

VERS DE MEILLEURES PERFORMANCES DE REPRODUCTION EN AVICULTURE : EVALUATION DES PHENOTYPES, PRATIQUES ET AVANCEES

Elisabeth Blesbois¹, M. Govoroun¹, Yves Jégo²

¹UMR-PRC, INRA, CNRS, IFCE, Université François Rabelais ; 37380 NOUZILLY, France.

²HUBBARD, P.O. Box 62144, 35221 CHATEAUBOURG, France.

Elisabeth.blesbois@inra.fr, marina.govoroun@inra.fr, yves.jego@hubbardbreeders.com

RÉSUMÉ

Dans un souci constant d'allier Performance, Qualité, Viabilité, Santé et Bien-être des animaux, les filières avicoles ont besoin d'outils performants pour bien évaluer les phénotypes (capacités) des reproducteurs afin de produire des poussins dans les meilleures conditions possibles de bien-être et d'efficacité. Dans certains cas où seul un sexe est valorisé en production (poule pondeuse, canard mulard), une connaissance précoce du sexe est également très utile. Les progrès physico-biotechniques et les révolutions génétiques et numériques de ces dernières années ont permis un véritable renouvellement de l'approche des capacités de reproduction. Ainsi, les progrès de l'imagerie permettent de visualiser les croissances des gonades et des puces électroniques suivent avec précision les pontes des femelles. L'approche des capacités de reproduction des pères voit émerger une rupture méthodologique avec la mise en place de mesures simplifiées de spectrométrie de masse prédisant la fertilité. Chez la poule, la mise en évidence de gènes différentiellement exprimés en fonction de la fertilité ouvre de nouvelles pistes. Enfin, de nombreuses méthodes d'évaluation précoce du sexe sont en émergence.

ABSTRACT

Avian productions need performing tools of reproductive phenotyping in order to produce progeny in the best efficient and well fair conditions. In specific cases where only one sex is used (laying hen, mule duck), an early knowledge of the sex is also needed. Improvements in physical and biological technics and the recent genetic and numeric revolutions allowed a renewal of the reproductive capacity knowledge. Among others, imaging progress allowed to view better the gonads size and microchips help follow with a high precision the lays. Innovative methods of evaluation of male fertility emerged with simplified use of mass spectrometry methodology adapted to semen. The highlighting of genes differentially expressed between females of contrasted fertility also opens new tracks. Finally, many methods of early sexing are emerging. The present review shows the main recent advances in this area.

I-CONTEXTES ET ENJEUX

Les productions avicoles ont des positions mondialement reconnues. Les viandes de volaille sont en passe de devenir les premières viandes consommées au monde et la production d'œuf de consommation reste très soutenue (sources ITAVI 2015). Sur ce marché mondialisé très dynamique, les filières d'élevage de volailles sont organisées en structure pyramidale segmentée ou chacun des trois maillons d'élevage (de haut en bas de la pyramide : sélection, multiplication-accoupage, élevage d'animaux terminaux) impacte fortement le succès du maillon suivant. Ainsi, si la reproduction concerne exclusivement les deux premiers niveaux de la pyramide, ses effets sont ressentis jusqu'à l'élevage des animaux terminaux à travers le nombre et la qualité des poussins mis en élevage.

La fonction de reproduction est capitale pour permettre la production de poussins/dindonneaux/canetons/pintadeaux... de grande qualité.

La compétition mondialisée sur les caractères de production (viande et œufs) a cependant souvent engendré des effets négatifs sur la fonction de reproduction qui présente des caractères complexes, est soumise à de fortes interactions génotype-milieu mais reste fondamentale pour la viabilité des filières. Par son rôle crucial dans la transmission génétique et épigénétique, une reproduction harmonieuse exige de plus des conditions de bien-être des animaux qui ne peuvent pas toujours être aussi bien assurées que souhaité par les éleveurs (ex : problèmes d'élevage et d'alimentation des jeunes futurs reproducteurs).

Dans un souci constant d'allier Performance, Qualité, Viabilité, Santé et Bien-être des animaux, les filières ont besoin d'outils performants pour bien évaluer les phénotypes (capacités) des reproducteurs qui visent à produire des poussins dans les meilleures conditions possibles de bien-être et d'efficacité. Dans certains cas où seul un sexe est valorisé en production (poule pondeuse, canard mulard), une connaissance précoce du sexe est également très utile.

