

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A. MIRA - Bejaïa
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département des sciences biologiques de l'environnement
Spécialité Biologie Animale

Réf :

Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme de

MASTER

Thème

**Etude de l'Effet *in-ovo* de
Molécules Biologiques Actives**

Présenté par :
KECHA Yanis Lounas & IHAMMOUCHEN Meriem

Soutenu le : **15 septembre 2022**

Devant le jury composé de :

| | | |
|-------------------------------|------------|--------------|
| M. BOUGAHAM Abdelazize Franck | Professeur | Président |
| M. IGUEROUADA Mokrane | Professeur | Encadreur |
| Mme. SAADEDDINE Ouardia | MCA | Examinatrice |

Année universitaire : 2021 / 2022

Remerciements

Tout d'abord, on remercie **DIEU** pour nous avoir accordé la patience, la volonté et la santé tout au long de notre parcours afin d'atteindre ce niveau et de réaliser ce travail.

Ensuite on remercie notre encadrant, le Professeur **IGUEROUDA Mokrane** d'avoir humblement accepté de nous encadrer, d'avoir partagé son expérience et ses connaissances avec nous, pour sa rigueur scientifique, son professionnalisme et sa patience qui nous ont permis de bien comprendre le raisonnement scientifique afin de mener à bien ce travail.

Veillez-trouvez ici l'expression de notre profonde gratitude.

On remercie le président du jury, le Professeur **BOUGAHAM Abdelazize Franck** et l'examinatrice, Madame **SAADEDINE Ouardia**, pour l'honneur qu'ils nous ont fait, en acceptant d'examiner et d'évaluer ce travail.

On remercie également, Mademoiselle **ABERBOUR Assia**, pour son aide précieuse au niveau du laboratoire et pour ses précieux conseils, pour le partage de son expérience et de ses connaissances scientifiques.

Enfin on remercie du fond du cœur chaque enseignant qui nous a enseigné durant notre cursus universitaire et chaque personne ayant contribué de près ou de loin à notre réussite et notre bien-être au sein de l'université.

Jammouchen Meriem & Kecha Yanis Lounas





DÉDICACES

DEDICACES

Je dédie ce travail à :

Mes très chers parents, qui ont fait de leur mieux pour m'offrir un environnement propice au travail, des valeurs, une éducation et une famille unique. Merci pour votre temps, votre affection et votre soutien depuis toujours.

À mon cher frère cadet Tahar et à ma chère sœur Yasmine.

À toute ma famille paternelle et maternelle.

À la mémoire de ma grand-mère Zahra, mon grand-père Tahar (Ouali) et mon grand-père Bachir ; Paix à leur âmes.

À tous mes amis, en particulier Reda, Chouaib et surtout Massi pour n'avoir jamais hésité à répondre présents en cas de besoin.

À mon binôme et camarade depuis toujours Ihammouchen Meriem.

À tous mes enseignants.

KECHA Yanis Lounas

DÉDICACES

Je dédie ce travail à ma chère et bien aimée maman que Dieu l'accueille en son vaste paradis. Pour m'avoir toujours poussé à me surpasser, pour m'avoir donné l'espoir et la volonté, pour m'avoir appris à aimer le savoir, les études et l'esprit de persévérance à tout prix, Merci d'avoir veillé avec moi pour me tenir compagnie avant chaque examen, merci pour chaque émotion, et leçon partagée, Merci pour tout !

« Ne pense pas aux choses qui appartiennent à Dieu, Dieu est bon ».

Ouatati.F.Z (1965-2019)

À ma grand-mère que je considère comme ma deuxième maman que Dieu l'accueille en son vaste paradis. Merci de m'avoir accueillie chez toi, merci pour ta compréhension, ton courage et ta bonne humeur, tes conseils et tes leçons de vie.

« Nous sommes que de passage, alors fait du bien autour de toi ».

Azouaou Sabiha (1944-2022)

Je remercie ma très chère sœur **Amina** d'être présente, d'avoir veillé avec moi, de m'encourager et d'être toujours là, à mes côtés.

Je tiens à remercier ma meilleure amie **Sabrina** pour sa présence, sa bonne foi son sarcasme et son innocence.

À mon binôme, camarade et complice d'aventure **KECHA Yanis Lounas**.

JHAMMOUCHEN Meriem

Liste des Tableaux

| Tableau N° | Titre | Page |
|-------------------|--|-------------|
| Tableau 1 | Dosage et composition des solutions de la première expérience | 24 |
| Tableau 2 | Dosage et composition des solutions à injecter pour la deuxième expérience | 26 |
| Tableau 3 | Pourcentage d'éclosion, de mortalité et de mortalité par stade embryonnaire des œufs de <u>Coturnix japonica</u> traités par injection <i>in-ovo</i> à J+9 | 33 |
| Tableau 4 | Pourcentage du poids relatif à l'éclosion et la perte en poids des œufs de <u>Coturnix japonica</u> traités par injection <i>in-ovo</i> à J+9 | 34 |
| Tableau 5 | pourcentage d'éclosion, de mortalité et de mortalité par stade embryonnaire des œufs de <u>Coturnix japonica</u> traités par injection <i>in-ovo</i> à J+9 | 34 |
| Tableau 6 | Pourcentage du poids relatif à l'éclosion et la perte en poids des œufs de <u>Coturnix japonica</u> traités par injection <i>in-ovo</i> à J+9 | 35 |

Liste des figures

| Figure N° | Titre | Page |
|------------------|---|-------------|
| Figure 1 | Mâle et femelle de la caille japonaise | 4 |
| Figure 2 | Œufs de caille japonaise | 4 |
| Figure 3 | Anatomie d'un œuf d'oiseau | 5 |
| Figure 4 | Composition d'un œuf de caille, (a) en acides aminés essentiels, (b) en acides gras essentiels, (c) en vitamines et (d) en minéraux. | 6 |
| Figure 5 | Les différents sites d'injection <i>in-ovo</i> | 7 |
| Figure 6 | Les origines moléculaires du stress oxydatif et ces conséquences | 11 |
| Figure 7 | Effet de la vitamine E sur le système immunitaire | 12 |
| Figure 8 | Effet de la vitamine C sur le système immunitaire | 15 |
| Figure 9 | Régénération de la vitamine E par l'acide ascorbique | 17 |
| Figure 10 | Régénération de la vitamine E à partir de sa forme radicalaire et synergies probables entre différents couples oxydo-reducteurs | 19 |
| Figure 11 | Lot d'œufs de caille japonaise sur un plateau d'incubation. | 21 |
| Figure 12 | Pesée d'un œuf de caille sur la balance analytique (QIAS SENSITY) | 21 |
| Figure 13 | Couveuse automatique 180 œufs CIMUKA | 22 |
| Figure 14 | Incubateur artificiel | 22 |
| Figure 15 | Panneau de réglage de la ventilation, de la température et de la rotation de l'incubateur | 23 |
| Figure 16 | Etape de préparation de la solution de Vitamine E α -tocophérol | 25 |
| Figure 17 | Tubes contenant les solutions à injecter de la deuxième expérience | 27 |
| Figure 18 | Matériel nécessaire pour l'injection <i>in-ovo</i> sous hotte de laboratoire | 28 |
| Figure 19 | Fœtus de caille japonaise au 9eme jour d'incubation | 29 |
| Figure 20 | Schéma représentatif d'une injection <i>in-ovo</i> avec une micropipette d'une substance dans la chambre à air d'un œuf après 9 jours d'incubations | 30 |
| Figure 21 | Application de la paraffine avec un coton-tige sur un œuf de caille injecté | 30 |
| Figure 22 | Plateaux d'éclosion à l'intérieur de la couveuse automatique 180 œufs CIMUKA | 31 |

Liste des abréviations

AA : Acide ascorbique.

C (-) : Contrôle négatif (non injecté).

C (+) : Contrôle positif (injecté avec de l'eau physiologique).

DPPC : dipalmitoylphosphatidylcholine.

E.S.O.C : Extrait Standardisé d'Œufs de Cailles.

E1 : Expérience 1.

E2 : Expérience 2.

ERO : Espèces réactives de l'oxygène.

Ex-vivo : Hors du vivant.

GD : Hormone de croissance.

GSH-Px : Glutathion peroxydases.

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène.

HDL : Lipoprotéines de haute densité.

in-ovo : Dans l'œuf.

J+9 : Jour 9

LDL : Lipoprotéines de basse densité.

LOO : Radicaux peroxydes.

LREMA : Laboratoire de Recherche en Ecosystèmes Marins et Aquacoles.

MDA : malondialdéhyde.

MEI : Mort embryonnaire intermédiaire.

MEP : Mort embryonnaire précoce.

MET : Mort embryonnaire tardive.

MM : Maladie de Marek.

Mn : Manganèse.

PEG : Polyéthylène glycol.

RNS : Espèce réactives de l'azote.

Se : Sélénium.

SOD : Superoxydes dismutases.

TR : Hiorédoxine réductase.

TRT : Testostérone.

VHD : Virus herpès de la dinde.

Vit C : Vitamine C.

Vit E : Vitamine E

Vit E act : Vitamine E acétate.

Vit E α : Vitamine E alpha.

α -TO : Radicaux tocophéroxydes.

α -TTP : Alpha-Tocopherol Transfer Protein.

Sommaire

| | |
|---------------------------|---|
| Introduction | 1 |
|---------------------------|---|

Chapitre I

| | |
|---|----|
| 1 Synthèse bibliographique | 3 |
| 1.1 La caille du japon (<i>Coturnix japonica</i>) | 3 |
| 1.1.1 Choix et raison de domestication | 3 |
| 1.1.2 Morphologie et description | 3 |
| 1.2 Généralités sur les œufs de caille | 4 |
| 1.2.1 Composition et bienfaits des œufs de cailles | 5 |
| 1.3 Le développement embryonnaire chez la caille | 6 |
| 1.4 L'injection <i>in-ovo</i> | 7 |
| 1.4.1 Origine | 7 |
| 1.4.2 Les sites d'injection <i>in-ovo</i> | 7 |
| 1.4.3 Substances injectées dans l'application <i>in-ovo</i> | 8 |
| 1.4.4 Les vitamines dans l' <i>in-ovo</i> | 8 |
| 1.5 Le stress oxydatif | 10 |
| 1.5.1 Les espèces réactives de l'oxygène | 10 |
| 1.5.2 Les antioxydants | 10 |
| 1.6 La vitamine E | 12 |
| 1.6.1 Définition | 12 |
| 1.6.2 Rôle de la Vitamine E | 12 |
| 1.6.3 Effet de la vitamine E chez la volaille..... | 13 |
| 1.6.4 La vitamine E dans l' <i>in-ovo</i> | 13 |
| 1.6.5 La vitamine E acétate | 13 |
| 1.6.6 La vitamine E oxydée | 14 |
| 1.7 Vitamine C | 14 |
| 1.7.1 Définition | 14 |
| 1.7.2 La Biosynthèse | 14 |
| 1.7.3 Rôle de la vitamine C | 15 |
| 1.7.4 La vitamine C chez la volaille | 16 |
| 1.7.5 La vitamine C dans l' <i>in-ovo</i> | 16 |
| 1.8 Interactions entre la vitamine C et la vitamine E | 17 |
| 1.8.1 Application <i>in-ovo</i> de Vit E + Vit C | 19 |

Chapitre II

| | |
|-------------------------------------|----|
| 2 Matériel et méthodes | 20 |
| 2.1 Travail à faire | 20 |

| | | |
|-------|---|----|
| 2.2 | Méthodes et matériel de pré-incubation | 20 |
| 2.2.1 | Origine des échantillons | 20 |
| 2.2.2 | Répartition du matériel biologique | 21 |
| 2.2.3 | Traitement des œufs | 21 |
| 2.3 | L'Incubation | 22 |
| 2.3.1 | Incubateur | 22 |
| 2.3.2 | Désinfection des incubateurs | 22 |
| 2.3.3 | Etiquetage | 23 |
| 2.3.4 | Température | 23 |
| 2.3.5 | Hygrométrie | 23 |
| 2.3.6 | Rotation des œufs | 23 |
| 2.4 | La pré-injection | 24 |
| 2.4.1 | Préparation des solutions | 24 |
| 2.5 | Matériel et méthodes de l'injection | 28 |
| 2.5.1 | La paillasse | 28 |
| 2.5.2 | Étapes et méthodes d'injection | 29 |
| 2.6 | Eclosion des œufs | 31 |
| 2.6.1 | Paramètres biologiques et zootechniques | 31 |
| 2.7 | Analyse statistique | 32 |

Chapitre III

| | | |
|----------|---|-----------|
| 3 | Résultats et discussion | 33 |
| 3.1 | Résultats de la première expérience | 33 |
| 3.2 | Résultats de la deuxième expérience | 34 |
| 3.3 | Discussion | 36 |
| 3.3.1 | Eclosion et mortalité | 36 |
| 3.3.2 | Poids relatif et la perte en poids | 38 |
| | Conclusion | 40 |

Références bibliographiques

Résumés (Français, Anglais)



Introduction

Introduction

La croissance est un phénomène physiologique important mais complexe. Sa complexité est encore plus remarquable chez les oiseaux, car contrairement aux mammifères, les embryons sont séparés de la mère au cours du développement embryonnaire. Les œufs sont donc la seule source de nutrition au cours du développement (**Zhu et al., 2021**). A l'approche de l'éclosion, la taille de l'embryon augmente tandis que le taux de croissance en raison du manque des nutriments dans l'œuf diminue (**Foye. 2005**).

Cependant les besoins énergétiques augmentent pendant l'incubation et donc le métabolisme est orienté vers l'utilisation des réserves de glycogène et fait également recours à la gluconéogenèse à partir des acides aminés, une dégradation importante des protéines musculaires en fin d'incubation est donc induite et celle-ci peut compromettre le développement des poussins, surtout les premiers jours après l'éclosion (**Givisiez et al., 2020**). Au cours des derniers jours d'incubation, la chaleur métabolique augmente et celle-ci induit un stress thermique qui représente l'une des principales causes de la mort d'embryons, entraînant ainsi une réduction du taux d'éclosion (**Tullett. 1990**).

Il existe toutefois une possibilité de renforcer l'embryon par l'injection *in-ovo* de substances exogènes dans l'œuf (nutriments, vaccins, stimulants, électrolytes, etc.), qui ont pour but d'améliorer la nutrition de l'œuf et donc les performances de croissance embryonnaire et ceci en améliorant l'état énergétique de l'embryon avant l'éclosion. Cette biotechnologie permet de compenser le manque en nutriments, de lutter contre des maladies aviaires, d'améliorer la qualité et la quantité des productions, ainsi que de renforcer le système immunitaire des espèces aviaires traitées (**Willemsen et al., 2010**).

Parmi les nutriments que nous pouvons administrer, on retrouve les vitamines qui sont des composés organiques vitaux qui peuvent être obtenus en grande quantité à partir d'huiles végétales. **Rengaraj et al., (2015)** ont rapporté qu'un total de treize vitamines ont été découvertes, nommées par ordre alphabétique commençant par la vitamine A jusqu'à la vitamine K.

