.G., Bakhuis, W.L., 1980. The Behavioural State During Climax (Hatching) in the Domestic Fowl (*Gallus Domesticus*). *Behaviour* 73, 77–104. <https://doi.org/10.1163/156853980X00177>
- Diesch, T.J., Mellor, D.J., Johnson, C.B., Lentle, R.G., 2007. Responsiveness to painful stimuli in anaesthetised newborn and young animals of varying neurological maturity (wallaby joeys, rat pups and lambs). *Proc 6th World Congr. Altern. Anim. Use Life Sci.* 549–552.
- Dunwiddie, T.V., Masino, S.A., 2001. The role and regulation of adenosine in the central nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* 24, 31–55. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.24.1.31>
- 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/crxg5k>
- Eyal-Giladi, H., Kochav, S., 1976. From cleavage to primitive streak formation: A complementary normal table and a new look at the first stages of the development of the chick: I. General morphology. *Dev. Biol.* 49, 321–337. <https://doi.org/10/cbjs3p>
- Gremmen, B., Bruijn, M.R.N., Blok, V., Stassen, E.N., 2018. A Public Survey on Handling Male Chicks in the Dutch Egg Sector. *J. Agric. Environ. Ethics* 31, 93–107. <https://doi.org/10/gh37m3>
- Hackl, R., Bromundt, V., Daisley, J., Kotschal, K., Möstl, E., 2003. Distribution and origin of steroid hormones in the yolk of Japanese quail eggs (*Coturnix coturnix japonica*). *J. Comp. Physiol. B* 173, 327–331. <https://doi.org/10.1007/s00360-003-0339-7>

Références bibliographiques

- Hamburger, V., 1952. Development of the Nervous System. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 55, 117–132. <https://doi.org/10/d8wbjf>
- Hamburger, V., Hamilton, H.L., 1951. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morphol.* 88, 49–92. <https://doi.org/10/bmkn6c>
- Kollmansperger, S., Anders, M., Werner, J., Saller, A., Weiss, L., Süß, S., Reiser, J., Schneider, G., Schusser, B., Baumgartner, C., Fenzl, T., 2023. Nociception in chicken embryos, Part II: Embryonal development of electroencephalic neuronal activity in ovo as a prerequisite for nociception. <https://doi.org/10.1101/2023.04.14.536947>
- Leary, S., Pharmaceuticals, F., Underwood, W., Anthony, R., Cartner, S., Johnson, C.L., Patterson-Kane, E., 2020. AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2020 Edition 121.
- Mellor, D.J., Diesch, T.J., 2007. Birth and hatching: Key events in the onset of awareness in the lamb and chick. *N. Z. Vet. J.* 55, 51–60. <https://doi.org/10/br9rzj>
- Mellor, D.J., Diesch, T.J., Johnson, C.B., 2010. Legal and animal welfare implications of when consciousness first appears in developing young and of the potential for delayed, in: AAWS International Animal Welfare Conference. AAWS International Animal Welfare Conference, p. 8.
- More, S., Bicoût, D., Botner, A., Butterworth, A., Calistri, P., Depner, K., Edwards, S., Garin-Bastuji, B., Good, M., Schmidt, C.G., Michel, V., Miranda, M.A., Nielsen, S.S., Velarde, A., Thulke, H.-H., Sihvonen, L., Spooler, H., Stegeman, J.A., Raj, M., Willeberg, P., Candiani, D., Winckler, C., 2017. Animal welfare aspects in respect of the slaughter or killing of pregnant livestock animals (cattle, pigs, sheep, goats, horses). *EFSA J.* 15, e04782. <https://doi.org/10/gh37m6>
- Möstl, E., Spendier, H., Kotrschal, K., 2001. Concentration of immunoreactive progesterone and androgens in the yolk of hens' eggs (*Gallus domesticus*). *Wien. Tierärztl. Monatsschr.* 88, 62–65.
- Mueller, S., Kreuzer, M., Siegrist, M., Mannale, K., Messikommer, R.E., Gangnat, I.D.M., 2018. Carcass and meat quality of dual-purpose chickens (Lohmann Dual, Belgian Malines, Schweizerhuhn) in comparison to broiler and layer chicken types. *Poult. Sci.* 97, 3325–3336. <https://doi.org/10/gmbvcx>
- OABA, 2021. Sexage et élimination des poussins : où en est-on ? OABA. URL <https://oaba.fr/sexage-oeufs-poussins-mai21/> (accessed 7.27.21).
- Obal, F., Krueger, J.M., 2003. Biochemical regulation of non-rapid-eye-movement sleep. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* 8, d520-550. <https://doi.org/10.2741/1033>
- Peters, J., Vonderahe, A., Schmid, D., 1965. Onset of cerebral electrical activity associated with behavioral sleep and attention in the developing chick. *J. Exp. Zool.* 160, 255–261. <https://doi.org/10/dj84vz>
- Rainnie, D.G., Grunze, H.C.R., McCarley, R.W., Greene, R.W., 1994. Adenosine Inhibition of Mesopontine Cholinergic Neurons: Implications for EEG Arousal. *Science* 263, 689–692. <https://doi.org/10/dzwg27>
- Rehault-Godbert, S., Bourin, M., Gautron, J., Quentin, M., 2023. Fin de l'élimination des poussins mâles d'un jour : le choix du sexage in ovo. *INRAE Productions Animales* 36, 7453–7453. <https://doi.org/10.20870/productions-animales.2023.36.4.7453>
- Reithmayer, C., Danne, M., Musshoff, O., 2021a. Societal attitudes towards in ovo gender determination as an alternative to chick culling. *Agribusiness* 37, 306–323. <https://doi.org/10/gmbksv>
- Reithmayer, C., Danne, M., Mußhoff, O., 2021b. Look at that!—The effect pictures have on consumer preferences for in ovo gender determination as an alternative to culling male chicks. *Poult. Sci.* 100, 643–653. <https://doi.org/10/gmbs2j>
- Süß, S.C., Werner, J., Saller, A.M., Weiss, L., Reiser, J., Ondracek, J.M., Zablotzki, Y., Kollmansperger, S., Anders, M., Schusser, B., Fenzl, T., Baumgartner, C., 2023. Nociception in chicken embryos, Part III: Analysis of movements before and after application of a noxious stimulus. <https://doi.org/10.1101/2023.04.20.537674>
- Terlouw, C., Bourguet, C., 2022. Chapter 1: Quantifying animal welfare preslaughter using behavioural, physiological and carcass and meat quality measures, in: Faucitano, L. (Ed.), *Preslaughter Handling and Slaughter of Meat Animals*. Wageningen Academic Publishers, The Netherlands, pp. 13–61. https://doi.org/10.3920/978-90-8686-924-4_1