2. DES METHODES DE TERRAIN AVEC DES MARGES DE PROGRESSION IMPORTANTES

De l'œuf à la poule ou de la poule à l'œuf ? La poule produisant des œufs coquillés de grande taille, la première méthode de terrain pour évaluer les capacités de reproduction d'une poule est bien d'observer le nombre et la fréquence des œufs pondus, reflets de l'activité ovarienne et du bon fonctionnement de l'oviducte de la femelle oiseau. Des critères de qualité de l'œuf sont généralement ajoutés. Ils intègrent la forme et la taille des œufs ainsi que des critères de qualité de la coquille qui doit être ni trop poreuse ni trop solide (Sauveur, 1988). Mais le taux de ponte et la qualité des œufs

n'intègrent pas la notion de fertilité des animaux qui est plus difficile à évaluer et impose d'observer les capacités des mâles comme des femelles à se reproduire. De fait, la mesure des taux d'éclosion après incubation artificielle d'œufs fécondés est un critère synthétique qui englobe les paramètres de fertilité des pères et des mères mais a le défaut de prendre aussi en compte des caractéristiques strictement d'incubation (température, hygrométrie, retournement, taux de chargement etc...) qui n'ont rien à voir avec les capacités de reproduction. L'évaluation de la fertilité et du taux de mortalité embryonnaire dit précoce par mirage des œufs en fin de première semaine d'incubation est un critère, également synthétique, plus proche des capacités de reproduction des parents. Mais, en filières avicoles, les fertilités des deux parents « ne pèsent pas le même poids ». D'une façon générale, beaucoup moins de mâles sont mis en élevage de reproducteurs que de femelles. Chez les coqs chair le ratio moyen mâles/femelles est de 9 à 10 %. Les mâles ont donc proportionnellement 10 fois plus de descendants que leurs partenaires et tout défaut de reproduction mâle pose donc un vrai problème.

Évaluer la fertilité d'un père n'est pas aussi simple qu'il y paraît. Le premier critère « objectif » est évidemment la production de semence. L'aspect de la semence renseigne aussi sur la présence de spermatozoïdes. Le nombre de spermatozoïdes produits peut être mesuré avec précision à l'aide d'appareillages simples (photomètres). De nombreux élevages sont équipés pour faire ces observations. Mais les critères de production de semence ne suffisent pas. La connaissance de leur aptitude à féconder est fondamentale. Des critères de qualité *in vitro* de la semence ont été développés pour l'approcher (revue dans Blesbois et al., 2008). Sur le terrain, il s'agit fréquemment d'évaluation de la mobilité des spermatozoïdes par des méthodes subjectives (notation arbitraire par observation au microscope des mouvements des spermatozoïdes) ou objectives (CASA : Computer Semen Analyser) pour lesquelles on trouve même maintenant des utilisations avec smartphones. La mesure de la viabilité des spermatozoïdes est aussi un critère développé avec des colorants ou des fluorochromes adaptés (Chalah et al., 1999) et des observations soit au microscope, soit au cymomètre en flux (Partyka, 2012). D'autres critères comme la résistance des spermatozoïdes aux chocs osmotiques (Santiago-Moreno, 2009), la fluidité membranaire (Blesbois et al., 2005), la présence d'un acrosome (Partyka 2012), et les capacités à réaliser la réaction acrosomique (événement inaugural de la fécondation ; Lemoine et al., 2008 ; 2011 ; Mocé et al 2010) ont été développés mais sont surtout utilisées dans les laboratoires. Ces critères permettent d'éliminer les très mauvais mâles, mais aucun ne permet de prédire efficacement les pouvoirs fécondants.

Et côté femelle, c'est pire puisqu'il n'est pas possible d'accéder de façon non invasive à l'ovocyte pour pouvoir le tester.

Force est donc de constater qu'il n'existe pas à l'heure actuelle de méthode de terrain satisfaisante pour prédire le mieux possible les capacités de reproduction des mâles et des femelles aviaires. Cette absence est un handicap pour l'évaluation de l'amélioration génétique comme pour l'efficacité des filières et leur capacité de suivi et d'optimisation des élevages.

Pour y remédier, de nouvelles méthodes sont mises en œuvre. Profitant des dernières évolutions méthodologiques et scientifiques, elles recouvrent principalement des approches zootechniques, d'imagerie ou des approches génomiques et protéomiques.

3. DES AVANCEES ZOOTECHNIQUES

3.1 -Sélection des mâles sur la taille des testicules évaluée par Imagerie.

Dans les troupeaux Gallus Chair parentaux, les accouplements sont réalisés de manière naturelle, au sol. Dans les élevages de sélection, les lignées mâles doivent par conséquent être reproduites de la même façon afin d'inclure le critère « fertilité en accouplement naturel » dans l'objectif de sélection global. Ceci se pratique dans des parquets pédigrées regroupant un coq et dix poules. Le critère synthétique « fertilité en accouplement naturel » est le résultat d'une composante liée au comportement et d'une composante liée à la production de semence. Dans ce contexte de reproduction naturelle, la mesure de critères liés à la production de semence, notamment le volume de semence, est très difficile et peu fiable. Pour contourner cet écueil les généticiens Hubbard utilisent les techniques d'imagerie médicale afin d'évaluer le volume de testicules à différents moments dans la vie de l'animal. Compte-tenu de la forte corrélation entre le poids testiculaire et la production de spermatozoïdes ($r = 0,9$; d'après de Reviers 1982 cité dans Sauveur 1988), cette méthode permet de classer les coqs en lien avec le nombre de spermatozoïde produits. La figure 1 présente le type d'image du testicule obtenue grâce au scanner.

