

L'IMAGERIE HYPER-SPECTRALE COMME OUTIL D'OVO-SEXAGE POUR LES EMBRYONS DES SOUCHES D'ŒUFS BRUNS

Une enquête terrain à grande échelle

Anke Förster, Laura Zumbrink, Jörg Hurlin

Agri Advanced Technologies GmbH - Hogenbögen 1 – 49429 VISBEK, Germany
anke.foerster@agri-at.com

RÉSUMÉ

Depuis plus de 15 ans, plusieurs approches permettant de déterminer le sexe d'un embryon ont fait l'objet de recherches : il s'agit notamment de méthodes invasives, basées sur le prélèvement de fluide extra-embryonnaire contenant de l'ADN (sexage moléculaire par PCR) ou une hormone sexuelle spécifique, ou de méthodes optiques sans contact. La méthode d'imagerie hyper-spectrale est basée sur le dimorphisme sexuel de la couleur du plumage des souches à œufs bruns. La différence entre la femelle et le mâle peut être détectée à travers la coquille, avec une grande précision et de manière non invasive au 13^{ème} jour d'incubation. Une méthode d'ovo-sexage efficace, doit être précise et sûre, mais aussi rentable et suffisamment rapide pour répondre aux exigences des couvoirs modernes. Un système entièrement automatisé utilisant la technologie d'imagerie hyper-spectrale a donc été mis au point, en préservant un taux d'éclosion élevé. L'objet de cette étude est de faire une enquête terrain à grande échelle sur la faisabilité et la fiabilité de ce système automatisé dans les couvoirs commerciaux, afin d'optimiser le fonctionnement et de déterminer les éléments qui influent sur son efficacité. Les paramètres biologiques et techniques, tels que la souche, l'âge du troupeau ou nombre d'œufs clairs ont été examinés comme étant les principaux facteurs influençant le résultat de l'ovo-sexage. Dans des conditions optimales, une précision de 98,8 % peut être atteinte (taux d'erreur moyen de sexage de 4,1 %). Le taux d'éclosion moyen était de 39,1 %, contre 41,9 % attendus (c'est-à-dire en absence d'ovosexage). La technologie d'imagerie hyper-spectrale est une méthode efficace pour éviter l'élimination des poussins mâles dans le respect du bien-être animal et de l'environnement. Après plus de 12 mois d'expérience avec le système à haut rendement entièrement automatisé CHEGGY, des conclusions fiables et des préconisations peuvent être fournies aux couvoirs commerciaux pour leur permettre d'obtenir les meilleurs résultats.

ABSTRACT

Hyperspectral Imaging as a tool for in ovo sex determination of chicken layer embryos – a largescale field study

For more than 15 years, several approaches to determine an embryo's sex are objects of research: these include invasive methods based on the sampling of extra-embryonic fluid that contains DNA (for molecular sexing by PCR) or sex-specific hormones, and contactless optical methods like Hyperspectral Imaging or Spectroscopy. The method of Hyperspectral Imaging is based on the sexual dimorphism in feather color in brown egg strains. The difference between brown female and yellow-white male chicks can be detected non-invasively through the intact eggshell with high accuracy on day 13 of incubation. A practicable method for in ovo sex determination must be accurate and secure, but also robust, cost-effective, and fast enough to meet the requirements of modern hatcheries. So, a fully automated system using Hyperspectral Imaging technology was developed with a high through-put of hatching eggs. The object of this study is a largescale field survey of the applicability and accuracy of this automated system in commercial hatcheries to optimize operation and find factors that negatively affect its success. Biological and technical parameters like breed, age of flock, number of clear eggs were found to have an influence on the success of in ovo sex determination. With optimum conditions, a sexing accuracy of 98.8% can be achieved (average sexing error rate 4.1 %). Average female hatchability of eggs was 39.1%, compared to 41.9% expected (when eggs are not subjected to in ovo sexing).

Hyperspectral Imaging technology is an important method to avoid the killing of day-old males in an animal welfare and environmentally friendly manner. After more than 12 months of experience with the fully automated, high-throughput system CHEGGY, reliable conclusions and recommendations can be made for commercial hatcheries to reach the best results.