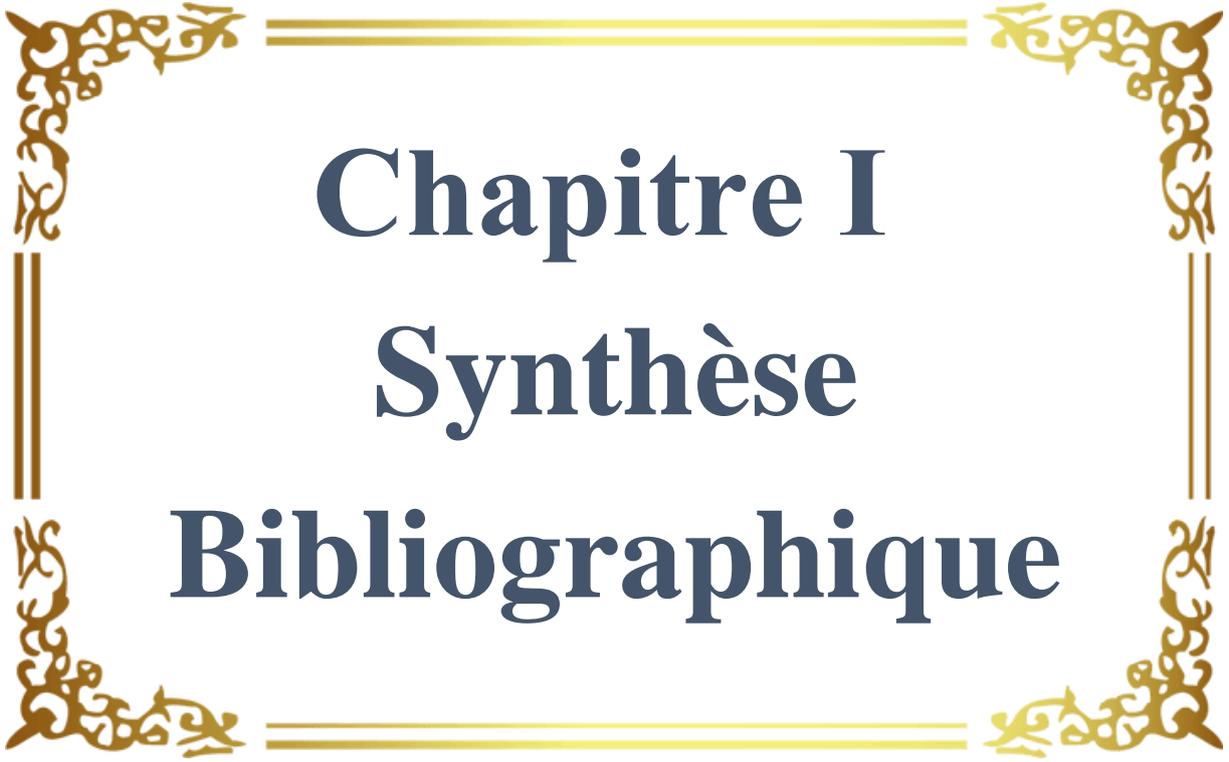
Aucune vitamine ne peut être considérée isolément. En effet, l'activité de la plupart des vitamines dépend souvent d'un ou plusieurs autres nutriments (vitamines, minéraux et oligoéléments). Les interactions entre elles peuvent s'exercer sur différents niveaux ; pendant l'absorption intestinale, au niveau du métabolisme et des mécanismes d'action des vitamines etc. Une vitamine peut se substituer dans une certaine mesure à une autre vitamine, agir

Introduction

favorablement sur la survie, la croissance, la gestation, l'immunité et remédier au stress oxydatif causé par les radicaux libres (**Guilland. 2011**).

La vitamine E (α -tocophérol) est le principal antioxydant liposoluble qui rompt la réaction en chaîne de la peroxydation des lipides (**Dror & Bartov, 1982**). La vitamine C (acide ascorbique) améliore la réponse immunitaire et augmente la résistance aux maladies chez les volailles en optimisant le système immunitaire (**Pardue et al., 1985**). Cependant, il a été démontré que l'interaction entre l'acide ascorbique et l' α -tocophérol a un effet d'épargne sur cette dernière en agissant comme un système redox ramenant les radicaux tocophéroxyle à leur état réduit de tocophérol (**Wilson. 1983**).

Des études ont été menées afin de démontrer les effets d'une application *in-ovo* de différentes substances sur les œufs de cailles japonaises (*Coturnix japonica*), mais à ce jour aucune étude impliquant l'injection simultanée de la vitamine C et de la vitamine E n'a été faite sur celle-ci. L'objectif de notre étude consiste donc à déterminer les effets d'une injection *in-ovo* d'une combinaison des vitamines E et C comparée à des groupes de contrôles et des groupes contenant une seule vitamine sur les œufs de cailles japonaises en évaluant les pourcentages d'éclosion, du poids relatif, de perte en poids et des mortalités embryonnaires.



Chapitre I
Synthèse
Bibliographique

1.1 La caille japonaise (*Coturnix japonica*)

La caille japonaise appartient à l'ordre des *Galliformes*, famille des *Phasianidae*, genre *Coturnix*, espèce *Coturnix japonica*. C'est un oiseau sédentaire terrestre et marcheur inféodé généralement aux agrosystèmes. C'est le plus petit animal, qui figure parmi les gallinacés les plus largement répandus sur la surface du globe et de la famille des phasianidés (comme le faisan et la perdrix). Avant son intégration dans de nouveaux milieux, son aire de répartition était limitée qu'en Asie précisément le Japon, la Chine et l'Indochine (**Moreau. 1951**).

1.1.1 Choix et raison de domestication

L'espèce s'est développée grâce à la domestication de la caille commune en Chine et est arrivée au Japon au XIIe siècle. Élevée à l'origine comme oiseau chanteur domestique. Plusieurs aspects expliquent l'utilité de cet oiseau. Premièrement, il a acquis une importance économique en tant qu'espèce agricole produisant des œufs et de la viande appréciés pour sa saveur unique. Deuxièmement à cause du faible coût d'entretien associé à sa petite taille (80-300 g). Mais également à son intervalle de génération court (3-4 générations par an). Sa résistance aux maladies, en ont également fait un excellent animal de laboratoire et a ainsi été largement utilisé dans de nombreuses études. La caille a été signalée pour la première fois comme un modèle de recherche utile par (**Padgett *et al.*, 1960**) et depuis lors, elle est devenue une espèce de laboratoire commune pour un grand champ d'investigations y compris le développement, le comportement, l'environnement, la comparaison cellulaire et l'utilisation des cailleaux pour des études chimériques. (**Ainsworth *et al.*, 2009**)

1.1.2 Morphologie et description

La caille japonaise est un oiseau très court, de forme arrondie et ramassé sur lui-même. Sa morphologie est caractérisée par une petite tête, un bec court et robuste légèrement recourbé à son extrémité et un cou moyennement développé. Les ailes ne sont pas très longues, mais très solides ; par conséquent, elle reste presque toujours au sol et ne s'envole que rarement pour des vols courts et bas. La queue est généralement courte. Les pattes, dépourvus d'ergot robuste, sont bien développées avec 3 doigts antérieurs liés à la base par une membrane très fine et un doigt postérieur libre (**Menassé. 1986**).

- **Le Sexage**

La différenciation entre les deux sexes n'est possible que vers 03 semaines d'âge. Avant cela tous les cailleteaux se ressemblent par leur duvet marron et la présence de traits jaunes au milieu du corps (**Woodard. 1973**).

Le mâle à une couleur crème uniforme ou rougeâtre comportant quelques plumes brunes sous la gorge, alors que la femelle a un plumage beige tacheté sous la gorge (**figure 1**).

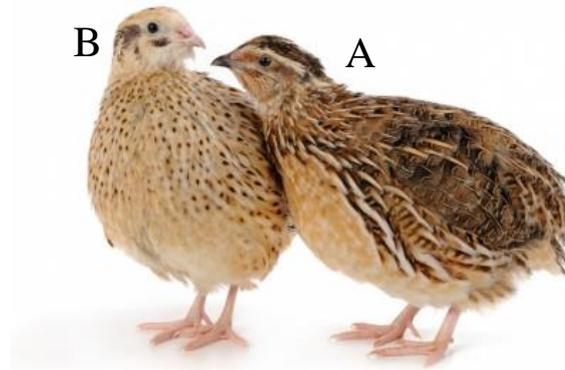


Figure 1 : Mâle (A) et Femelle (B) de la caille japonaise (**Keller., 2018, inrae.fr**).

1.2 Généralités sur les œufs de caille

Les œufs sont petits et pèsent en moyenne 10 g. Ils ont la particularité d'être tachés (**figure 2**). Ces tâches varient d'une femelle à l'autre et, est caractéristique de chaque pondeuse (**Lucotte. 1975**). Les œufs ont une longueur de l'ordre de 3cm et une largeur d'un peu moins de 2,5 cm (**Menassé. 1986**). La composition de l'œuf comprend : 47,4 % d'albumine, 31,9 % de jaune et 20,7 % représentant les membranes et la coquille (**figure 3**). Ces dernières ont une épaisseur de 0,063 et 0,197 mm respectivement (**Mohmond & Coleman, 1967**), La période d'incubation est d'environ 16 à 17jours (**Ainsworth et al., 2009**)



Figure 2 : Œufs de caille japonaise (**Original, 2022**).

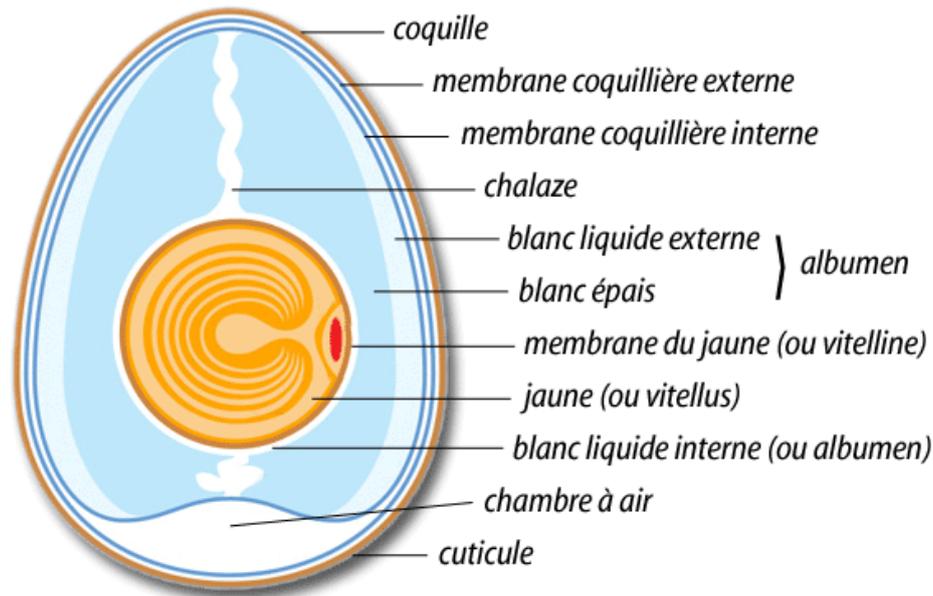


Figure 3 : Anatomie d'un œuf d'oiseau (Ouaga. 2013).

1.2.1 Composition et bienfaits des œufs de cailles

Beaucoup de personnes, en particulier dans les pays asiatiques, consomment les œufs de cailles vu que ces derniers sont très riches en vitamines, minéraux et antioxydants (**figure 4**). Malgré leurs petites taille, leur valeur nutritive est trois à quatre fois plus riche que les œufs de poulet. La consommation régulière d'œufs de caille (2 œufs par jours) aide à lutter contre de nombreuses maladies, car ils sont considérés comme un remède naturel contre les troubles digestifs tels que les ulcères de l'estomac. Ces petits œufs renforcent le système immunitaire, ils permettent de promouvoir la mémoire, augmentent l'activité du cerveau et stabilisent le système nerveux. Ils luttent contre l'anémie en augmentant le taux d'hémoglobine dans le corps tout en éliminant les toxines et les métaux lourds (**Troutman. 2012**). Les Chinois se servent des œufs de caille afin de guérir quelques maladies comme la tuberculose ou l'asthme.

Le complément alimentaire E.S.O.C ou extrait Standardisé d'Œufs de Cailles contient différentes enzymes appelées : Ovomucoïdes et ovoïnhibiteurs. Celles-ci ont le pouvoir d'inhiber les protéases humaines responsables du phénomène d'inflammation et donc du déclenchement de la cascade allergique et même du diabète (**Bruttmann et al., 2013**). Comme cité précédemment il a été prouvé que la valeur nutritionnelle des œufs de caille est beaucoup plus élevée par rapport à celle offerte par d'autres œufs (**Tunsaringkarn et al., 2013**).

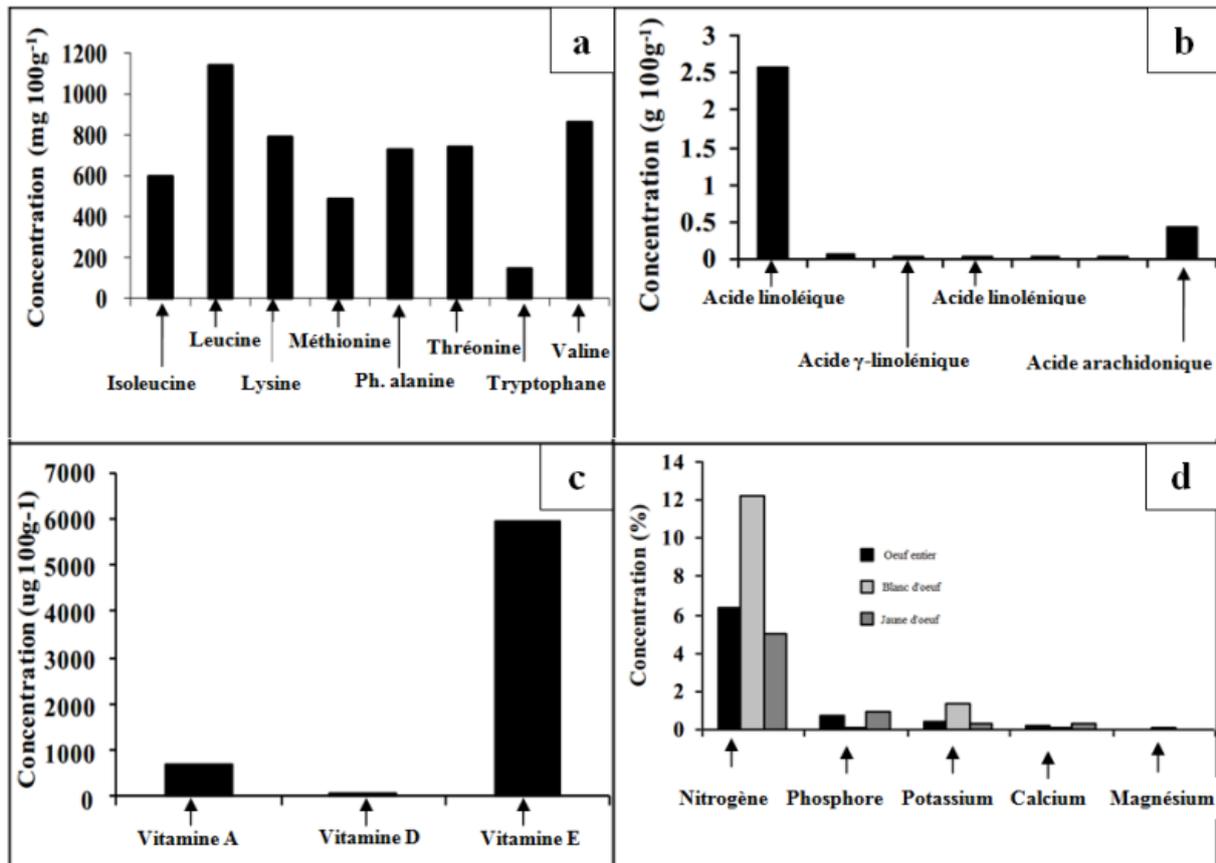


Figure 4 : Composition d'un œuf de caille, (a) en acides aminés essentiels, (b) en acides gras essentiels, (c) en vitamines et (d) en minéraux (Modifiée, d'après Tunsaringkarn *et al.*, 2013).

1.3 Le développement embryonnaire chez la caille

Aux premiers stades de l'embryogenèse, il existe peu de différences de développement entre l'embryon de la poule et celui de la caille (la division et la croissance des cellules, la formation de l'ectoderme, mésoderme et l'endoderme la gastrulation et la neurulation etc.). C'est donc l'accélération de l'ontogenèse des embryons de la caille aux stades intermédiaires et avancés du développement qui crée la différence avec le développement du poussin chez la poule. Ainsworth *et al.*, (2010) ont développé une série de stades de développement définitifs pour la caille japonaise afin que les différences soient entièrement caractérisées. Comme tous les oiseaux, la caille subit au cours des derniers jours d'incubation un stress thermique, celui-ci est induit par l'activité métabolique qui augmente contrairement à l'état énergétique de l'embryon qui, lui, se dégrade et ce dernier représente l'une des principales causes de la mort embryonnaire (Tullett. 1990). Il existe cependant une méthode pour remédier à ce phénomène et qui consiste en l'injection *in-ovo* de molécules bioactives (Willemssen *et al.*, 2010).

1.4 L'injection *in-ovo*

1.4.1 Origine

L'injection *in-ovo* de matériel exogène a été introduite pour la première fois dans les années 1980. En 1982, **Sharma et Burmester** ont effectué une vaccination sur les poulets de chair au stade d'embryons pour lutter contre la maladie de Marek (MM). Lors de l'expérience, les œufs ont été inoculés avec un volume de 0,1 ml du virus de l'herpès de la dinde (VHD) à l'aide d'une aiguille de calibre 22 de 1 pouce de long ou toute la longueur de l'aiguille a été introduite à travers un petit trou qui a été percé sur l'axe longitudinal de l'œuf. Bien que l'éclosion ne soit pas affectée, l'application *in-ovo* a permis aux poussins d'être constamment virémiques à partir de l'éclosion jusqu'à 8 semaines après l'éclosion. Il a été rapporté que les poulets vaccinés au stade d'embryons de 18 jours avec la souche FC126 du (VHD) avaient une résistance beaucoup plus grande à une injection intra-abdominale du virus pathogène à 3 jours après l'éclosion que ceux qui ont été vaccinés par voie sous cutanée dans la nuque le jour de l'éclosion. Il a été donc conclu que la vaccination prénatale peut protéger les poussins contre une maladie virale infectieuse ultérieure et que le virus vaccinal a besoin d'au moins 6 jours pour attribuer au poussin une résistance maximale aux agressions (**Sharma & Burmester, 1982 ; Sharma & Witter, 1983 ; Sharma et al., 1984**).