Un testicule (ovale en centre gauche haut de la photo) est clairement visible et un traitement d'image approprié permet d'estimer le volume total des deux testicules.

La corrélation entre le volume total de testicules mesuré à 26 semaines et la fertilité précoce est égale à 0,51. Cette valeur rend cette méthode intéressante pour améliorer la précision de la sélection pour la fertilité mâle en accouplement naturel.

3-2-Fertilité des femelles.

Dans les lignées femelles, la fertilité est mesurée en inséminant chaque poule avec une dose sous-optimale de spermatozoïdes (80 Millions par dose) issus d'un

mélange de semence de plusieurs mâles afin de maximiser la variabilité femelle. L'héritabilité de ce caractère est de 0,25. La corrélation avec le nombre d'œufs produits à 60 semaines est de 0,48. Cette corrélation positive avec la ponte et l'héritabilité modérée sont des éléments favorables pour une sélection sur la composante femelle de la production d'ovocytes et donc, pour partie, de la fertilité.

3.3-Enregistrement de la ponte dans les lignées de poules pondeuses.

Les systèmes de production des poules pondeuses ont fortement évolué depuis quelques années en Europe et plus récemment en Amérique du Nord, passant progressivement des systèmes de production en cages aux systèmes de production au sol ou en volière. Ces nouveaux systèmes d'élevage incitent les sociétés de génétique à s'intéresser à d'autres critères de sélection dans de nouveaux environnements. En effet, dans ces conditions d'élevage, les critères de comportement prennent une place prépondérante dans le résultat économique de l'élevage.

Depuis quelques années, Novogen développe une nouvelle méthode de sélection au sol permettant d'appréhender le comportement des reproducteurs au sol. Des parquets de mâles et femelles de lignée pures sont ainsi mis en place, chaque animal étant muni d'une identification électronique. Grâce à cette identification, il est possible de connaître quotidiennement l'horaire de ponte, le temps de présence au nid et le lieu de la ponte. La figure 2 représente le décalage quotidien d'heure de ponte d'une poule (en rouge) jusqu'à aboutir à une pause dans la séquence de ponte (chaque trait en abscisse représente un jour). A l'inverse l'oviposition des 2 autres poules (en noir et en bleu) ne se décale quasiment pas dans le temps. Toutes ces informations, mesurées sur les troupeaux de sélection, permettent de sélectionner des poules adaptées aux élevages alternatifs.

Dans le futur l'assignation de parenté par génotypage des descendants permettra d'approcher l'activité sexuelle des mâles

3.4-Un exemple chez le canard

Les généticiens de Grimaud Frères Sélection utilisent la méthode d'assignation de parenté dans le programme de sélection « Pékin Chair ». Cette méthode repose sur l'utilisation de marqueurs micro-satellites choisis pour leur potentiel informatif des gènes. Grâce à cette technologie, la reproduction des troupeaux de sélection peut être réalisée en groupes et en accouplement naturel. L'identification des parents de chaque descendant se fait à posteriori par génotypage des marqueurs micro-satellites choisis. Par rapport à un programme d'accouplements pédigrées traditionnel (un mâle accouplé à un nombre fixé de femelles), grâce à la multiplication des accouplements possibles, on peut attendre de cette méthode une augmentation de la variabilité génétique.

La reproduction en groupe, dans des conditions proches de celles rencontrées sur le terrain, permet également l'expression des comportements sexuels et sociaux. Au sein d'un tel programme, les performances de reproduction (nombre d'œufs, fertilité) sont sélectionnées au plus près des conditions du terrain.

4. DES APPORTS INNOVANTS ISSUS DES METHODES « OMIQUES »

La révolution génétique de ces dernières années a permis de renouveler profondément les connaissances des gènes, de leur traduction en protéines et de leurs fonctions biologiques. S'appuyant sur ces nouvelles connaissances, une masse considérable d'informations biologiques a pu être produite. Dans le même temps, une autre révolution, numérique celle-ci, a produit des technologies permettant le traitement efficace d'un grand nombre de données.