INTRODUCTION

En juillet 2021, le ministère français de l'Agriculture a annoncé que la France interdirait l'élimination des poussins mâles de la filière œufs à partir de 2022, ce qui a accéléré la recherche d'alternatives. Comparé à l'élevage des mâles (frères de pondeuses, actuellement éliminés) ou à la production de souches mixtes (élevage des femelles pour la ponte et des mâles pour la viande), l'ovo-sexage est l'alternative la mieux adaptée. Depuis près de 20 ans, plusieurs approches permettant de déterminer le sexe d'un embryon ont fait l'objet de recherches. L'éventail va de l'édition de gènes (animaux OGM) et de l'identification de paramètres permettant d'influencer le sex-ratio en faveur des femelles, à diverses méthodes d'analyse du liquide allantoïque (analyse des hormones ou de l'ADN) et à des méthodes optiques (spectroscopie). Pour être appliquée commercialement, une technique d'ovo-sexage doit être précise et sûre, mais aussi robuste, rentable et suffisamment rapide pour répondre aux exigences des couvoirs modernes (Kaleta et Redmann, 2008). Une méthode actuellement prête à être commercialisée pour l'ovo-sexage est l'imagerie hyper-spectrale décrite par Göhler et al. (2017). Basée sur le dimorphisme sexuel de la couleur du plumage des souches d'œufs bruns, cette technique détecte les différences entre les poussins femelles bruns et les poussins mâles blancs-jaunes de manière non invasive à travers la coquille d'œuf intacte, avec une grande précision au 13^{ème} jour de l'incubation. Un système entièrement automatisé à haut débit d'œufs à couvrir ("CHEGGY") a été mis au point dans plusieurs couvoirs commerciaux. Les résultats du sexage et de l'éclosion sont collectés régulièrement dans une base de données. Ils ont été exploités dans cette étude pour une enquête de terrain à grande échelle sur l'applicabilité et la précision du système dans les couvoirs commerciaux, afin d'optimiser le fonctionnement et de trouver les facteurs impactant son taux de succès.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Imagerie hyper-spectrale

L'imagerie hyper-spectrale a été utilisée pour détecter le sexe de l'embryon au 13^{ème} jour d'incubation. Cette technique permet de capturer des images tridimensionnelles en mesurant simultanément l'intensité du rayonnement à chaque pixel d'un échantillon : deux dimensions représentent l'information spatiale et une dimension représente l'information spectrale de l'ensemble du spectre (Bellon-Maurel et Gorretta, 2014). Sur la base du facteur Or/Argent lié au sexe utilisé en génétique des souches d'œufs bruns, les mâles ont un plumage argenté/blanc et les femelles un plumage or/brun (Malone et Smyth, 1979 ; Smyth, 1990 ; Damme et

Hildebrand, 2002). Une fois que les premières plumes acquièrent leur couleur, il est possible d'effectuer un sexage par en mesurant la couleur de l'embryon grâce à l'imagerie hyper-spectrale (Göhler et al., 2017). À l'intérieur d'une chambre de mesure fermée, un nombre défini d'œufs à couvrir de 13^{ème} jour est éclairé par le bas avec des lampes halogènes, tandis qu'une caméra hyper-spectrale capture l'image des œufs pendant quelques secondes. À l'aide d'un algorithme spécifique basé sur un modèle paramétrique, l'ordinateur détecte automatiquement les œufs clairs (non fécondés et morts précocement) ainsi que le sexe des embryons contenus dans les œufs. Les œufs contenant des embryons femelles sont replacés dans les plateaux d'incubation et sont incubés jusqu'à l'éclosion, tandis que les œufs clairs et les œufs contenant des embryons mâles sont triés pour être utilisés dans la production d'aliments pour animaux.

1.2. Base de données

Dans cette étude, les données de 49 éclosions d'un couvoir commercial en France, comprenant cinq souches brunes différentes et 22 troupeaux reproducteurs entre 24 et 67 semaines d'âge ont été évaluées. Au total, 1,61 millions d'œufs ont été sexés, l'âge des œufs variant entre 3 et 20 jours de stockage avant l'incubation et l'âge des embryons au moment du sexage entre 325 et 334 heures d'incubation. Le nombre d'œufs pondus, de femelles écloses et de mâles par éclosion a été utilisé pour calculer les variables d'intérêt :

% Erreurs de sexage = Nombre de mâles éclos / Nombre total de poussins éclos, comme mesure de précision de la technique.