1.4.2 Les sites d'injection *in-ovo*

L'injection *in-ovo* peut être effectuée sur des zones différentes de l'œuf selon le stade du développement embryonnaire durant l'incubation. Les zones d'injections les plus communes sont : la chambre à air, l'allantoïde, le liquide amniotique, le corps de l'embryon et le sac vitellin (**Williams, 2007**).

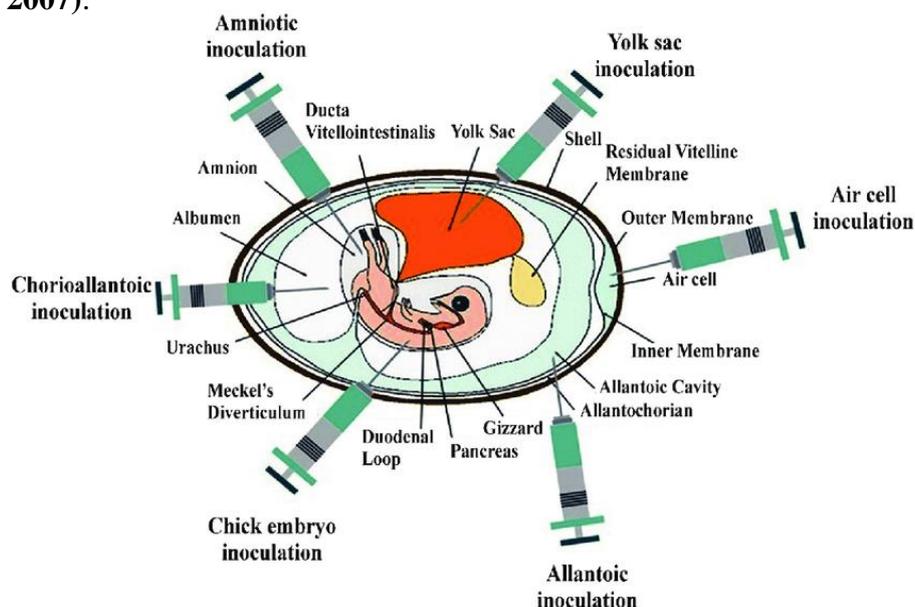


Figure 5 : Les différents sites d'injection *in-ovo* (**Arain et al., 2022**).

1.4.3 Substances injectées dans l'application *in-ovo*

Nombreux vaccins ont été approuvés pour l'administration *in-ovo* comme ceux contre la maladie de Marek, le virus de la bursite infectieuse, la variole aviaire, la maladie de Newcastle ainsi que la coccidiose (**Bal. 2009**) et (**Williams. 2011**).

Durant ces vingt dernières années beaucoup d'études en laboratoire sur l'application et les techniques *in-ovo* sur la volaille ont été menées, telle que l'injection de médicaments, d'hormones et divers nutriments supplémentaires afin de trouver un moyen d'améliorer l'immunité, la croissance, le poids etc... (**Kucharska-Gaca et al., 2017**).

Certaines de ses études l'étaient sur l'efficacité prospective des médicaments stimulants, comme la caféine ou la théophylline, afin de stimuler le développement embryonnaire, le métabolisme, l'absorption des nutriments et le processus d'éclosion. D'autres études ont été menées sur différentes hormones, telles que la TRH qui a été prouvée avoir un effet sur le taux et le moment d'éclosion, tandis que la thyroxine et la GH peuvent affecter positivement les performances des poussins après l'éclosion. Dans un effort de remplacer les antibiotiques pour la prévention des maladies et l'amélioration des performances, des recherches sur l'administration *in-ovo* de probiotiques et de prébiotiques ont été menées et il a été démontré que certaines bactéries, notamment *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium animalis* et *Enterococcus faecium*, se sont révélées être des candidats probiotiques appropriés pour l'administration *in-ovo* dans les œufs à couver de poulets de chair. La recherche prébiotique a jusqu'à présent identifié des produits qui peuvent influencer les caractéristiques histomorphologiques de l'intestin sans avoir d'effet apparent sur l'industrie de production de poulets de chair. L'administration de nutriments, comme les protéines, les peptides, les acides aminés, les nucléotides, les glucides, les électrolytes, les oligo-éléments, la créatine, les extraits de plantes et les vitamines ont été testés, Certains d'entre eux se sont révélés être des candidats valables pour améliorer le développement embryonnaire et les performances post-éclosion, et parmi ces candidats on trouve **les vitamines (Peebles. 2018)**.

1.4.4 Les vitamines dans l'*in-ovo*

Le potentiel de l'application *in-ovo* de vitamine E (Vit E) comme moyen d'améliorer l'immunité humorale et cellulaire chez les dindes et les poulets de chair a été exploré. Les réponses d'anticorps à une provocation de globules rouges de mouton à l'âge de 7 jours ont révélé que l'injection de Vit E *in-ovo* dans l'amnios d'embryons de dinde et de poulet de chair améliorerait les composants de leur système immunitaire humoral et cellulaire. Cependant les

résultats de l'injection de la Vit E dépendaient strictement de la dose injectée. Une dose de 20 à 30 UI réduisait fortement l'éclosion, alors qu'une dose de 10 UI n'affectait pas significativement l'éclosion. En conclusion, bien que non révélée par les performances jusqu'à l'âge de 35 jours, l'amélioration du système immunitaire aviaire grâce à la Vit E est possible lorsque celle-ci est administrée *in-ovo* (**Gore & Qureshi, 1997**).

Dans une série de recherches concernant, les effets de l'injection *in-ovo* de la vitamine D (25(OH) D3), les amnios d'œufs à couver de poulet de chair Ross ont été injectés au jour 18 d'incubation à l'aide d'un appareil commercial automatisé. Après plusieurs expériences, les chercheurs ont noté que la résistance à la rupture des os des poulets de chair mâles au j 28 après éclosion a augmenté après l'injection *in-ovo* de différentes doses de vitamine D (0,20, 0,60 mg) et que l'injection de 0,60 mg de 25(OH) D3 peut influencer les différences liées au sexe dans le taux d'absorption du calcium du vitellus (**Bello et al., 2013 ; Bello et al., 2014 ; Bello et al., 2015**).

Les résultats de cette étude ont été confirmés grâce aux travaux de **Yair et al., (2015)** qui suggèrent que l'administration *in-ovo* d'une solution contenant une combinaison de vitamine D3 et d'oligo-éléments injectés dans l'amnios de poulet de chair peut améliorer la solidité osseuse des poulets adultes via l'augmentation de la teneur en cendres et de la rigidité de la matière osseuse et de l'os en entier.

Dans une autre étude, l'injection *in-ovo* de la vitamine B9 dans l'albumen des œufs de poulet Ross à 18 jours d'incubation a été réalisée. Bien que l'éclosion n'ait pas été affectée, l'acide folique a augmenté le taux de glycémie, d'acide folique et de phosphore tout en diminuant le taux de cholestérol sanguin, les LDL et les HDL et les taux de calcium et de phosphatase alcaline à 42 jours après éclosion. De plus, le gain de poids corporel et le taux de conversion alimentaire ont augmenté en réponse à l'injection *in-ovo* de la vitamine B9. Les chercheurs ont conclu que l'acide folique avait un effet globalement positif chez les poulets de chair (**Nouri et al., 2017**).

En plus de leurs fonctions conventionnelles, les vitamines A, D, E et C jouent un rôle vital dans le fonctionnement normal du système immunitaire car leur carence est connue pour altérer les réponses innées et adaptatives de l'hôte. En modifiant la transcription de plusieurs gènes du système immunitaire et en contribuant à la diminution du stress oxydatif, ces vitamines influencent le système immunitaire de différentes manières, notamment en modulant les mécanismes à médiation cellulaire et les réponses médiées par les anticorps. De plus, la

supplémentation par ces vitamines peut aider le système immunitaire à combattre les agents pathogènes microbiens tout en réduisant les effets néfastes associés au stress oxydatif (Shojadoost *et al.*, 2021).

1.5 Le stress oxydatif

Le stress oxydatif est causé par le déséquilibre entre prooxydants et antioxydants au niveau cellulaire ou tissulaire. Pendant le processus de respiration normale, l'oxygène est progressivement réduit pour produire de l'eau. Cependant, la réduction incomplète de l'oxygène au cours de ce processus conduit à la formation d'entités chimiques qui ont des propriétés oxydantes puissantes et sont connues sous le nom d'espèces réactives de l'oxygène (**ERO**), (Voljc *et al.*, 2011).

1.5.1 Les espèces réactives de l'oxygène

Il existe deux types d'ERO ; celles des radicaux libres, qui contiennent un ou plusieurs électron(s) non apparié(s) dans leur orbite moléculaire comme le superoxyde, l'oxyde nitrique et le radical hydroxyle. Ou celles des ERO non radicales, qui n'ont pas des électrons non appariés mais sont chimiquement réactifs et peuvent être convertis en ERO radicales tels que le peroxyde d'hydrogène, l'ozone, le nitrate de peroxy et l'hydroxyde. Les ERO sont constamment produits au cours du métabolisme physiologique des tissus vivants (Surai, 2003). Ils sont capables d'endommager des molécules biologiques importantes telles que l'ADN, les protéines, les lipides et les glucides (**figure 6**). L'effet le plus important des ERO sur le métabolisme cellulaire est leur participation dans les réactions de peroxydation des lipides. La peroxydation lipidique est une réaction en chaîne qui peut entraîner des dommages importants aux cellules si l'équilibre **antioxydant**/prooxydant n'est pas atteint (Panda *et al.*, 2014).

1.5.2 Les antioxydants

Un antioxydant est une molécule qui inhibe l'oxydation d'autres molécules. Il existe des milliers de composés dans la nature qui possèdent des propriétés antioxydantes. Certains d'entre eux sont synthétisés dans le corps (acide ascorbique, glutathion) tandis que d'autres sont apportés par des aliments (vitamine E, caroténoïdes, etc.). La synthèse d'enzymes antioxydantes dans le corps a besoin de cofacteurs métalliques (**Se** pour les glutathion peroxydases (GSH-Px) et thiorédoxine réductase (TR), **Zn**, **Cu** et **Mn** pour les superoxydes dismutases (SOD) et **Fe** pour

la catalase). Une carence en nutriments et une carence des métaux mentionnés ci-dessus provoque un stress oxydatif et permet d'endommager les molécules biologiques ainsi que les membranes et les tissus. La volaille en particulier est fréquemment exposée au stress oxydatif, ce dernier peut entraîner des dommages aux protéines corporelles, aux lipides et à l'ADN et peut conduire à de mauvaises performances, une mauvaise santé ou même des mortalités. Par conséquent, l'optimisation et l'apport alimentaire en nutriments antioxydants est une étape importante pour équilibrer les dommages oxydatifs et la défense antioxydante dans le corps animal. La **vitamine E** par exemple est l'un des antioxydants les plus efficaces qui peuvent jouer un rôle important dans la réduction du stress oxydatif chez la volaille (**Panda *et al.*, 2014**).

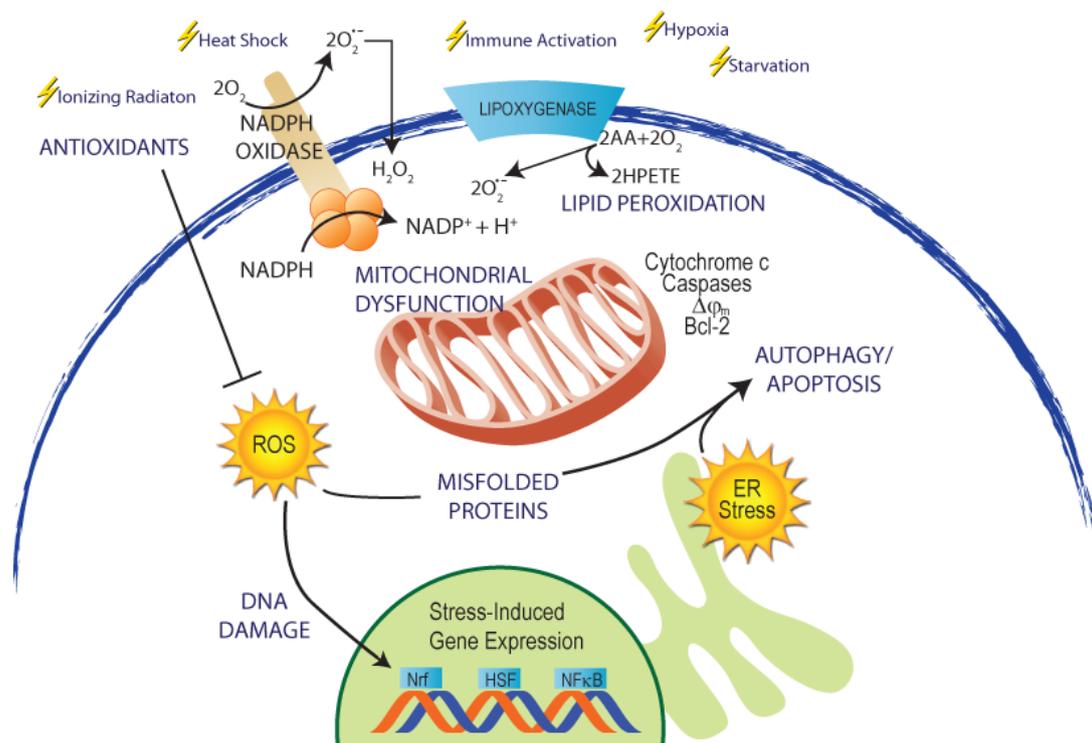


Figure 6 : Les origines moléculaires du stress oxydatif et ces conséquences (**EnzoLifeSciences.com 2022**).

1.6 La vitamine E

1.6.1 Définition

La vitamine E (Vit E) est un groupe de composés contenant à la fois des tocophérols et des tocotriénols, ceux-ci peuvent être trouvés naturellement et les sources les plus riches étant les huiles végétales, les œufs, le foie, les légumineuses et les plantes vertes. (Tappel, 1970) La Vit E est liposoluble avec des propriétés antioxydantes (Shakeri et al., 2020). Elle possède 4 tocophérols différents, Alpha α , Beta β , Gamma γ et Delta δ , qui existent sous formes fonctionnelles de cette vitamine. L' α -tocophérol (Vit E α) est la forme la plus couramment trouvée dans la nature et elle est considérée comme la plus active biologiquement (Weiser et al., 1996).

1.6.2 Rôle de la Vitamine E

La Vit E protège les membranes cellulaires et les tissus des dommages causés par le stress oxydatif. Elle agit comme un régulateur de l'activité enzymatique cellulaire. La Vit E α est impliquée dans la voie de la glutathion peroxydase et protège les organismes des dommages oxydatifs en réagissant avec les radicaux lipidiques produits lors de la réaction de peroxydation lipidique. De plus, la Vit E module l'activité de la protéine kinase C, et contrôle la croissance et le développement des muscles lisses. Il a également été rapporté que la Vit E protège les lymphocytes, les macrophages et les plasmocytes contre les dommages oxydatifs et améliore leur survie (figure 7), leur prolifération et leur fonction. (Shakeri et al., 2020)

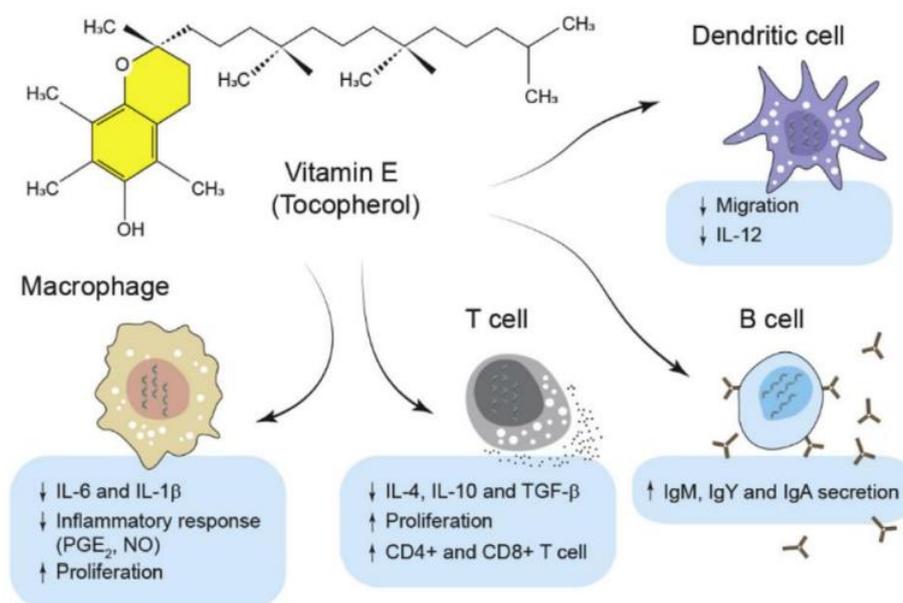


Figure 7 : Effet de la vitamine E sur le système immunitaire (Shojadoost et al., 2021).