A l'arrivée, des méthodologies dites « omiques » puissantes (génomique, protéomique, métabolomique...) ont émergé. Ces méthodologies combinent à la fois une grande masse de connaissances biologiques et leur traitement et, dans nombre de cas, permettent déjà ou permettront dans un futur proche d'accéder à de bien meilleures évaluations des fonctions physiologiques. Un exemple abouti est la méthode protéomique ICM-MS qui, couplée à un système de modélisation adapté, permet d'évaluer la fertilité des adultes mâles reproducteurs. Et cette méthode a été mise au point en premier chez les oiseaux !

4.1-Un test moléculaire protéomique pour le diagnostic de la fertilité des mâles

La fertilité des mâles est un caractère complexe qui se traduit in fine par la transmission, lors de la fécondation, du patrimoine génétique paternel et de caractères épigénétiques déterminés. Elle aura donc un impact sur toute la vie des descendants. Ce pouvoir fécondant renvoie à différentes fonctions cellulaires des spermatozoïdes du père et à leurs capacités d'interagir efficacement avec l'environnement du tractus génital de la mère. Ces fonctions peuvent être évaluées *in vitro* mais avec des résultats qui restent partiels par rapport à la fertilité totale des mâles.

A l'INRA, nous avons eu l'opportunité d'étudier les spectres protéomiques (ensemble des protéines et peptides) des semences issues de mâles reproducteurs provenant de lignées expérimentales *gallus gallus* (coq-poule) INRA de type « label ». Dans ces lignées, les adultes reproducteurs mâles présentaient des fertilités, caractéristiques de chaque père, s'étendant sur une large gamme (de 5 % à 90 % de fertilité). Nous avons appliqué sur trois échantillons de semence de 16 de ces pères, deux méthodes différentes de protéomique.

La première, dite "bottom up" consiste à découper les protéines en plus petites unités, les peptides, puis à les

passer en spectrométrie de masse (Orbitrap), à confronter les résultats aux bases de données ad hoc et finalement à identifier et à quantifier les protéines d'origine. Cette méthode est très complète et nous a fourni plus de 70 candidats marqueurs de la fertilité (Labas et al, 2015) que nous étudions maintenant au laboratoire. Cette méthode Bottom up est cependant trop compliquée pour une utilisation directe terrain.

La deuxième méthode, dite ICM-MS pour « intact cell Maldi-Tof Mass Spectrometry » consiste à centrer l'étude sur une gamme étroite de protéines, celles dont le poids moléculaire va de 1000 à 20000 daltons, et à analyser ces protéines sur les spermatozoïdes entiers après les avoir déposés sur une matrice spécifique, les avoir ionisés avec un laser UV également spécifique (MALDI), puis avoir séparé les ions en fonction de la masse des protéines (TOF) comme indiqué sur la [figure 3](#).

Il en résulte des spectres de protéines représentés sur la [figure 4](#) qui sont reproductibles pour chaque père et très différents en fonction de leur capacité de fertilité. Ces spectres sont pertinents pour servir de base à l'évaluation de cette fonction complexe. Sur cette figure, 2 pères ayant des productions équivalentes de semence mais l'un étant très fertile (en bas) et l'autre moins (en haut) montrent des profils très différents. Les rectangles et les astérisques indiquent les zones des spectres utilisées par la suite pour valider la méthode.

Nous avons par la suite testé à plus grande échelle et sur d'autres lignées (lignées grand parentales chair et ponte) la validité de notre hypothèse qui visait à utiliser l'ICM-MS pour l'évaluation de la fertilité des pères. Nous avons également complété l'analyse par la mise au point d'une modélisation utilisant un algorithme qui évolue en fonction des données de référence (machine-learning algorithm). Un modèle prédictif de la fertilité a ainsi été construit et validé sur des mâles grands parentaux, chair et ponte dans un premier temps (Soler Vasco et al., 2016a ; 2016b), puis sur des croisements. Cet outil combiné permet de beaucoup mieux évaluer les capacités fécondantes des pères que n'importe quelle autre méthode. Il permet en outre de mieux séparer les « moyens » des « bons ».

La méthode ICM-MS est depuis plusieurs années utilisée dans les hôpitaux pour étudier les spectres bactériens, et est aussi les macrophages et les cellules neurogliales. Nos travaux sont cependant les premiers à montrer une application à l'évaluation de la fertilité grâce, entre autres, à l'évaluation très précise de mesure de fertilité qui peut être réalisée chez les oiseaux (en particulier avec l'incubation artificielle en grand nombre des œufs). En effet la mesure de fertilité reste l'outil indispensable pour la validation du test. Face à l'élargissement des applications de la méthodologie ICM-MS qui est rapide et fiable, des appareils légers apparaissent progressivement sur le marché, ouvrant la possibilité d'en faire, à moyen terme, une méthode de terrain. Le système est par

ailleurs maintenant en développement pour l'évaluation de la fertilité des pères chez les mammifères.