% d'éclosion = Nombre total de poussins éclos / nombre d'œufs incubés, comme mesure d'éclosabilité.

% d'éclosion des œufs transférés = nombre de poussins éclos / nombre d'œufs incubés après sexage, comme mesure pour éclosabilité après sexage.

% Femelles écloses = nombre de femelles éclos / nombre d'œufs incubés, comme paramètre de production à intérêt économique.

Œufs à couvrir (OAC) par femelle = Nombre d'œufs à couvrir nécessaires pour obtenir un poussin femelle (calculé comme 1 / % Éclosion) comme paramètre de production à intérêt économique.

Comme facteurs d'influence possibles sur la précision du sexage, les variables indépendantes "souche" et "âge des reproducteurs", "âge moyen des œufs au moment de la mise en incubation" (jours de stockage), "âge de l'embryon au moment du sexage" (heures d'incubation), et "% d'œufs rejetés" (= œufs clairs tels que détectés par CHEGGY) ont été évalués à l'aide de statistiques descriptives. Les paramètres de localisation, les mesures de variation et les corrélations entre les variables ont été calculés avec les logiciels statistiques Stata et Excel. Les

graphiques d'analyse de régression sont utilisés pour visualiser les facteurs d'influence sur la précision de la technique de sexage hyper-spectrale. Le niveau de signification a été fixé à $p < 0,05$.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

Le tableau 1 montre le nombre d'éclosions et d'œufs par souche ainsi que la moyenne de la précision du sexage (% d'erreur de sexage) et de l'éclosion (% d'éclosion totale de tous les œufs pondus) par souche. Étant donné que le % d'éclosion des femelles est influencé par le % d'erreur de sexage (plus l'erreur de sexage est élevée, plus le % d'éclosion des femelles diminue), le % d'éclosion totale des œufs pondus est plus approprié pour juger de l'éclosion et des pertes techniques éventuelles. L'éclosion des œufs après manipulation est élevée (91,4 % - 95,4 %), ce qui indique une très faible perte par la technique de sexage et de manipulation des œufs comparé aux valeurs témoins des mêmes troupeaux non-sexés. L'erreur moyenne de sexage se situe entre 3,5 % et 4,4 %, ce qui montre une bonne applicabilité dans différentes souches brunes.

Les facteurs biologiques et techniques tels que la souche ou l'âge du troupeau ont été supposés être les principaux contributeurs au succès de la détermination du sexe in ovo. Comme les données proviennent d'un couvoir commercial, le nombre d'entrées par souche est déséquilibré et la grande majorité des données ne concernent que deux souches.

Les différences d'erreurs de sexage entre les souches ne sont pas significatives, ce qui indique que la technique d'imagerie hyper-spectrale est applicable à différentes souches d'œufs bruns. Tableau 2 montre les paramètres spécifiques de la population pour les deux souches ayant une taille d'échantillon comparable.

La corrélation entre l'âge du troupeau ainsi que l'âge de l'embryon et le % d'erreur de sexage est très faible ($r = 0,05$ et $r = 0,08$ respectivement), tandis que la corrélation entre l'âge de l'œuf (durée de stockage avant la mise en place) et le % d'erreur de sexage est plus élevée ($r = 0,24$) (voir tableau 3 et fig. 1)). Cette corrélation positive indique qu'avec un stockage plus long avant la mise en incubation, il faut s'attendre à davantage d'erreurs de sexage.

La corrélation positive entre le % d'œufs rejetés et le % d'erreur de sexage ($r = 0,27$) n'est pas un facteur biologique, mais technique : un nombre plus élevé d'œufs clairs ou d'œufs à mortalité précoce influence l'intensité lumineuse dans la chambre de mesure et provoque plus d'erreurs dues à la saturation du signal (fig. 2).

Les troupeaux reproducteurs d'un âge compris entre 25 et (au moins) 67 semaines peuvent être sexés par imagerie hyper-spectrale avec des niveaux faibles et constants d'erreurs de sexage. Un âge embryonnaire compris entre 324 et 335 heures est optimal pour le sexage. L'impact d'une déviation nécessiterait des

études supplémentaires incluant une gamme plus large d'heures d'incubation ainsi que des troupeaux de reproducteurs plus âgés.