Références bibliographiques

- Tong, Q., Romanini, C.E., Exadaktylos, V., Bahr, C., Berckmans, D., Bergoug, H., Eterradossi, N., Roulston, N., Verhelst, R., McGonnell, I.M., Demmers, T., 2013. Embryonic development and the physiological factors that coordinate hatching in domestic chickens. *Poult. Sci.* 92, 620–628. <https://doi.org/10/gh37m7>
- Tonsey, K.W., 1991. Cells and cell-interactions that guide motor axons in the developing chick embryo. *BioEssays* 13, 17–23. <https://doi.org/10/fkkg9d>
- Tsutsui, K., 2001. Biosynthesis and Biological Actions of Neurosteroids in Brain Neurons. *Zoolog. Sci.* 18, 1043–1053. <https://doi.org/10.2108/zsj.18.1043>
- Ukena, K., Honda, Y., Lea, R.W., Tsutsui, K., 2001. Developmental changes in progesterone biosynthesis and metabolism in the quail brain. *Brain Res.* 898, 190–194. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(01\)02162-X](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(01)02162-X)
- Weiss, L., Saller, A., Werner, J., Süß, S., Reiser, J., Kollmansperger, S., Anders, M., Fenzl, T., Schusser, B., Baumgartner, C., 2023. Nociception in chicken embryos, Part I: Analysis of cardiovascular responses to a mechanical noxious stimulus. <https://doi.org/10.1101/2023.04.14.536899>
- Wu, K.-C., Streicher, J., Lee, M. I., Hall, B. k., Müller, G. b., 2001. Role of motility in embryonic development I: Embryo movements and amnion contractions in the chick and the influence of illumination. *J. Exp. Zool.* 291, 186–194. <https://doi.org/10/dz2dpn>
- Zumbrink, L., Brenig, B., Foerster, A., Hurlin, J., von Wenslawowicz, M., 2020. Electrical anaesthesia of male chicken embryos in the second third of the incubation period in compliance with animal welfare. *Eur. Poult. Sci.* 84. <https://doi.org/10.1399/eps.2020.315>

Abstract: The question of embryo sensitivity in the context of ovosexing

The culling of male chicks has been prohibited in France since January 1, 2023, primarily affecting brown-layer hens, which account for 85% to 90% of national production. In recent years, in-ovo sexing has emerged as a solution to comply with this regulation. Studies show that most European consumers, particularly in France (55%), Switzerland (25%), and Germany (70%), are poorly informed about the culling of male chicks, and those who are informed support alternatives such as rearing male siblings or in-ovo sex determination. This growing interest highlights a major ethical issue, directly linked to the embryonic developmental stage and the potential sensory capacities of embryos. Anatomically, chicken embryonic development occurs in several phases, with progressive maturation of the nervous system, and nociceptive perception has been observed in some individuals as early as day 15 of development. Although embryos appear to be unconscious before day 15, uncertainties remain regarding their perception of pain between days 8 and 15. Embryo-stage-appropriate euthanasia methods are recommended, and new non-invasive in-ovo sexing techniques are being developed to reconcile animal welfare with consumer acceptability.