4.2-Des ouvertures sur les connaissances de la fertilité femelle via la génomique

Les poules de type chair présentent des performances de reproduction réduites avec des séries de ponte irrégulières, le syndrome des œufs déficients, l'absence de hiérarchie folliculaire, une courte durée de période de reproduction, une baisse de nombre d'œufs pondus et de fertilité sans réelle identification des causes (Brillard 2004). Le taux trop élevé de mortalité embryonnaire reste aussi un défi important. La qualité de l'ovocyte est un facteur majeur de la qualité de l'embryon comme cela a été montré chez d'autres espèces (Naz&Rajesh 2005). Les variations de l'expression du génome de l'ovocyte mature chez les animaux présentant des différences de fertilité peuvent expliquer ces différences et peuvent servir au développement de marqueurs de la qualité ovocytaire. Ainsi chez la truite-arc-en-ciel les niveaux d'expression de plusieurs transcrits sont diminués dans les œufs de mauvaise qualité (Aegerter, *et al.* 2005). L'identification de marqueurs moléculaires robustes de la fertilité, avec pour objectif de les inclure dans les schémas de sélection, pourrait être une solution pour restaurer la fertilité des reproductrices des lignées chair. Nous avons réalisé une étude pilote par approche transcriptomique à haut débit (étude de très nombreux ARN messagers codés par les gènes) pour mettre en évidence des différences d'expression du génome au cours de la maturation ovocytaire et du développement embryonnaire précoce chez des poules de lignées qui divergeaient sur la vitesse de croissance ou sur la durée de période fertile et présentaient une bonne ou une mauvaise fertilité (Elis *et al.*, 2007 ; 2008). Cette étude a montré que les variations géniques observées entre les poules présentant une bonne et une mauvaise fertilité étaient de nature différente en fonction du « fond » génétique. Elle a également permis d'identifier cinq gènes dont l'expression dans l'ovocyte est corrélée à la fertilité : (*VWC2*, *CR407412*, *TAPA*, *FGL2* et *TRAP6*). Deux de ces gènes, *TRAP6*, *TAPA*, sont directement liés à l'immunité ce qui suggère son implication dans les problèmes de fertilité. Deux autres gènes *VWC2* et *FGL2* sont respectivement impliqués dans la signalisation cellulaire ou dans l'embryogénèse et l'homéostasie. *TRAP6* a également été identifié comme gène ovocytaire dans cette étude ce qui renforce encore plus l'implication potentielle de ce gène dans les problèmes de fertilité. Ces découvertes ont permis pour la première fois d'apporter une vision cohérente de l'altération de l'expression génique en lien avec la fertilité chez la poule dans différents contextes génétiques. Elle a aussi permis de mettre en évidence des marqueurs potentiels de fertilité femelle.

5. DE NOUVEAUX OUTILS D'EVALUATION PRECOCE DU SEXE

Les productions avicoles hautement spécialisées nécessitent parfois l'élimination précoce d'un des deux sexes. Ainsi pour la production d'œufs, uniquement les poussins femelles sont mis en élevage tandis que les mâles, sans intérêt commercial, sont détruits à la naissance. Au niveau mondial plus de 6 Milliards de poules pondeuses sont mise en place chaque année, un nombre similaire de poussins d'un jour étant détruit annuellement, après le sexage le plus souvent par examen du cloaque. Cette situation est mal acceptée par la société et conduit déjà les gouvernements de certains pays à prendre des décisions sur l'arrêt de ces pratiques. En Allemagne le projet d'interdiction d'extermination des poussins mâles dans les couvoirs a été annoncé par le ministre d'agriculture pour être effectif en 2017. Sur le plan commercial, les œufs du sexe non valorisé occupent la moitié des incubateurs. A cela s'ajoute le coût du sexage des poussins. Dans ce contexte, l'intérêt de développer des techniques de sexage *in ovo* devient urgent. Plusieurs tentatives ont été entreprises dans ce sens à partir des années 70. Celles-ci doivent satisfaire à 3 conditions pour être applicables dans l'industrie : une précision de détermination du sexe proche de 98,5 %, ne pas altérer l'éclosabilité et la viabilité des poussins, être rapide (20000-30000 œufs/heure) et rentable (Phelps *et al.*, 2003). Les méthodes proposées sont soit de nature biologique (moléculaire, biochimique ou immunologique) soit de nature physique.

La technique moléculaire basée sur la détermination par PCR de la présence du chromosome W spécifique des femelles a été utilisée pour déterminer le sexe avant la mise en incubation (Petitte *et al.*, 1995). Mais cette technique nécessite le prélèvement des cellules du blastoderme (l'embryon précoce indifférencié) dans l'œuf fraîchement pondu et conduit à une baisse trop forte de la viabilité des embryons.