La comparaison des résultats de cette étude avec les données d'autres techniques d'ovo-sexage n'est pas possible, puisque jusqu'à présent aucune étude de ce type n'est publiée ou disponible. La base de données sur laquelle repose cette étude est actualisée au jour le jour, ce qui permet d'étendre les analyses à une plus grande base de données. Il sera ainsi possible, le cas échéant, d'acquérir des connaissances sur d'autres facteurs d'influence et des effectifs plus grands des autres souches brunes ou d'identifier, par exemple, l'influence d'un âge très élevé du troupeau sur la précision de l'ovo-sexage.

CONCLUSION

En résumé, l'imagerie hyper-spectrale est une méthodologie importante pour éviter la mise à mort des poussins mâles d'un jour dans le respect du bien-être animal et de l'environnement. Après plus de 12 mois d'expérience avec le système entièrement automatisé à haut débit, des conclusions et des recommandations peuvent être faites pour les couvoirs commerciaux, afin d'obtenir les meilleurs résultats. Dans des conditions optimales (âge des reproducteurs environ entre 30 et 60 semaines, temps de stockage moins de 10 jours, taux d'œufs rejetés moins de 10 %), une précision de sexage de 98,8% peut être atteinte (taux d'erreur moyen de sexage de 4,1%). L'éclosion moyenne des femelles sur les œufs pondus était de 38,0 %, contre 41,9 % attendus. En raison de ce faible effet négatif de la technique d'ovo-sexage sur le rendement des femelles, seule une faible demande supplémentaire d'œufs à couver est nécessaire (< 10% d'œufs à couver supplémentaires). La procédure est non invasive (à priori sans danger pour l'embryon) et permet de conserver la coquille d'œuf intacte. Sur la base des différences dans les spectres lumineux mesurés, un algorithme classe le sexe. Cet algorithme peut et doit être vérifié et adapté de temps en temps, et différents algorithmes peuvent être utilisés, par exemple pour différentes souches. L'algorithme doit toutefois être adapté à la majorité des œufs mesurés.

Outre la détermination du sexe, les œufs non fécondés sont également identifiés et triés en même temps. La technologie de mesure hyper-spectrale ne nécessite pas de consommables coûteux, ce qui rend cette technique nettement moins chère que les autres méthodes et, surtout, plus respectueuse de l'environnement. Combiné à un débit élevé de 20.000 œufs/heure, contre 3.000 à 4.000 œufs/heure pour les autres techniques, CHEGGY est une solution hautement durable et efficace sur le marché pour éviter l'abattage des poussins.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Bellon-Maurel, V., Gorretta, N., 2014. In: Infrared and Raman Spectroscopic Imaging. Salzer, R., Siesler, H.W. (éditeur), John Wiley & Sons, Weinheim, 295-338.
- Damme, K., Hildebrand, R.A., 2002. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart.
- Göhler, D., Fischer B., Meissner, S., 2017. Poult.Sci., (96), 1-4.
- Kaleta, E.F., Redmann, T., 2008. World. Poult. Sci. J. 64, 391-399
- Malone, G.W., Smyth, J.R., 1979. Poult.Sci., **58**(3), 489-497.
- Smyth, J.R., 1990: Genetics of plumage, skin and eye pigmentation. In: Poultry breeding and genetics. Crawford, R.D. (éditeur), 109-167, Elsevier, Amsterdam.

Tableau 1. Nombre d'éclosions par souche, éclosabilité moyenne et erreur de sexage