1.6.3 Effet de la vitamine E chez la volaille

Les besoins en Vit E des volailles doivent être couverts par des compléments alimentaires car ils ne sont pas capables de la synthétiser. Dans des conditions de stress, en particulier de stress thermique, les niveaux d'hormones telles que la corticostérone et les catécholamines augmentent et la peroxydation des lipides dans les membranes cellulaires est initiée. Ainsi, une supplémentation alimentaire en Vit E dans des conditions de stress est recommandée. Il a été rapporté par **Shakeri et al., (2020)** que la vitamine E réduit la synthèse de malondialdéhyde dans le foie et entraîne une amélioration des performances du poulet, et améliore la production d'œufs même dans des conditions de stress thermique, et ceci semble être due au rôle de la Vit E dans la protection du foie contre la peroxydation lipidique. La Vit E pourrait également faciliter la régénération des tissus endommagés par le stress oxydatif et améliorer la fonction neurologique.

1.6.4 La vitamine E dans l'*in-ovo*

Beaucoup d'études ont été menées afin de connaître l'effet d'une injection *in-ovo* de la vitamine E sur la volaille, **Araújo et al., (2019)** ont rapporté qu'une amélioration de l'éclosion a été observée après une supplémentation *in-ovo* en Vit E de 38,5 UI par rapport au témoin. La supplémentation en Vit E a amélioré le poids des poussins nouveau-nés, les poussins les plus légers étaient ceux des groupes contrôles non supplémentés en Vit E. Le poids des poussins au moment de l'éclosion présente une relation linéaire positive avec la performance des poulets et leur poids final. Les résultats ont indiqué que la supplémentation en Vit E améliorerait le rapport poids des poussins/poids des œufs, le poids corporel et la longueur des poussins. Dans une autre étude, **Kadhim et al., (2021)** rapportent que la vitamine E améliore les performances de croissance embryonnaire et augmente le poids des poussins ainsi que le niveau de glycogène dans le foie, les muscles et les muscles cardiaques.

1.6.5 La vitamine E acétate

L'acétate de vitamine E (Vit E act), est une forme synthétique de la vitamine E. C'est l'ester de l'acide acétique et de l' α -tocophérol, la Vit E act est utilisée comme alternative au tocophérol lui-même car le groupe hydroxyle phénolique est bloqué, fournissant un produit moins acide avec une durée de conservation plus longue. On pense que l'acétate est lentement hydrolysé après avoir été absorbé par la peau, régénérant le tocophérol et offrant une protection contre les rayons ultraviolets du soleil (**Beijersbergen et al., 1995**). D'après **Srivastava et al., (1983)** des études de résonance magnétique révèlent une différence marquée entre la liaison de

l' α -tocophérol et celle de l'acétate de vitamine E avec les vésicules de dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC). Un modèle d'incorporation de ces molécules dans les bicouches lipidiques a été proposé. L' α -tocophérol se lie fortement aux lipides, éventuellement par la formation d'une liaison hydrogène entre le groupe hydroxyle du premier et l'un des atomes d'oxygène du second. La possibilité d'une telle formation de liaison hydrogène est exclue dans l'acétate de vitamine E, qui se lie de manière lâche par interaction hydrophobe normale. Le modèle d'interaction lipide-vitamine explique la décomposition *in vitro* du Peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) par l' α -tocophérol. L' α -tocophérol, en conjonction, avec H_2O_2 peut également agir comme un piègeur de radicaux libres dans la phase lipidique.

1.6.6 La vitamine E oxydée

Les radicaux alpha-tocophérol oxydés se recyclent vers la forme active par réduction grâce à d'autres antioxydants (**Shakeri et al., 2020**). En effet la vitamine C (Vit C) par exemple peut agir comme co-antioxydant avec d'autres antioxydants par des effets synergiques. Dans la recherche menée par **Doba et al., (1985)**, ils ont remarqué que l'activité antioxydante de la vitamine E a augmenté en présence de la vitamine C et ceci est dû à la réduction des radicaux alpha-tocophérol oxydés à leur forme initiale active.

1.7 Vitamine C

1.7.1 Définition

L'acide ascorbique (AA), l'ascorbate (l'anion de l'acide ascorbique) ou la vitamine C est un composé antioxydant soluble dans l'eau, qui protège les cellules contre les dommages oxydatifs, améliore la fonction du système immunitaire et est un cofacteur essentiel dans de nombreuses réactions enzymatiques telles que la synthèse du collagène, de la carnitine et des catécholamines, et le métabolisme des microsomes ou encore la synthèse et le catabolisme de la tyrosine (**Shakeri et al., 2020**).

1.7.2 La Biosynthèse

À partir du D-Glucose la biosynthèse de l'acide ascorbique, a lieu chez les animaux possédant une enzyme : la L-gulonolactone-oxydase. Cette dernière intervient dans la transformation du L-gulonolactone en 2-céto-L-gulonolactone, précurseur de la vitamine C. L'Homme, les primates, les cochons-d'indes et les mammifères volants n'en possèdent pas et doivent donc compenser en apportant l'AA par voie exogène (alimentation, comprimés...) (**Munnich et al., 1987**).

1.7.3 Rôle de la vitamine C

La vitamine C active les enzymes lysyl hydroxylase, prolyl-4-hydroxylase et prolyl-3-hydroxylase, qui sont impliquées dans la conversion de la proline et de la lysine liées aux peptides en hydroxyproline et hydroxylysine. Ces conversions sont essentielles à la formation du collagène celui-ci est essentiel au développement et au maintien des vaisseaux sanguins, des tissus cicatriciels, du cartilage et des os.

La vitamine C est un cofacteur de la dopamine bêta hydroxylase, qui participe à la conversion de la dopamine en noradrénaline dans les tissus nerveux. Diverses études ont indiqué qu'une supplémentation en tyrosine et en vitamine C pendant le stress pourrait réduire les hormones de stress et la perte de poids lors d'essais sur des animaux.

Il a également été démontré que la vitamine C régule la température corporelle, la synthèse de la 1,25-dihydroxy vitamine D et la fonction du système immunitaire. La vitamine C est présente à des concentrations élevées dans les cellules immunitaires et elle s'épuise rapidement dans des conditions de stress elle a un effet sur les phagocytes, la production de cytokines, de lymphocytes et le nombre de molécules d'adhésion cellulaire dans les monocytes (**figure 8**).

(Shakeri *et al*, 2020)

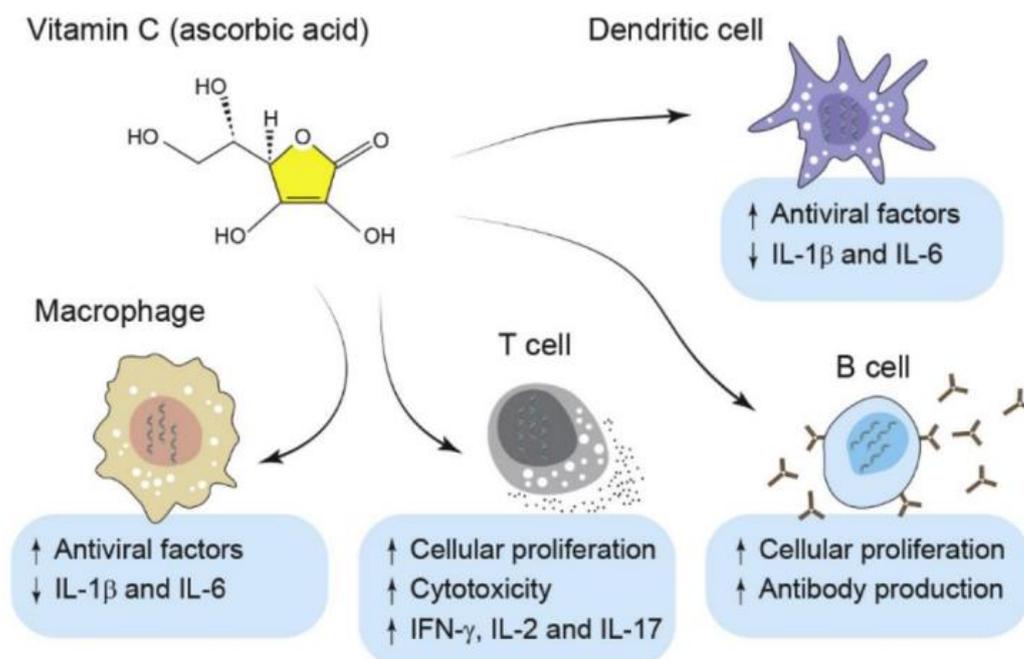


Figure 8 : Effet de la vitamine C sur le système immunitaire (Shojadoost *et al.*, 2021).

1.7.4 La vitamine C chez la volaille

La volaille adulte est capable de synthétiser la vitamine C pour répondre à ses besoins dans des conditions normales. Cependant, il a été constaté que leurs besoins augmentent pendant le stress (**Maurice *et al.*, 2004**). La supplémentation alimentaire en vitamine C de 250 mg/kg en moyenne chez les poulets de chair soumis à un stress thermique, améliore les performances de croissance, améliore le statut immunologique, la qualité de la carcasse et réduit la mortalité (**Abidin & Khatoun, 2013**).

1.7.5 La vitamine C dans l'*in-ovo*

L'acide ascorbique n'existe pas dans un œuf fraîchement pondu et il n'apparaît qu'au 3ème/4ème jour d'incubation à la suite d'une biosynthèse endogène par l'embryon en développement. Cependant la quantité fabriquée peut ne pas être suffisantes dans des conditions d'incubation artificielle, en particulier vers la fin de la période d'incubation pendant laquelle l'embryon est le plus exposé au stress thermique. C'est un phénomène essentiellement observé chez les canards et les oies mais on l'observe aussi chez les poulets de chair (**Kontecka *et al.*, 2006**).

Zhang *et al.*, (2019) ont trouvé que l'administration *in-ovo* de 12 mg d'AA à des poussins leur offre une meilleure efficacité alimentaire pendant la phase tardive et pendant la phase de croissance que ceux du groupe de contrôle. Des pourcentages plus élevés de cuisse et de jambe ont été observés chez les poussins des groupes 3 et 6 mg d'AA que chez le groupe témoin non injecté, pris ensemble, ces résultats suggèrent que l'injection *in-ovo* d'AA (3 à 12 mg par œuf) a des effets positifs durables sur la croissance post-éclosion, le développement musculaire des pattes, et la capacité antioxydante systémique des poulets de chair.

1.7.5.1 Application *in-ovo* de l'AA dans la chambre à air

Il a été signalé que l'injection de 3 mg d'AA dans la chambre à air de l'œuf pendant le stade intermédiaire de l'incubation (11 à 15 jours d'incubation) peut améliorer l'éclosion et augmenter le poids corporel de l'embryon des poulets de chair (**Zhang *et al.*, 2019**).

L'injection *in-ovo* de 3 mg de vitamine C dans la chambre à air le 13ème jour d'incubation améliore la capacité d'éclosion chez les poulets de chair et l'injection *in-ovo* de 4,8 mg d'AA dans la chambre à air des œufs de canard améliore également leur éclosion (**Hajati *et al.*, 2014**).

Santos *et al.*, (2018) ont trouvés qu'une supplémentation *in-ovo* d'AA à des œufs de poulets de chair réduit la mortalité de 2,86 % par rapport aux œufs non injectés. De plus, le tibia la surface et la densité minérale osseuse du fémur ont augmenté chez les poussins des œufs injectés. L'alimentation *in-ovo* avec des glycosaminoglycanes et de la vitamine C peut favoriser le développement osseux des embryons et réduire la mortalité totale pendant la période d'incubation.

1.7.5.1.1 Injection de la Vit C dans la chambre à air des œufs de cailles

El-Kholy *et al.*, (2019) ont injecté 3 vitamines (C, B6, B12) dans la chambre à air des œufs de caille japonaise, et ils ont trouvés que Les poids relatifs de la bourse de Fabricius et du thymus ont significativement ($P = 0,002$ ou $0,003$) augmenté par rapport à ceux du groupe témoin. Ainsi, ils ont déduit que l'injection *in-ovo* de vitamines C, B6 et B12 a amélioré le profil sanguin et la réponse immunitaire de la caille japonaise.

1.8 Interactions entre la vitamine C et la vitamine E

Plusieurs recherches chez les animaux et l'être humain ont permis de mettre en évidence le rôle protecteur des vitamines anti-oxydantes C et E et des caroténoïdes (principalement la β -carotène). Des essais expérimentaux ont été effectués pour confirmer l'existence d'une relation de cause à effet, les résultats de ces essais ont démontré l'existence d'une synergie entre la vitamine C et la vitamine E. La réduction des radicaux tocophéroxyles (α -TO) est faite grâce à l'acide L-ascorbique qui en donnant un électron il pourra régénérer l' α -tocophérol comme il est démontré dans la **figure 9** (**Niki *et al.*, 1982**).

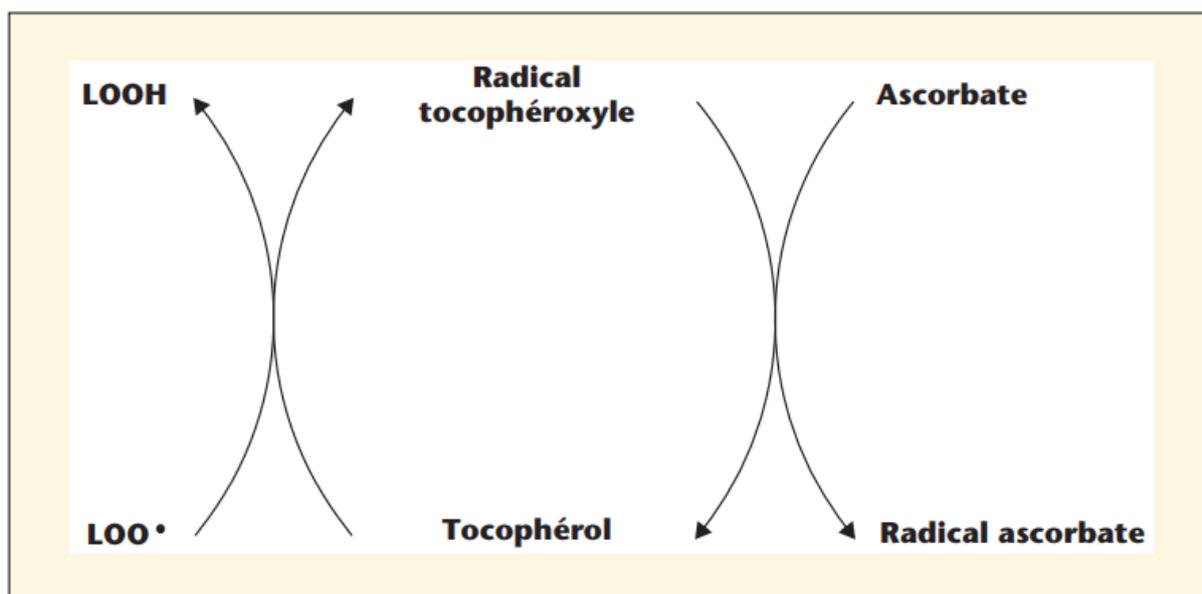


Figure 9 : Régénération de la vitamine E par l'acide ascorbique (**Niki *et al.*, 1982**).