La technique basée sur le dosage dans le liquide allantoïdien d'estrogènes (hormones surtout femelles) est développée par la société EMBREX (Gore A. K and Bryan T. E. 2003 ; Phelps P. V. 2003.). Elle consiste à localiser le liquide allantoïdien chez l'embryon de 15-17 jours, à le prélever (aiguille introduite dans le sac allantoïdien) puis à détecter les estrogènes par transactivation de leur récepteur recombinant dans la levure (Tran *et al.*, 2010). Cette technique est très précise, n'altère pas la viabilité et l'éclosabilité, mais l'analyse est réalisée dans la deuxième partie de la période d'incubation, quand l'embryon est déjà capable de sentir la douleur. Le prototype commercial nécessite encore d'être amélioré pour être rentable. Le projet hollandais In Ovo en cours de développement utilise également le liquide allantoïdien pour sexer les œufs. Il se base sur les différences de métabolisme entre les embryons mâles et femelles et propose de doser plusieurs métabolites comme le sucre glucose, la vitamine

choline et l'acide aminé valine, dont les niveaux diffèrent dans le liquide allantoïdien des embryons mâles et femelles (Bruins W.S. and Stutterheim W.M., 2014).

Des méthodes physiques sont aussi proposées. Elles ne nécessitent ni prélèvement ni développement de tests moléculaires, biochimiques ou immunologiques. On s'arrêtera sur deux d'entre elles qui semblent les plus abouties à l'heure actuelle. La première est un procédé allemand, basé sur la différence de quantité d'ADN des cellules embryonnaires mâles et femelles dû à l'hétérogamétie des femelles (ZW) qui contiennent moins d'ADN que le mâle (ZZ). Effectivement le chromosome W, équivalent fonctionnel du Y des mammifères est considérablement plus petit que le Z, entraînant une différence de 2% de quantité d'ADN entre les mâles et femelles. Cette différence peut être détectée par analyse spectrale. Le procédé allemand propose l'analyse par spectroscopie Raman proche infrarouge des cellules sanguine embryonnaires circulant dans les vaisseaux extra embryonnaires (vaisseaux vitellins) dès 3,5 jours d'incubation. La méthode est quand même invasive puisque la coquille est ouverte sur 15 mm au petit bout de l'œuf à l'aide d'un laser. Le plus gros vaisseau vitellin est ensuite recherché puis analysé par spectroscopie Raman avant analyse mathématique et statistique des images spectrales. Finalement la coquille est refermée avec un matériel biocompatible. Cette technique présente une prédiction du sexe de 90%, est plus précise pour les femelles que pour les mâles, et l'éclosabilité est de 81%. Contrairement aux autres méthodes, elle est sans contact avec l'embryon et donc plus sécurisante de point de vue sanitaire. Le prototype commercial est en cours de développement. La deuxième méthode physique est canadienne et récemment brevetée. Elle est basée sur l'analyse ultraspectrale des œufs non incubés avec une précision allant jusqu'à 99% et

conviendrait au sexage des œufs blancs comme bruns (Ngadi et al., 2016). Elle est non invasive et très précoce ce qui est intéressant d'un point de vue sanitaire et commercial. Le développement du prototype commercial a été annoncé. Les techniques allemandes et canadiennes permettent en même temps de déterminer si l'œuf est embryonné et donc d'enlever les œufs clairs à J4 d'incubation (méthode allemande) ou avant même la mise en incubation (méthode canadienne).

Une dernière technique non invasive basée sur l'analyse ultraspectrale de la couleur du plumage a été récemment proposée, permettant le sexage des œufs de 14 jours d'incubation avec 97 % de prédiction. Cependant elle n'est valable que pour les souches avec des différences de couleur liées au sexe (Göhler et al., 2016).

Toutes ces avancées donnent l'espoir de résoudre dans un avenir proche le problème de destruction des poussins du sexe non désiré dans les élevages avicoles.