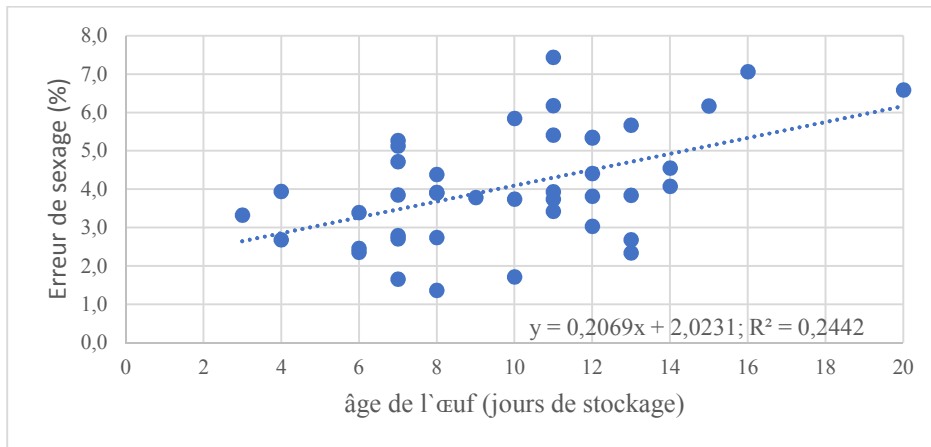
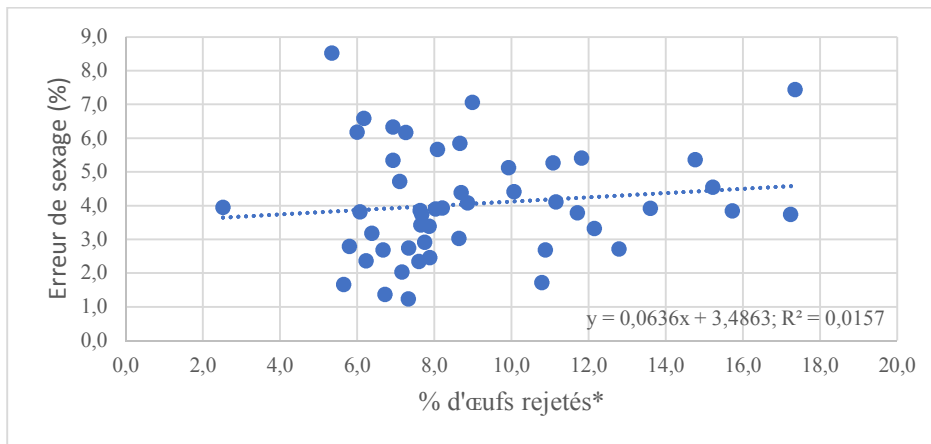
Souche	Nombre D'éclosions	Nombre D'oeufs incubés	% Ecllosion	% Erreurs de sexage
Lohmann Brown	22	657939	39,1%	4,4%
Hy-Line Brown	18	726472	40,6%	3,8%
Brown Nick	4	158400	43,2%	4,3%
ISA Brown	4	62541	35,1%	3,5%
Novogen Brown	1	3300	38,6%	4,1%
Total	49	1608652	39,6%	4,1%

Tableau 2. Paramètres spécifiques de la population pour deux souches

	% Erreurs de sexage		% Ecllosion des oeufs incubés		OAC/fem	
	Hy-Line	LB	Hy-Line	LB	Hy-Line	LB
N	18	22	18	22	18	22
Average	3,8%	4,4%	40,6%	39,1%	2,57	2,73
Std dev	2,0%	1,5%	2,9%	4,8%	0,19	0,45
Min	1,2%	1,4%	35,7%	24,8%	2,31	2,33
Max	8,5%	7,4%	44,7%	46,4%	2,91	4,33
Median	3,0%	3,9%	40,9%	39,9%	2,55	2,61

Tableau 3. Corrélation entre les variables (toutes souches)

	% Erreurs Sexage	% Ecllosion du transfert	% Ecllosion des œufs incubés	% Ecllosion fem	OAC/fem	% Groupe Rejeté	Souche	Age des repros	Age des Œufs	Age embryon
% Erreurs de sexage	1									
% Ecllosion du transfert	-0,48	1								
% Ecllosion des œufs incubés	0,03	0,47	1							
% Ecllosion fem	-0,12	0,54	0,99	1						
OAC/fem	0,18	-0,54	-0,96	-0,98	1					
% Groupe Rejeté	0,24	-0,25	-0,55	-0,59	0,56	1				
Souche	-0,13	0,22	-0,06	-0,04	0,02	0,28	1			
Age des Repros	0,05	-0,30	-0,49	-0,49	0,47	0,54	-0,09	1		
Age des Œufs	0,50	-0,69	-0,14	-0,21	0,23	-0,04	-0,46	-0,10	1	
Age embryon	0,08	0,12	0,23	0,21	-0,21	0,09	0,12	0,02	-0,06	1

Figure 1. Régression de l'âge de l'œuf sur l'erreur de sexage**Figure 2.** Régression du % de groupe rejeté* sur l'erreur de sexage

*des œufs clairs et des morts précoces détectés par CHEGGY