La coopération entre la vitamine C et la vitamine E a été vérifiée grâce aux liposomes. Ceux-ci constituent un milieu hétérogène dans lequel l'ascorbate, via son caractère hydrosoluble, va se répartir principalement dans la phase aqueuse. Et l' α -tocophérol va se positionner principalement à l'intérieur de la membrane via sa solubilité dans les phospholipides. Ce modèle est plus proche des conditions *in vivo*. Pendant que les espèces radicalaires sont produites dans la phase aqueuse, l'ascorbate ou l' α -tocophérol vont inhiber le phénomène oxydatif, ainsi chaque vitamine induit une période de latence différente, mais en présence des deux vitamines combinées, cette période de latence est égale à la somme des deux périodes de latence. Ce qui prouve, donc, l'existence d'un effet additif. Lorsque les espèces radicalaires sont internalisées à l'intérieur des membranes de phosphatidylcholine, la vitamine C n'a plus d'effet direct, mais, lorsque la vitamine E est injectée dans les membranes, l'ascorbate augmente le temps de latence et de l'effet antioxydant ce qui prouve l'existence d'une synergie (Niki *et al.*, 1982).

La coopération entre la vitamine C et la vitamine E dépend de la chimie radicalaire de celle-ci, le radical tocopheroxyle (α -TO) est formée lorsque la vitamine E neutralise les radicaux peroxydes LOO produits pendant la phase lipidique. Celui-ci peut réagir avec un autre radical peroxyde pour donner un produit stable (**réaction 1**), ou avec un radical tocopheroxyle pour crée un dimère (**réaction 2**) ou avec l'ascorbate (AH⁻) qui lui permettra de se régénérer en α tocophérol et l'ascorbate, étant oxyde, deviendra radical ascorbyle A[•] (**réaction 3**) :



La régénération de la vitamine E est plus importante quand la concentration du radical peroxyde ou du radical tocopheroxyle est très réduite et que celle de la vitamine C est élevée, la productivité de cette régénération dépend principalement de l'étendu du pouvoir de l'ascorbate à accéder au radical tocopheroxyl.

Les données précédentes ont été reproduites *ex vivo* grâce à plusieurs modèles cellulaires. Celles-ci ont permis de déduire que la régénération de la vitamine E ne dépend pas uniquement de la vitamine C, car le radical tocopheroxyle pourrait aussi enlever un électron à l'ubiquinol (coenzyme Q10) membranaire, l'acide lipoïque, le glutathion et le β -carotène

semblent tous interagir entre eux avec la vitamine E afin de permettre le maintien de la stabilité de l'état redox cellulaire.

Un schéma théorique a été dressé par **Guilland. (2011) (figure 10)**, celui-ci désigne les multiples complémentarités des mécanismes cellulaires, qui permettent de lutter contre le stress oxydatif, il explique aussi les difficultés rencontrées pour mettre en avant l'existence de ces synergies chez les organismes vivants.

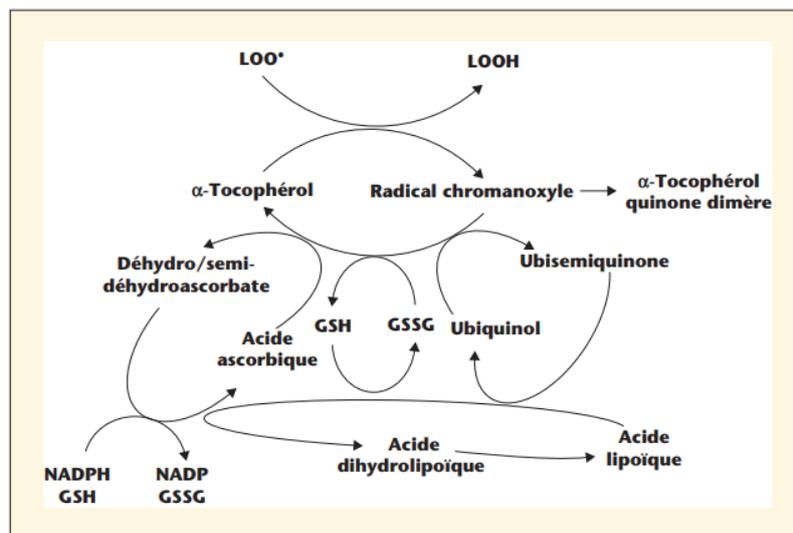


Figure 10 : Régénération de la vitamine E à partir de sa forme radicalaire et synergies probables entre différents couples oxydo-reducteurs (**Guilland. 2011**).

De nombreuses recherches chez les animaux soutiennent la théorie de l'existence d'une synergie entre la vitamine C et la vitamine E. **Bertinato et al., (2007)** rapportent qu'une supplémentation en vitamine C induit un accroissement significatif de la concentration de la vitamine E au niveau des tissus chez le cobaye, et inversement, un manque en vitamine C induit une réduction des concentrations de vitamine E au niveau tissulaire.

1.8.1 Application *in-ovo* de Vit E + Vit C

Cinar et al., (2014) ont montré qu'une supplémentation d'une combinaison de vitamines E et C a entraîné une meilleure protection contre les stress oxydatif que la supplémentation individuelle des deux vitamines. **Sahin et al., (2002)** ont obtenu des résultats similaires sur des poules élevées à température ambiante élevée. **Surai. (2002)** a constaté que l'activité superoxyde dismutase (SOD) est la plus élevée et que le niveau de malondialdéhyde (MDA) est le plus bas, de sorte que la défense oxydatif est la plus forte dans la combinaison vitamine C + E chez les poussins nouvellement éclos.



Chapitre II

Matériel et méthodes

Introduction

Ce travail a été réalisé au niveau du Laboratoire de Recherche en Ecosystèmes Marins et Aquacoles (LREMA) de la faculté des sciences de la nature et de la vie de l'université Abderrahmane Mira de Bejaia, dont l'objectif était d'effectuer une recherche visant à connaître les effets d'une injection *in-ovo* de molécules bioactives (vitamine E et vitamine C) dans des œufs de caille japonaise.

2.1 Etapes à suivre

- L'incubation d'œufs de caille japonaise dans des conditions optimales afin de les préparer à une éventuelle injection prévue le 9^{ème} jour de l'incubation.
- L'injection de plusieurs solutions contenant soit de la vitamine C (acide L-ascorbique), de la vitamine E (α -tocophérol), de la vitamine E acétate (acétate d' α -tocophérol), l'association de la vitamine E α + la vitamine C, de l'eau physiologique comme contrôle positif.
- Le comptage, la pesée et l'observation des cailleteaux après l'éclosion.
- L'étude des effets des molécules injectées sur le développement des embryons : leurs éclosions, leur poids et la mortalité.

2.2 Méthodes et matériel de pré-incubation

Dans ce qui suit nous aborderons l'origine des œufs de caille, les mesures et les observations à prendre en compte avant l'incubation, le nombre d'œufs à incuber et la répartition du matériel biologique.

2.2.1 Origine des échantillons

Un total de 252 œufs a été utilisé dans ces expériences. Ceux-ci nous ont été fournis par un éleveur particulier activant dans la commune de Souk-Oufella de la wilaya de Bejaïa. Les œufs appartiennent à une espèce de caille destinée à la coturniculture, plus précisément la caille japonaise.

2.2.2 Répartition du matériel biologique

Les 252 œufs (**figure 11**) ont été répartis sur deux expériences successives, la première a commencé le 27 mars 2022 et s'est terminée le 13 avril 2022 avec un total de 110 œufs, et la deuxième a débuté le 3 avril 2022 et est achevée le 20 avril 2022 avec un total de 142 œufs.



Figure 11 : Lot d'œufs de caille japonaise sur un plateau d'incubation (**Original, 2022**).

2.2.3 Traitement des œufs

2.2.3.1 Comptage, tri et élimination

Les 252 œufs ont été choisis soigneusement parmi les œufs disponibles au laboratoire. Nous avons d'abord fait le tri en éliminant les œufs fissurés afin d'éviter d'introduire volontairement un œuf infertile. Les œufs ainsi triés ont ensuite été répartis de manière aléatoire de façon à avoir 4 groupes (29, 29, 26, 26) pendant la première expérience (E1) et 6 groupes (24, 24, 24, 24, 23, 23) pendant la deuxième (E2).

2.2.3.2 Pesée des œufs

Une fois les groupes sélectionnés et juste avant la mise en incubation, les œufs ont été pesés individuellement à l'aide d'une balance analytique (QIAS SENSITY) d'une précision de (0.01mg) (**figure 12**), le poids de chaque œuf a été noté dans le groupe auquel il appartient.



Figure 12 : Pesée d'un œuf de caille sur la balance analytique (QIAS SENSITY) (**Original, 2022**).

2.2.3.3 Désinfection des plateaux d'incubation

Afin d'éviter une contamination des œufs destinés à l'incubation, les plateaux d'incubation doivent être lavés avec de l'eau et du savon et ensuite désinfectés avec de l'alcool chirurgical à 70°, et enfin séchés avec du papier absorbant.

2.3 L'incubation

2.3.1 Incubateur

Dans nos expériences, nous avons utilisé 2 incubateurs différents. Le premier (**figure 13**) est un incubateur de type Cimuka permettant d'incuber jusqu'à 180 œufs, il est doté d'un système lui permettant de garder une température constante et une humidité stable et réglable. Il favorise la formation correcte de l'embryon, et assure des conditions idéales pendant l'incubation.

Pour la deuxième expérience nous avons utilisé un incubateur (**figure 14**) moins performant et peu précis par rapport au premier en terme d'humidité, ce dernier est un produit local il fonctionne à l'aide de lampes et qui garde plus au moins sa température constante, il a une capacité d'incubation de 200 œufs, et il est doté d'une minuterie qui lui permet de faire une rotation automatique tout comme le premier incubateur selon la période choisie.



Figure 13 : couveuse automatique 180 œufs CIMUKA (Original, 2022).



Figure 14 : incubateur artificiel (Original, 2022).

2.3.2 Désinfection des incubateurs

Tout comme les plateaux d'incubation, les incubateurs doivent être lavés avec de l'eau et désinfectés avec de l'alcool chirurgical à 70° avant chaque incubation pour assurer une hygiène irréprochable qui ne risque pas d'interférer avec nos résultats.

2.3.3 Etiquetage

Il est impératif de mettre, non seulement des étiquettes sur chaque plateau d'incubation afin de différencier les groupes d'œufs les uns des autres selon le groupe dans chaque expérience, mais également sur les tubes des solutions à injecter afin d'éviter de les confondre.

2.3.4 Température

Pour notre type d'expérience la température d'incubation idéale se situe entre 37,7° (**figure 15**) et 37,8° afin d'assurer un meilleur développement de l'embryon et une éclosion optimale (**Sauveur. 1988**).



Figure 15 : Panneau de réglage de la ventilation, de la température et de la rotation de l'incubateur (**Original, 2022**).

2.3.5 Hygrométrie

La perte d'eau normale en incubation est d'environ 12% du poids de l'œuf, sur la période totale d'incubation, elle est de 15 %. La perte d'eau est conditionnée par le contrôle de l'humidité ambiante. Pendant l'incubation le taux d'humidité idéal se situe entre 50 et 60%. Et il est d'environ 70% pendant la période d'éclosion (**Michel. 2010**). Contrairement au premier incubateur, le deuxième peut atteindre un pourcentage maximum de 42% uniquement, cette dernière étant d'ailleurs la valeur adoptée pour l'E2.

2.3.6 Rotation des œufs

Deeming. (1991) a montré que l'utilisation complète de l'albumen (liquides et protéines) par l'embryon dépendait du retournement des œufs. Et les œufs d'espèces nidicoles, qui ont une haute teneur en albumine, doivent être tournés plus souvent que les œufs d'espèces précoces. Dans nos expériences, les œufs sont retournés automatiquement par les incubateurs chaque 2 heures, depuis le début de l'incubation jusqu'au jour 15 d'incubation.

2.4 La pré-injection

2.4.1 Préparation des solutions

2.4.1.1 Première expérience

L'incubation des 110 œufs a été faite le 27 mars (J0), l'injection est réalisée à **J+9** (5 avril), et l'éclosion a débuté le 11 avril. Dans cette expérience, nous avons injecté 3 substances différentes dans 3 groupes d'œufs différents alors qu'un groupe servira de témoin négatif.

Effectif : 29 œufs (contrôle+), 29 œufs (contrôle-), 26 œufs (Vit E α), 26 œufs (Vit E act)

2.4.1.1.1 Protocole expérimental

Tableau 1 : Dosage et composition des solutions de la première expérience

| Substance injectée | Vit E α | Vit E act | Eau physiologique (solution saline 0.9%) |
|--------------------------|------------------------------------|----------------------|--|
| Type de diluant | PEG dilué dans l'eau physiologique | Eau physiologique | / |
| Concentration du diluant | 0.9% solution saline 600 mg PEG | 0.9% solution saline | 0.9% solution saline |
| Volume du diluant | 2.1ml | 2.7ml | 10 ml |
| Substance totale | 300mg | 300mg | / |
| Substance / œuf | 3mg | 3mg | / |
| Volume total | 3ml | 3ml | 10 ml |
| Volume injecté | 30 μ l | 30 μ l | 30 μ l |

2.4.1.1.2 Préparation des solutions

A-Solution contenant de la Vit E acétate

Dans cette expérience, la solution contenant de la Vit E act a été diluée uniquement avec de l'eau physiologique, selon ce qui suit :

1. Verser 2.7 ml d'eau physiologique dans un bécher
2. Mettre le bécher sur une balance analytique ensuite le tarer
3. Ajouter graduellement de la Vit E act jusqu'à atteindre 300 mg
4. Agiter la solution avec un agitateur magnétique
5. Verser la solution dans un tube et conserver au frais

B-Solutions contenant de la Vit E α 

1-Broyer une quantité suffisante de PEG de manière à le rendre sous forme de poudre très fine.



2-Peser 600mg de poudre de PEG à l'aide d'une balance analytique.



3-Verser 2.1 ml d'eau physiologique dans un bécher, ensuite rajouter le PEG graduellement en mélangeant avec un agitateur magnétique.



4-Rajouter 300 mg de Vit E α au mélange graduellement sur une balance analytique.



5-Agiter ensuite Verser la solution dans un tube, puis le mettre au frais jusqu'au moment de l'injection.

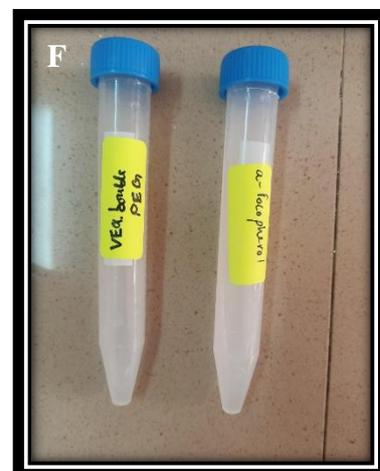


Figure 16 : Étapes de préparation de la solution de Vitamine E α -tocophérol (Original, 2022).

- A. Polyéthylène glycol 6000 (PEG) (Gore *et al.*, 1997)
- B. PEG broyé avec un mortier et pilon
- C. Pesée du PEG sur balance analytique
- D. Solution de Vit E α sur un agitateur magnétique chauffant
- E. Pesée de la solution sur une balance analytique après l'ajout de la Vit E α
- F. Tubes contenant les deux solutions de Vit E α et de Vit E act

2.4.1.2 Deuxième expérience

L'incubation des 142 œufs a été faite le 3 avril (J+0), l'injection est réalisée à J+9 (12avril), et l'éclosion a débuté le 18 avril. Dans cette expérience, nous avons injecté 5 substances différentes dans 5 groupes d'œufs différents dont un sert de témoin négatif.

Effectif : 24 œufs (contrôle+), 24 œufs (contrôle-), 24 œufs (Vit E α), 23 œufs (Vit E act), 24 œufs (Vit C), 23 œufs (Vit E α + Vit C).

Pendant l'E1 nous avons constaté que la solution contenant de la Vit E act, n'était pas homogène ce qui peut entraîner une injection disproportionnée en terme de substance par œuf, car des parties de la solution sont plus visqueuses que d'autres ce qui indique donc que la Vit E act n'a pas été entièrement solubilisée dans l'eau physiologique. La même chose a été constatée pour la solution contenant la Vit E α , même si celle si n'est pas aussi visqueuse que la solution de la Vit E act. Par conséquent et pour éviter de faux résultats, nous avons décidé de rajouter du PEG à la solution de Vit E α et de Vit E act dans l'E2 (Gore *et al.*, 1997).