6. CONCLUSION

Prédire les capacités de reproduction est un défi très ancien. Celui-ci a cependant dû attendre l'émergence de progrès technologiques récents pour pouvoir approcher cet objectif. Aujourd'hui, des méthodes de terrain permettent de mieux suivre le nombre de gamètes mâles et femelles produits par les reproducteurs et des méthodes émergentes issues des révolutions génétiques et numériques permettent de véritables ruptures technologiques visant à mesurer avec précision la fertilité des animaux.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aegerter S., Jalabert B. & Bobe J. 2005. Large scale real-time PCR analysis of mRNA abundance in rainbow trout eggs in relationship with egg quality and post-ovulatory ageing. *Mol Reprod Dev*, 72, 377-385.
- Brillard JP. 2004. Natural mating in broiler breeders: Present and future concerns. *Worlds Poult Sci J* 60:439-445.
- Bruins W.S. and Stutterheim W.M., 1. 2014 Gender, viability and/or developmental stage determination of avian embryos in ovo. Google Patents. <https://www.google.com/patents/WO2014021715A2?cl=en22>
- Galli R, Preusse G, Uckermann O, Bartels T, Krautwald-Junghanns ME, Koch E, Steiner G. 2016. In Ovo Sexing of Domestic Chicken Eggs by Raman Spectroscopy. *Anal Chem*, 88(17), 8657-63.
- Galli R., PREUSSE G., Koch E., Steiner G, Krautwald-Junghanns M. E and T. Bartels. 2016. Method and device for the raman spectroscopic, in ovo sex determination of fertilised and hatched birds' eggs. Google Patents, <https://www.google.com/patents/WO2016000678A1?cl=en>
- Göhler D, Fischer B, Meissner S. 2016 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*, doi: 10.3382/ps/pew282
- Gore A. K and Bryan T. E. 2003. Method for localizing allantoic fluid of avian eggs.

Google Patents. <http://www.google.ch/patents/US6510811>

Naz RK & Rajesh C 2005 Gene knockouts that cause female infertility: search for novel contraceptive targets. *Front Biosci*, 10, 2447-2459.

Ngadi, M., Liu, L., Zheng, C. 2016. Systems, devices, and methods for detecting fertility and gender of unhatched eggs. Google Patents, <https://www.google.com/patents/US20160239953>.

Blesbois, E.; Grasseau, I.; Seigneurin, F.; Mignon-Grasteau, S. ; Saint Jalme, M. ; Mialon-Richard, M.M. 2008. Predictors of semen cryopreservation in chickens. *Theriogenology* 69, 252-261.

Blesbois, E.; Grasseau, I. Seigneurin, F. 2005. Membrane fluidity and the ability to survive cryopreservation in domestic bird spermatozoa. *Reproduction* 129, 371-378.

Chalah, T.; Seigneurin, F.; Blesbois, E.; Brillard, J.P. 1999. In vitro comparison of fowl sperm viability in ejaculates frozen by three different techniques and relationship with subsequent fertility in vivo. *Cryobiology*, 39, 185-191.

Elis, S.; Batellier, F.; Couty, I.; Balzergues, S.; Martin-Magniette, M.L.; Blesbois, E.; Govoroun, M. 2008. Identification of genes potentially involved in fertility in the hen. *BMC Genomics* 9: 110, 1-20.

Elis, S.; Blesbois, E.; Couty, I.; Balzergue, S.; Martin-Magniette, M.L.; Batellier, F.; Govoroun, S. 2009. Identification of genes potentially involved in fertility in the hen., *Molecular Reproduction and Development* 76, 1043-1055.

Labas V., Grasseau I., Cahier K., Gargaros A., Harichaux G., Teixeira-Gomes AP., Alves S., Bourin M., Gerard N., Blesbois E. 2015. Qualitative and quantitative proteomic approaches to phenotyping chicken semen. *Journal of Proteomics* 112, 313-335.

Lemoine, M.; Grasseau, I.; Brillard, J.P.; Blesbois, E. 2008. A reappraisal of factors involved in the in vitro induction of acrosome reaction in chickens. *Reproduction* 136, 391-399.

Mocé E, Grasseau I, Blesbois E. 2010. Cryoprotectant and Freezing-Process alter the Ability of Chicken Sperm to Acrosome React. *Animal Reproduction Science* 122, 35

Figure 1. Image du testicule de coq obtenue grâce au scanner.
Un testicule (ovale en centre gauche haut de la photo) est clairement visible

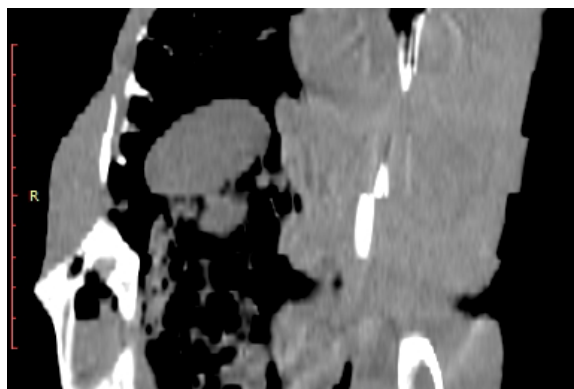


Figure 2. Enregistrement individuel de ponts grâce à une puce électronique.
Chaque couleur représente l'heure quotidienne de ponte d'une femelle particulière. Chaque trait en abscisse représente un jour. Les heures sont en ordonnée