2.4.1.2.1 Protocole expérimental

Tableau 2 : Dosage et composition des solutions à injecter de la deuxième expérience

| Substance injectée | Vit E α | Vit E act | Vit C+Vit E α | Vit C | Eau physiologique |
|--------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|--|----------------------|----------------------|
| Type de diluant | PEG dilué dans de l'eau physiologique | PEG dilué dans de l'eau physiologique | PEG dilué dans de l'eau physiologique | Eau physiologique | / |
| Concentration du diluant | 0,9% solution saline 3g de PEG | 0,9% solution saline 3g de PEG | 0,9% solution saline 4,5g de PEG | 0,9% solution saline | 0,9% solution saline |
| Volume du diluant | 6ml | 6ml | 8.5ml | 14.5ml | 10ml |
| Substance totale | 1g | 1g | 500mg(Vit C) +1,5g(Vit E α) | 500mg | / |
| Substance / œuf | 3mg | 3mg | 1mg(Vit C) +3mg(Vit E α) | 1mg | / |
| Volume total | 10ml | 10ml | 15ml | 15ml | 10ml |
| Volume injecté | 30 μ l | 30 μ l | 30 μ l | 30 μ l | 30 μ l |

2.4.1.2.2 Etapes à suivre et préparation des solutions

A-Solution contenant de la Vit E act ou de la Vit E α

Les étapes et matériel de préparation des solutions de Vit E act et de Vit E α pour cette expérience sont les mêmes pour la méthode de préparation de la solution de Vit E α de la E1.

B-Solution contenant de la Vit C

1. Verser 14.5 ml d'eau physiologique dans un bécher
2. Peser 500 mg de vitamine C à l'aide d'une balance analytique
3. Poser le bécher sur un agitateur magnétique et rajouter graduellement la vitamine C pesée
4. Verser la solution dans un tube ensuite le conserver au frais jusqu'au moment de l'injection

C-solution contenant de la Vit C + Vit E α

1. Broyer le PEG manuellement à l'aide d'un mortier et pilon
2. A l'aide d'une balance analytique, peser 4.5g de PEG broyé
3. Remplir 8.5ml d'eau physiologique dans un bécher ensuite le mettre sur un agitateur magnétique
4. Ajouter les 4.5g de PEG graduellement jusqu'à avoir une solution homogène
5. Mettre le bécher sur une balance analytique, le tarer ensuite rajouter 1.5g de Vit E α
6. Remettre le bécher sur l'agitateur magnétique
7. Peser 500 mg de Vit C, et les rajouter graduellement dans le bécher.
8. Une fois la solution devenue homogène, elle sera versée dans un tube et gardée au frais jusqu'au moment de l'injection (**figure 17**)



Figure 17 : Tubes contenant les solutions à injecter de la deuxième expérience (Original, 2020).

2.5 Matériel et méthodes de l'injection

L'injection est réalisée sous hotte de laboratoire (LABTECH, model HSBP-180). L'injection pour les deux expériences a été faite selon la même méthode et avec le même matériel (**figure 18**).

2.5.1 La paillasse

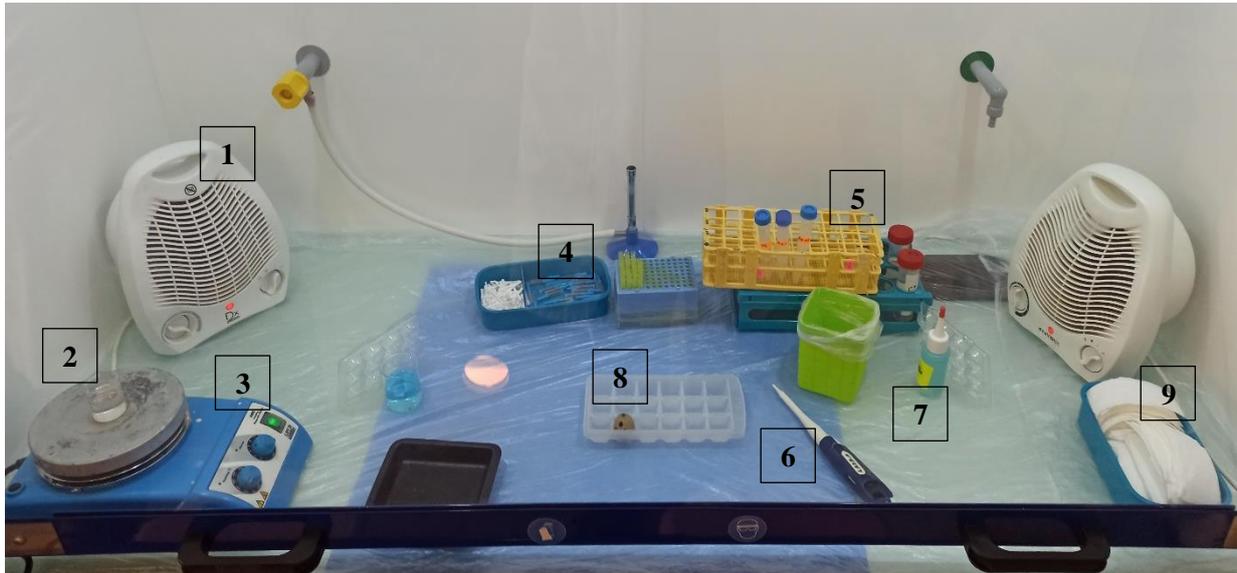


Figure 18 : Matériel nécessaire pour l'injection *in-ovo* sous hotte de laboratoire (**Original, 2022**).

- 1- Chauffage soufflant (EVATRONIC 002152) prévu pour garder une température ambiante de 39° à l'intérieur de la hotte.
- 2- Bêcher de paraffine, cette dernière va servir de bouchon pour les trous créés sur les coquilles des œufs après l'injection (**Hajati et al., 2014**)
- 3- Agitateur magnétique chauffant (VELP SCIENTIFICA) prévu pour maintenir la paraffine à l'état liquide
- 4- Boîte contenant des aiguilles d'injections et des cotons tiges avec lesquels la paraffine sera délicatement appliquée sur les œufs
- 5- Support de tubes à essais contenant les tubes des solutions à injecter
- 6- Micropipette de 100 µl, elle servira pour pipeter et injecter les solutions dans les œufs (**Nowaczewski et al., 2012**)
- 7- Alcool chirurgical à 70° qui servira à désinfecter le lieu de l'injection
- 8- Plateau à œuf, utile pour maintenir les œufs stables pendant l'injection
- 9- Papier absorbant prévu pour essuyer et désinfecter l'endroit de l'injection à l'aide de l'alcool (**Nowaczewski et al., 2012**)

2.5.2 Étapes et méthodes d'injection

Chaque groupe d'œuf reçoit individuellement l'injection pendant que le reste des groupes sont à l'intérieur de l'incubateur. L'injection d'un groupe prend environ 20 min, le groupe de contrôle négatif a été également laissé hors de l'incubateur pour la même période afin de lui faire subir les mêmes conditions que le reste des œufs. Les étapes d'injection sont les mêmes pour toutes les solutions. L'injection a été réalisée le jour J+9 (**figure 19**) et le site d'injection est la chambre à air de l'œuf (**El-Kholy et al., 2019**) :



Figure 19 : Foetus de caille japonaise au 9eme jour d'incubation (**Original, 2022**).

Protocole :

1. Sortir les solutions à injecter du réfrigérateur et les réchauffer en les mettant dans un bain-marie.
2. Sortir le groupe d'œufs à injecter de l'incubateur et le mettre immédiatement sous la hotte.
3. Désinfecter à l'aide d'alcool à 70° le gros bout de l'œuf qui est notre site d'injection.
4. Désinfecter l'aiguille d'injection avec de l'alcool à 70°.
5. Agiter la solution à injecter avec un vortex afin de la rendre homogène.
6. A l'aide d'une micropipette, pipeter 30 µl de la solution à injecter.
7. Introduire délicatement l'aiguille à l'intérieur de l'œuf en veillant à ne pas dépasser les limites de la chambre à air, ensuite injecter la solution et s'assurer que le volume entier (30µl) a été introduit à l'intérieur (**figure 20**).
8. On mouille un coton-tige avec de la paraffine stérile, ensuite on applique la paraffine délicatement sur le trou de l'injection afin de le sceller (**figure 21**). (**Hajati et al., 2014**)
9. Une fois l'injection de tous les œufs du groupe terminée, on place les œufs dans leurs plateau d'incubation et on les remet ensuite délicatement à l'intérieur de l'incubateur.

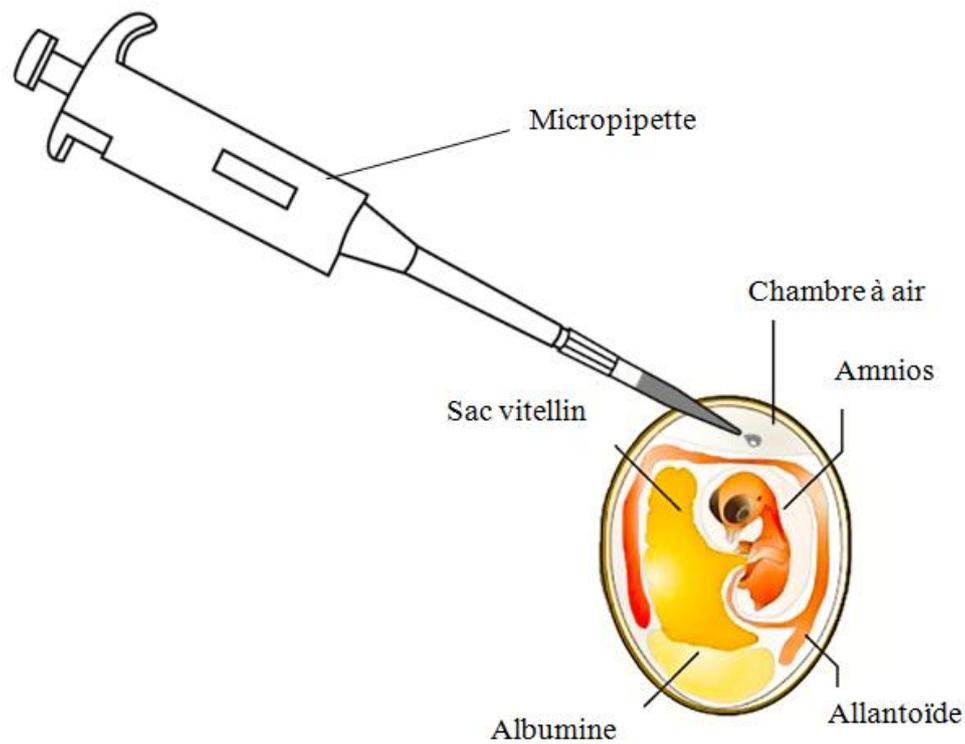


Figure 20 : Schéma représentatif d'une injection *in-ovo* avec une micropipette dans la chambre à air d'un œuf après 9 jours d'incubation.



Figure 21 : Application de la paraffine avec un coton-tige sur un œuf de caille injecté (Original, 2022).

2.6 Eclosion des œufs

Après 15 jours d'incubation, tous les œufs seront déplacés des plateaux d'incubation vers des plateaux d'éclosion (**figure 22**), les œufs de la (E1) ont été déplacés le 11 avril, et ceux de la (E2) ont été déplacés le 18 avril, d'abord vers les plateaux d'éclosion ensuite vers l'incubateur CIMUKA qui peut garantir une meilleure humidité, et va faciliter l'éclosion des œufs.

La rotation des œufs est arrêtée au bout de 15 jours, la température à l'intérieur de l'incubateur restera la même ($37,7^{\circ}$), mais l'humidité sera augmentée pour atteindre 60%.



Figure 22 : Plateaux d'éclosion à l'intérieur de la couveuse automatique 180 œufs CIMUKA (**original, 2022**).

2.6.1 Paramètres biologiques et zootechniques

2.6.1.1 Qualité des cailleteaux

Après l'éclosion des œufs on observe si nous avons des cas de handicaps (jambes écartées) ou des infections au niveau du cloaque.

2.6.1.2 Le poids

Les cailleteaux sont pesés un par un sur une balance électronique comme décrit par (**Hassan & Amal, 2018**), en veillant à ne pas mélanger les groupes. Les résultats sont notés afin de les analyser statistiquement mais également afin de calculer la perte en poids durant l'incubation :

2.6.1.2.1 Perte en poids des œufs

Le poids des cailleaux après l'éclosion est généralement inférieur au poids initial de l'œuf avant l'incubation, cette formule nous permet de calculer le pourcentage du poids perdu durant l'incubation :

$$\text{Perte en poids \%} = \frac{(\text{Poids initial de l'œuf} - \text{poids du cailleaux})}{\text{Poids initial}} \times 100$$

2.6.1.2.2 Poids relatif

$$\text{Poids relatif \%} = \frac{(\text{Poids du cailleaux})}{(\text{poids de l'œuf avant l'incubation})} \times 100$$

2.6.1.3 Taux d'éclosion

A la fin de chaque incubation le comptage de cailles nées est réalisé. Le calcul du taux d'éclosion est donné par la formule suivante :

$$\text{Eclosion \%} = \frac{(\text{Nombre d'œufs éclos})}{(\text{nombre total d'œufs fertiles incubés})} \times 100$$

2.6.1.4 Taux de mortalité

La mortalité embryonnaire correspond aux œufs fécondés qui n'ont pas pu éclore et donc ceux à qui l'embryon est mort au cours de l'incubation, il est donné par la formule suivante :

$$\text{Mortalité \%} = \frac{(\text{Nombre d'œufs fertiles incubés} - \text{nombre d'œufs éclos})}{\text{Nombre d'œufs fertiles incubés}} \times 100$$

(Santos *et al.*, 2018)

2.7 Analyse statistique

Les résultats sont présentés dans des tableaux grâce à l'utilisation du logiciel Statview. Seules les statistiques descriptives sont réalisées dans le présent travail.



Chapitre III

Résultats et discussion

3.1 Résultats de la première expérience

Pendant cette expérience et en raison d'une solubilité insuffisante de la solution de vitamine E acétate, nous estimons que pendant l'application *in-ovo* de celle-ci, les doses de Vit E act injectées peuvent ne pas être égales dans tous les œufs. Nous avons remarqué pendant l'injection de la Vit E act que celle-ci s'accumule à la surface du tube ou se colle à ses parois. Ceci suppose que la solution n'est pas homogène et que le volume injecté peut contenir des concentrations différentes de Vit E act ou des fois être uniquement composé d'eau physiologique. Même pendant l'injection, on a constaté que des résidus importants de Vit E act se sont accumulés dans la micropipette. Ceci nous a donc poussés à utiliser du PEG pour la solubilisation de de la Vit E act dans l'E2.

Tableau (3) : Pourcentages d'éclosion, de mortalité et de mortalité par stade embryonnaire des œufs de *Coturnix japonica* traités par injection *in-ovo* à J+9

| Traitement | Eclosion (%) | Mortalité (%) | (%) MEP | (%) MEI | (%) MET |
|----------------|--------------|---------------|-----------|-----------|-----------|
| C (-) | 84,38 | 16,62 | 0 | 20 | 80 |
| C (+) | 90,32 | 9,68 | 0 | 50 | 50 |
| Vit E α | 79,17 | 20,83 | 40 | 0 | 60 |
| Vit E act | 92 | 8 | 50 | 0 | 50 |

MEP : Mort embryonnaire précoce ; **MEI** : Mort embryonnaire intermédiaire ; **MET** : Mort embryonnaire tardive.

Dans la présente étude le taux d'éclosion du groupe Vit E act s'est révélé être le meilleur avec 92% en accord avec son faible taux de mortalité de 8%. Par rapport au groupes Vit E α et C(-) avec 20,83 % et 16,62% respectivement. Cependant le taux de MEP de la Vit E act est le plus élevé (50%) mais sans MEI alors que les MET sont d'une valeur égale à celle du C(+) qui est en même temps la plus faible des valeurs, à 50%. D'autre part, le taux d'éclosion du groupe Vit E α est le plus faible (79,17%) un taux de mortalité de 20,83%. Le taux de MEP de 40% reste plus bas que celui de Vit E act. Une valeur de 60% de MET est observée mais qui reste plus élevée que celle de la Vit E act et C(+) avec 50% toutefois plus faible que celle de du groupe C(-) avec 80%.

Tableau (4) : Pourcentages du poids relatif à l'éclosion et la perte en poids des œufs de *Coturnix japonica* traités par injection *in-ovo* à J+9

| Traitement | (%) Poids Relatif à l'Éclosion | (%) de la perte en poids |
|----------------|--------------------------------|--------------------------|
| C (-) | 68,73 | 31,27 |
| C (+) | 63,89 | 36,11 |
| Vit E α | 67,88 | 32,12 |
| Vit E act | 64,56 | 35,44 |

En ce qui concerne le poids relatif à l'éclosion du C(-), il s'avère être le plus élevé (68,73%) qui se traduit par le plus faible taux de perte de poids (31,27 %) comparé au reste des groupes. Le poids relatif à l'éclosion du groupe Vit E α a enregistré le taux le plus élevé (67,88%) comparé au groupe Vit E act qui est de 64,56% reflétant les résultats du taux de perte en poids où celui de la Vit E α est plus faible que pour la Vit E act (32,12% et 35,44%) respectivement. En outre le poids relatif à l'éclosion du C(+) a enregistré la valeur la plus basse avec 63,89% et un taux de perte en poids le plus élevé avec 36,11%.

3.2 Résultats de la deuxième expérience

Tableau (5) : Pourcentages d'éclosion, de mortalité et de mortalité par stade embryonnaire des œufs de *Coturnix japonica* traités par injection *in-ovo* à J+9 :

| Traitement | (%) Eclosion | (%) Mortalité | (%) MEP | (%) MEI | (%) MET |
|------------------------|--------------|---------------|--------------|-----------|--------------|
| C (-) | 86,36 | 13,64 | 66,67 | 0 | 33,33 |
| C (+) | 90,9 | 9,1 | 0 | 66,67 | 33,33 |
| Vit C | 90 | 10 | 50 | 0 | 50 |
| Vit E α | 57,14 | 42,86 | 0 | 33,33 | 66,67 |
| Vit E act | 50 | 50 | 10 | 70 | 20 |
| Vit E α + Vit C | 27,78 | 72,22 | 7,69 | 69,23 | 23,08 |

MEP : Mort embryonnaire précoce ; **MEI** : Mort embryonnaire intermédiaire ; **MET** : Mort embryonnaire tardive.

Les différentes solutions administrées *in-ovo* ont permis une augmentation du taux d'éclosion de 90,9% et une réduction du taux de mortalité totale de 9,1% chez le groupe C(+) comparé au reste des groupes, alors qu'on remarque une absence des MEP dans le groupe C(+)

et ses MEI sont supérieures au MET. La Vit C à un taux d'éclosion de 90% très proche du C(+) par rapport au deux groupes (Vit E et Vit E α + Vit C). Cette augmentation est accompagnée par une baisse de mortalité totale de 10%, on constate aussi que les MEP de Vit C est supérieure à celle du C(-) mais c'est le contraire pour les MET. Dans le groupe Vit E α on distingue un taux d'éclosion plus élevé avec 57,14% comparé à la Vit E act dont la valeur est de 50%, toutefois leur taux de mortalité totale sont de 42,86% et 50% respectivement. La différence est aperçu au niveau des différents stades de mortalité où on observe que les MEP et MEI du groupe Vit E act sont supérieures à celle de la Vit E α tandis que les MET restent inférieures à celle de Vit E α . Pour ce qui est de l'association en termes de taux d'éclosion il est le plus faible avec 27,28% ce qui renvoi à sa supériorité en taux de mortalité totale comparé au reste des groupes. On aperçoit également une augmentation du MEI de Vit E α + Vit C par rapport au MEI de Vit E α et Vit C contrairement au MET de Vit E α + Vit C ; celui-ci est inférieur aux MET de Vit E α et Vit C.

Tableau (6) : pourcentages du poids relatif à l'éclosion et la perte en en poids de *Coturnix japonica* traité par injection *in-ovo* à J+9 :

| Traitement | (%) Poids Relatif à l'Éclosion | (%) de Perte en Poids |
|------------------------|--------------------------------|-----------------------|
| C (-) | 66,32 | 33,68 |
| C (+) | 67,95 | 32,05 |
| Vit C | 68 | 32 |
| Vit E α | 72,13 | 27,87 |
| Vit E act | 70 | 30 |
| Vit E α + Vit C | 66,85 | 33,15 |

Pour le poids relatif, le C(+) enregistre un taux presque égale à celui de la Vit C (68%) mais supérieur au C(-), ce qui reste en corrélation avec les résultats obtenus en termes de perte en poids où on remarque que le taux reste inférieur chez le groupe Vit C et C(+) par rapport au C(-). Par ailleurs la Vit E α a donné un taux de poids relatif de 72,13% supérieur à la Vit E act avec 70% ce qui explique les valeurs retrouvées pour la perte en poids. En effet, la Vit E α affiche un taux inférieur à la Vit E act et au C(-). D'autre part, le taux du poids relatif de Vit E α + Vit C est de 66,85%, plus faible que celui des Vit C et Vit E α toujours en relation avec la supériorité du taux de perte en poids.

3.3 Discussion

3.3.1 Eclosion et mortalité

Le processus d'éclosion est considéré comme une période de stress chez la volaille. Par conséquent, l'amélioration des défenses antioxydantes au cours du développement embryonnaire pourrait potentiellement augmenter son taux. Les résultats de l'injection *in-ovo* obtenus lors de notre expérience ont montré une augmentation du taux d'éclosion chez le groupe Vit C par rapport au C(-) en accord avec les résultats de **Soltani *et al.*, (2019)** où ils ont trouvé une augmentation de l'éclosion après avoir administré 6mg de Vit C à J+15 d'incubation dans l'amnios des poulets de chair. **Zakaria *et al.*, (1996)** ont rapporté également une amélioration de l'éclosion en injectant 3mg pendant la dernière phase d'incubation. Le meilleur taux d'éclosion signalé à ce jour est celui de **Nowaczaewski *et al.*, (2012)** après l'injection de 6mg de Vit C aux 11ème ou 15ème jour d'incubation pour la poule et 8mg au 20ème jour d'incubation pour la cane. **Tullet *et al.*, (1990)** a justifié cette augmentation par l'influence de Vit C sur les modifications du métabolisme des glandes surrénales et l'inhibition de la synthèse de la 21-hydroxylase et 11-betahydroxylase car ce sont des enzymes qui jouent un rôle actif dans la production de corticostérone qui à son tour est assez active dans la gluconéogenèse soutenant la production d'énergie pendant la période d'adaptation aux nouvelles conditions comme le stress thermique durant la dernière période d'incubation. Cependant, si le niveau de cette hormone est excessivement élevé dans le sang pendant longtemps elle peut exercer un effet cytotoxique sur l'organisme et cela en réduisant l'état de santé du poussin d'où la diminution de l'éclosion. Les résultats du présent travail sont différents de ceux de **Zhang *et al.*, (2018)** qui ont observé que les différentes doses de Vit C (0.5, 1.5, 4.5, 13.5 UI) injectées *in-ovo* n'ont eu aucune influence sur l'éclosion des poulets de chair. D'autres facteurs peuvent jouer également sur le pourcentage de l'éclosion, comme le facteur de l'âge des poules pondeuses car si ces dernières sont jeunes leurs œufs présentent un taux d'éclosion plus élevée comparé aux œufs pondus par des poules plus âgées (**Almeinda *et al.*, 2008**).

L'augmentation des MET du groupe de Vit C comparé au groupe C(-) sans pour autant diminuer le taux d'éclosion est probablement due à la dose relativement élevée de Vit C. La période d'injection (J+9) et le site d'injection (la chambre à air) peuvent également influencer les MET. Les résultats rapportés par **Selim *et al.*, (2012)** sont similaires à ceux du présent travail. **Zakaria & Al-latif, (1998)** a également démontré que des doses faibles ou excessivement élevées de Vit C peuvent aggraver le taux des MET.

Les résultats d'éclosion de la Vit E α sont inférieurs aux C(-) et ceci renvoie à la présomption d'une mauvaise injection probablement causée par la concentration accrue de la solution. Car des recherches ont prouvé que l'utilisation de la Vit E α *in-ovo* minimise les effets nocifs de l'acrylamide qui est un composé organique formé en quantité importante lors du stress thermique, et influence l'activité de l'acétylcholinestérase et peut aussi minimiser la concentration des MDA (**Kopanska et al., 2022**). Pour appuyer notre hypothèse relative à l'effet de la concentration en Vit E α , les résultats obtenus par (**Surai et al., 1999**) ont montré qu'une concentration accrue de Vit E dans les tissus embryonnaires de poulet était associée à une diminution de la sensibilité des tissus à la peroxydation des lipides. De ce fait une augmentation du taux des radicaux libres et RNS se produit pendant le temps d'éclosion, issus naturellement de l'activité métabolique du corps et leurs capacités réactives les rendent capables d'endommager l'ADN, les protéines, les lipides et les glucides (**Surai. 2002 et 2007**).

Les résultats de MET du groupe de Vit E α sont en accord avec les résultats de **Al-Shamery et al., (2015)** qui ont trouvé qu'une supplémentation de 0.5UI de vitamine E porte préjudice à l'embryon d'où le grand nombre de mortalités embryonnaires tardives. Cependant l'augmentation des MEI vers MET nous confirme que l' α -tocophérol est facilement oxydé (**Surai et al., 2016**) et les réserves de vitamine E dans l'organisme ne sont pas suffisantes pour répondre aux besoins à long terme (**Surai et al., 1999**). **Surai et al., (2002)**, soulignent que la plus forte concentration de vitamines E se trouve dans le foie au moment de l'éclosion et son accumulation est considérée comme un mécanisme adaptatif fournissant des antioxydants comme un moyen de défense au moment critique de l'éclosion. Nos résultats nous emmènent à penser également que l'éclosion a stressé les cailleteaux et a induit la formation de radicaux libres d'une manière abondante.

Les résultats d'éclosion du groupe de Vit E act sont différents de ceux de **Selim et al., (2012)**. Leur solution est composée de 10mg de vitamine E et de 0.1ml d'huile de maïs injectés dans des œufs de canard de barbarie à J+12 d'incubation, ce qui a donné un taux d'éclosion élevé. Ceci prouve la capacité de la vitamine E à réduire le taux de radicaux libres. (**Cherian. 1992 et 1997**) en protégeant les protéines et les lipides de l'oxydation.

Cependant, **Yilmaz et al., (2020)** ayant injecté 30mg de vitamine E dans des œufs de poule à J+16 ont rapporté l'absence d'effets sur l'éclosion et donc ils jugent que la supplémentation en antioxydants exogènes pendant la période embryonnaire n'est pas nécessaire.

Les résultats liés aux MET du groupe de Vit E act sont en accord avec ceux de **Al-Shamery et al., (2015)** qui signalent une diminution du taux de mortalité en injectant 1.5 mg de vitamine E. Ils expliquent cette diminution par la participation de cette vitamine à la prévention de l'oxydation des phospholipides qui participe à la croissance et le développement du tissu cérébral et d'autres tissus (**Bhanja et al., 2007**).

Toutefois le taux d'éclosion de l'association Vit C + Vit E α est le plus faible. Ces résultats sont peut-être dus à la concentration trop élevée de l'un des composants ou au site d'injection qui n'était pas adapté. Les résultats de l'éclosion du groupe de Vit E act étaient bien meilleurs que ceux de l'association ce qui nous pousse à considérer que la prévention de la Vit E act contre la peroxydation lipidique est plus efficace que celle de l'association. Cependant l'effet synergique rapporté par **Surai et al., (2002)** pour les deux vitamines C et E est observé sur les taux de MEI et de MET qui ont baissé considérablement comparés aux groupes d' α -tocophérol et Vit C individuellement. Cette synergie est rapportée par **Altani et al., (2017)** qui indiquent une augmentation de l'activité de SOD et la diminution du taux de MDA pour le groupe injecté avec les deux vitamines. Ceci indique un changement de l'équilibre antioxydant/prooxydant et appuis l'hypothèse qu'une co-administration des vitamines E et C serait plus efficace que l'administration individuelle des deux vitamines.

3.3.2 Poids relatif et perte en poids

Les résultats obtenus ont révélé que les cailleteaux des œufs injectés avec de la Vit C présentent des poids corporels plus élevés que ceux du groupe C(-) et ceci est en accord avec les résultats de **Zakaria et al., (1998) & Zakaria et al., (2001)**. Ces derniers ont noté que l'injection *in-ovo* de 3mg de Vit C à J+15 a entraîné une augmentation du poids corporel des males en raison du rôle de la Vit C pendant l'incubation mais aussi durant la croissance ultérieure (**Homig & Frigg, 1979**).

AL-Hamed et al., (2019) ont suggérés qu'une augmentation de la perte en poids est probablement due au changement de caractéristiques de la coquille et en raison de l'interaction de celle-ci avec la vitamine C. Cette dernière a peut être augmenté la conductivité poreuse du cortex, qui était nécessaire au passage des gaz et de la vapeur d'eau pendant la période d'incubation. Nos résultats ne s'accordent pas avec ces explications car notre taux de perte en poids est plus bas que celui du C(-), on suggère que la raison serait dû à la concentration élevée de la Vit C injectée, celle-ci a dû causer des altérations dans la coquille.

Concernant les résultats du poids relatif des deux groupes, Vit E act et Vit E α , ils restent les plus élevés, et ceci est en accord avec les résultats de **Al-Shamery et al., (2015)**. Avec une injection de 1.5mg de vitamine E, leur résultats sont similaires aux nôtres et cela revient à l'augmentation de la teneur en vitamine E de l'œuf, par conséquent la Vit E sera exploitée par l'organisme durant le développement et la croissance (**Surai et al., 1999**).

Schaal et al., (2008) ont également appuyé le fait que l'injection *in-ovo* de Vit E α améliore la croissance embryonnaire, elle donne un meilleur poids relatif et une valeur réduite de perte en poids. Ils supposent que la Vit E α est facilement oxydée et ne peut être stockée, cependant sa présence est quand même dominante dans le jaune d'œuf (90%) (**Surai et al., 1999**). Pour ce qui concerne le poids relatif et la perte en poids, nos résultats sont en accord avec ceux de Schaal et al, ou une supplémentation en Vit E α a augmenté le poids et a minimisé les pertes grâce à ses propriétés antioxydantes mentionnées précédemment. Il faut noter également que les protéines de transport α -TTP ont une plus grande affinité à la Vit E α comparé aux autres vitamines (**Kopańska et al., 2019**) ce qui lui donne un avantage, comparé à la Vit E act.

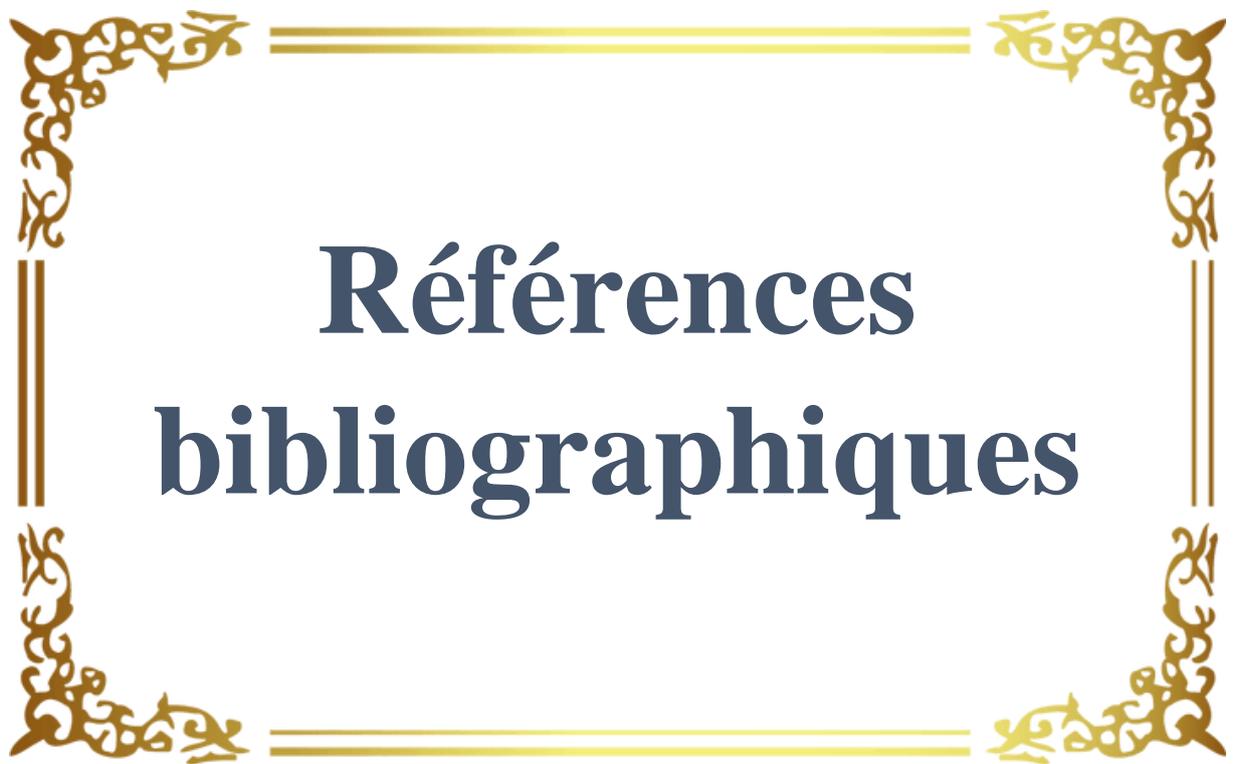
Pour le poids relatif et la perte en poids du groupe Vit E α + Vit C, les résultats obtenus sont meilleurs que ceux du témoin C(-) mais restent toujours inférieurs à ceux des groupes traités à la Vit C et à la Vit E α injectés individuellement. On suggère que la raison de cette infériorité est due à la concentration de l'un ou des deux composants. La solution de Vit E α + Vit C est la plus visqueuse de toutes les solutions injectées, par conséquent on peut supposer que celle-ci a bouché les pores de la chambre à air qui permet les échanges gazeux avec l'embryon. Cette hypothèse peut également justifier la cause pour laquelle ce groupe a le taux d'éclosion le plus bas. Dans une étude concernant la supplémentation par régime alimentaire **Morrissey et al., (1997)** ont montré que la supplémentation en Vit E α dans le régime alimentaire des poulets augmente les concentrations tissulaires de l' α -tocophérol tout en diminuant nettement la concentration en MDA. **Sahin et al., (2001)** a également confirmé cette hypothèse en ajoutant une association des deux vitamines (200mg de Vit C et 250mg de Vit E act) dans le régime alimentaire de la caille japonaise. Ils ont rapporté que les cailles avaient de meilleures performances en plus d'améliorer les caractéristiques de la carcasse et de la digestibilité. Ils soutiennent ainsi l'idée que le potentiel des deux antioxydants associés est plus efficace par rapport aux vitamines administrées individuellement.