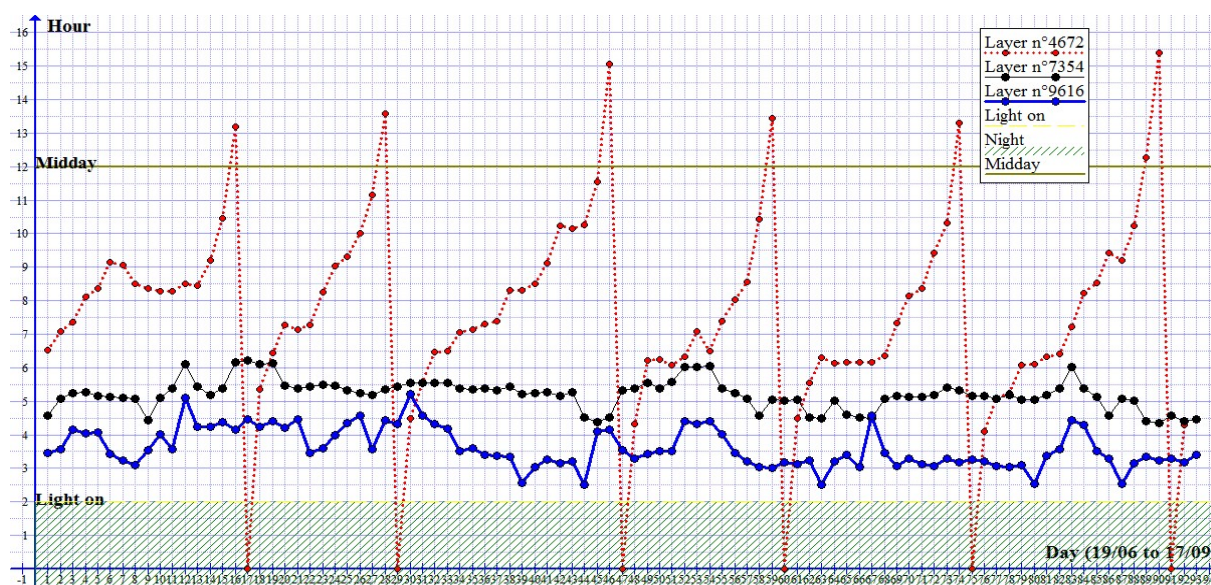


Figure 3. schéma de la méthode de spectrométrie de masse ICM-MS sur cellules entières

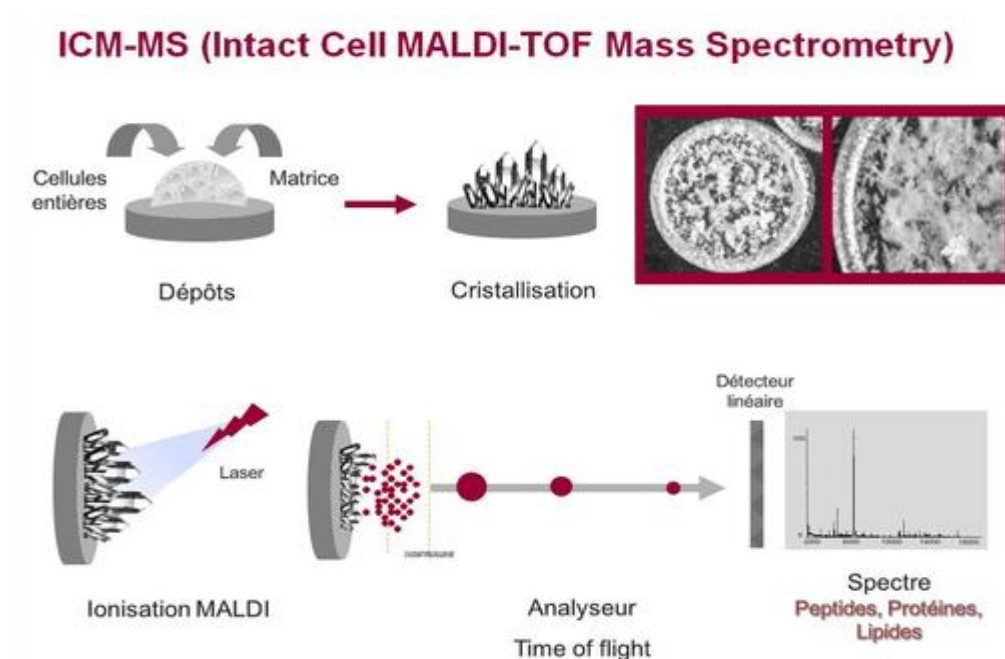


Figure 4. Deux profils de semence de coq obtenus par ICM-MS. La moitié haute de la figure représente la semence d'un coq subfertiles et la partie basse un coq très fertile