Conclusion

Conclusion

L'objectif principale de notre étude était de démontrer la présence d'une synergie efficace entre la vitamine E et la vitamine C contre le stress oxydatif, et de prouver qu'une supplémentation *in-ovo* des deux vitamines au même temps donnerait un résultat supérieur comparé aux groupes de contrôles (+) et (-) et aux groupes contenant une seule vitamine à la fois. Cependant nous avons constaté que l'injection *in-ovo* de l'association de Vitamine E α + Vitamine C à une concentration de 1 mg de vitamine C et 3 mg de vitamine E à J+9 d'incubation dans la chambre à air des œufs de cailles japonaise *Coturnix japonica* n'a eu aucun impact significatif sur l'éclosion, le poids relatif et sur la perte en poids. Toutefois les taux de mortalités embryonnaires tardives réduits comparés aux autres groupes peuvent indiquer la présence de l'effet synergique entre les deux vitamines. En règle générale les antioxydants ont des propriétés de protection et de prévention contre les radicaux libres dans le métabolisme en les convertissant en molécules moins réactives ou en empêchant ou retardant leur oxydation. La supplémentation en vitamine C et vitamine E en *in-ovo* a pour but non seulement d'établir un équilibre antioxydant/prooxydant mais également d'accroître le taux d'éclosion et les caractéristiques de la carcasse comme le poids et de diminuer la perte en poids pendant l'incubation. Nous avons pu démontrer, les effets positifs de chaque vitamine lorsqu'elle est injectée seule, l'injection de la vitamine C a donné un résultat positif en ce qui concerne l'éclosion et l'injection de la vitamine E α a le pourcentage de perte en poids le plus faible. Néanmoins nous n'avons pas réussi à prouver la présence d'un effet synergique lors de l'association des deux vitamines C et E. À cet égard il est indispensable d'élargir cette recherche dans le futur en incluant la mesure d'autres paramètres notamment hématologiques. Le protocole expérimentale doit être également affiné afin d'aboutir aux résultats escomptés, Il faut particulièrement revoir les concentrations des différentes solutions ou trouver un autre moyen de solubilisation.



**Références
bibliographiques**

Références bibliographiques :

A

- Abidin, Z., & Khatoon, A. (2013). Heat stress in poultry and the beneficial effects of ascorbic acid (vitamin C) supplementation during periods of heat stress. *World's Poultry Science Journal*, 69(1), 135-152.
- AL-Hamed, A. M., & AL-Eshaki, A. M. (2019). The effect of immersion and spray of hatching eggs with vitamin c in hatchability and productive performance of quail progeny. *Mesopotamia Journal of Agriculture*, 47(3).
- Al-Shamery, N. J., & Al-Shuhaib, M. B. S. (2015). Effect of in ovo injection of various nutrients on the hatchability, mortality ratio and weight of the broiler chickens. *IOSR Journal of Agriculture and Veterinary Science*, 8(2), 30-33.
- ALTAN, Ö., AÇIKGÖZ, Z., BAYRAKTAR, Ö. H., KÖSE, F. A., TUĞALAY, Ç. Ş, & POURDOLATİ, O. (2017). İn ovo Vitamin C ve E Enjeksiyonunun Isı Stresine Maruz Kalan Etlik Piliçlerde Gelişme Performansı ve Oksidatif Stabilitite Üzerine Etkileri. *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 54(3), 259-266.
- Ainsworth, S. J., Stanley, R. L., & Evans, D. J. (2010). Developmental stages of the Japanese quail. *Journal of Anatomy*, 216(1), 3-15
- Arain, M. A., Nabi, F., Marghazani, I. B., Hassan, F. U., Soomro, H., Kalhorro, H., & Buzdar, J. A. (2022). In ovo delivery of nutraceuticals improves health status and production performance of poultry birds: a review. *World's Poultry Science Journal*, 1-24
- Araújo, I. C., Café, M. B., Noletto, R. A., Martins, J. M., Ulhoa, C. J., Guareshi, G. C., ... & Leandro, N. S. (2019). Effect of vitamin E in ovo feeding to broiler embryos on hatchability, chick quality, oxidative state, and performance. *Poultry Science*, 98(9), 3652-3661.

B

- BAL, A. 2009. In ovo vaccination against coccidiosis. *Poult. World* 25:1–2
- Beaumont, A. (1970). *Travaux pratiques de biologie animale*.
- Beijersbergen van Henegouwen G, Junginger H, de Vries H (1995). "Hydrolysis of RRR-alpha-tocopheryl acetate (vitamin E acetate) in the skin and its UV protecting activity (an in vivo study with the rat)". *J Photochem Photobiol B*. 29 (1): 45–51
- Bhanja, S.K., Mandal A.B., Agarwal S.K., Majumdar S. and Bhattacharyya A. 2007. Effect of in ovo injection of vitamins on the chick weight and post-hatch Growth performance in broiler chickens. *World poultry Science Association, Proceedings of the 16th European Symposium on poultry Nutrition, India*
- Bello, A., W. Zhai, P. D. Gerard, and E. D. Peebles. 2013. Effects of the commercial in ovo injection of 25-hydroxycholecalciferol on the hatchability and hatching chick quality of broilers. *Poult. Sci.* 92:2551–2559.
- Bello, A., W. Zhai, P. D. Gerard, and E. D. Peebles. 2014c. Effects of the commercial in ovo injection of 25-hydroxycholecalciferol on broiler posthatch performance and carcass characteristics. *Poult. Sci.* 93:155–162.
- Bello, A., M. Nascimento, N. Pelici, S. K. Womack, W. Zhai, P. D. Gerard, and E. D. Peebles. 2015. Effects of the in ovo injection of 25-hydroxycholecalciferol on the yolk and serum characteristics of male and female broiler embryos. *Poult. Sci.* 94:734–739.

- Bertinato, J., Hidirolou, N., Peace, R., Cockell, K. A., Trick, K. D., Jee, P., ... & L'Abbé, M. R. (2007). Sparing effects of selenium and ascorbic acid on vitamin C and E in guinea pig tissues. *Nutrition Journal*, 6(1), 1-9.
- Bruno, R. S., Leonard, S. W., Atkinson, J., Montine, T. J., Ramakrishnan, R., Bray, T. M., & Traber, M. G. (2006). Faster plasma vitamin E disappearance in smokers is normalized by vitamin C supplementation. *Free Radical Biology and Medicine*, 40(4), 689-697.
- Bruttman, G., Crasborn, J., Christian K. A et Sainte-Laudy., (2013). Et si les personnes allergiques devaient leur salut aux œufs de cailles ?

C

- Cherian, G. E. E. T. H. A., & Sim, J. S. (1997). Egg yolk polyunsaturated fatty acids and vitamin E content alters the tocopherol status of hatched chicks. *Poultry Science*, 76(12), 1753-1759.
- CHERIAN, G., & SIM, J. (1992). Preferential accumulation of n-3 fatty acids in the brain of chicks from eggs enriched with n-3 fatty acids. *Poultry Science*, 71(10), 1658-1668.
- Cinar, M., Yildirim, E., Yigit, A. A., Yalcinkaya, I., Duru, O., Kisa, U., & Atmaca, N. (2014). Effects of dietary supplementation with vitamin C and vitamin E and their combination on growth performance, some biochemical parameters, and oxidative stress induced by copper toxicity in broilers. *Biological trace element research*, 158(2), 186-196.

D

- Doba, T., Burton, G. W., & Ingold, K. U. (1985). Antioxidant and co-antioxidant activity of vitamin C. The effect of vitamin C, either alone or in the presence of vitamin E or a water-soluble vitamin E analogue, upon the peroxidation of aqueous multilamellar phospholipid liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, 835(2), 298-303.
- DROR, Y., & BARTOV, I. (1982). Dietary factors affecting experimental models of nutritional encephalomalacia. *Poultry science*, 61(1), 84-93.

E

- ELİBOL, O., TÜRKOĞLU, M., AKAN, M., & EROL, H. (2001). Effects of ascorbic acid injection during incubation on the hatchability of large broiler eggs. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, 25(3), 245-248
- El-Kholy, M. S., Ibrahim, Z. A. E. G., El-Mekkawy, M. M., & Alagawany, M. (2019). Influence of in ovo administration of some water-soluble vitamins on hatchability traits, growth, carcass traits and blood chemistry of Japanese quails. *Annals of Animal Science*, 19(1), 97-111.

F

- Bruno, R. S., Leonard, S. W., Atkinson, J., Montine, T. J., Ramakrishnan, R., Bray, T. M., & Traber, M. G. (2006). Faster plasma vitamin E disappearance in smokers is

normalized by vitamin C supplementation. *Free Radical Biology and Medicine*, 40(4), 689-697.

- Ferguson, M. W., & Deeming, D. C. (Eds.). (1991). *Egg incubation: its effects on embryonic development in birds and reptiles*. Cambridge University Press.
- FOYE, O.T., 2005: The biochemical and molecular effects of amnionic nutrient administration, “in ovo feeding” on intestinal development and function and carbohydrate metabolism in turkey embryos and poults. Ph.D. Dissertation. North Carolina State University. Raleigh, NC

G

- Givisiez, P. E., Moreira Filho, A. L., Santos, M. R., Oliveira, H. B., Ferket, P. R., Oliveira, C. J., & Malheiros, R. D. (2020). Chicken embryo development: Metabolic and morphological basis for in ovo feeding technology. *Poultry Science*, 99(12), 6774-6782.
- Gore, A. B., & Qureshi, M. A. (1997). Enhancement of humoral and cellular immunity by vitamin E after embryonic exposure. *Poultry Science*, 76(7), 984-991.

Guilland, J. C. (2011). Les interactions entre les vitamines A, D, E et K : synergie et/ou compétition. *Oléagineux, Corps gras, Lipides*, 18(2), 59-67.

H

- Hajati, H., Hassanabadi, A., Golian, A., Nassiri-Moghaddam, H., & Nassiri, M. R. (2014). The effect of in ovo injection of grape seed extract and vitamin C on hatchability, antioxidant activity, yolk sac weight, performance and ileal micro flora of broiler chickens. *Research Opinions in Animal and Veterinary Sciences*, 4(12), 633-638.
- Hassan. M.Amal. (2018). Effect of in Ovo injection with Nano- Selenium or Nano- Zinc on Post-Hatch Growth Performance and Physiological Traits of Broiler Chicks. *International Journal of Environment Agriculture and Biotechnology* Vol-3, Issue2.doi.org/10.22161/3.2.6. 350.
- Heller, R., Werner-Felmayer, G., & Werner, E. R. (2006). Antioxidants and endothelial nitric oxide synthesis. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 62(1), 21-28.
- Hornig, D. (1979). Effect of age on biosynthesis of ascorbate in chicks.

I

- Iqbal, M., Cawthon, D., Wideman Jr, R. F., & Bottje, W. G. (2001). Lung mitochondrial dysfunction in pulmonary hypertension syndrome. II. Oxidative stress and inability to improve function with repeated additions of adenosine diphosphate. *Poultry Science*, 80(5), 656-665.

J

- Jacob, R. A. (1995). The integrated antioxidant system. *Nutrition research*, 15(5), 755-766.

K

- Kadhim, A. H., Al-Jebory, H. H., Ali, M. A., & Al-Khafaji, F. R. (2021, November). Effect of Early Feeding (in Ovo) With Nano-Selenium and Vitamin E on Body Weight and Glycogen Level in Broiler Chickens Exposed to Fasting Condition. In IOP Conference Series: Earth and Environmental Science (Vol. 910, No. 1, p. 012009). IOP Publishing.
- Kontecka, H., Nowaczewski, S., Ksiązkiewicz, J., & Rosinski, A. (2006). The effect of supplementing feed with vitamin C on the haematological indices of ducks and their offspring. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 15(3), 455.
- Kopańska, M., Batoryna, M., Banaś-Ząbczyk, A., Błajda, J., & Lis, M. W. (2022). The Effect of α -Tocopherol on the Reduction of Inflammatory Processes and the Negative Effect of Acrylamide. *Molecules*, 27(3), 965.
- Kucharska-Gaca, J., E. Kowalska, and M. Debowska. 2017. In ovo feeding-technology of the future-a review. *Ann. Anim. Sci.* 17:979–992

L

- Lucotte G., 1975- L'élevage de la caille (Précis de coturniculteur). Ed. Vigot Frères, 82p.601

M

- Maurice, D. V., Lightsey, S. F., & Toler, J. E. (2004). Ascorbic acid biosynthesis in hens producing strong and weak eggshells. *British poultry science*, 45(3), 404-408.
- Menasse V., 1986 - Elevage rentable des cailles. Ed. de vecchi. 125p
- Michel protais(2010)livre : Science et technologie de l'œuf –production et qualité volume 1 FrancoireNau , catherine Guérin –Dubiard florence Baron jean-louisthapon 67-71.
- Mohmond T. H., Coleman T.H., 1967 - A comparison of the proportion of component parts of Bobwhite and Coturnix eggs. *Poult. Sci.*, 46, 1168-1171.
- Moreau, R. E. (1951). The British status of the quail and some problems of its biology. *British Birds*, 44(8), 257-276
- Morrissey, P. A., Brandon, S., Buckley, D. J., Sheehy, P. J. A., & Frigg, M. (1997). Tissue content of α -tocopherol and oxidative stability of broilers receiving dietary α -tocopheryl acetate supplement for various periods pre-slaughter. *British Poultry Science*, 38(1), 84-88.

N

- Nakamura, Y. K., & Omaye, S. T. (2008). α -Tocopherol modulates human umbilical vein endothelial cell expression of Cu/Zn superoxide dismutase and catalase and lipid peroxidation. *Nutrition research*, 28(10), 671-680.
- Niki E, Saito T, Kawakami A, Kamiya Y. Inhibition of oxidation of methyl linoleate in solution by vitamin E and vitamin C. *J Biol Chem* 1984 ; 259 : 4177-82.

- Niki, E., Tsuchiya, J., Tanimura, R., & Kamiya, Y. (1982). Regeneration of vitamin E from α -chromanoxyl radical by glutathione and vitamin C. *Chemistry Letters*, 11(6), 789-792.
- Nouri, S., J. G. Ghalehkandi, S. Hassanpour, and H. AghdamShahryar. 2017. Effect of in ovo feeding of folic acid on subsequent growth performance and blood constituents levels in broilers. *Int. J. Pept. Res. Ther.* doi 10.1007/s10989-017-9629-x
- Nowaczewski, S., Kontecka, H., & Krystianiak, S. (2012). Effect of in ovo injection of vitamin C during incubation on hatchability of chickens and ducks. *Folia biologica (Kraków)*, 60(1-2), 93-97

P

- Padgett, Carol Smith, and William D. Ivey. "(1960) The normal embryology of the Coturnix quail." *The Anatomical Record* 137.1: 1-11.
- Panda, A. K., & Cherian, G. (2014). Role of vitamin E in counteracting oxidative stress in poultry. *The Journal of Poultry Science*, 51(2), 109-117.
- PARDUE, S. L., THAXTON, J.P., and J. BRAKE (1985) Role of ascorbic acid in chicks exposed to high environmental temperatures. *J. App. Physiol* 58: 1511-1516.
- Peebles, E. D. (2018). In ovo applications in poultry: a review. *Poultry science*, 97(7), 2322-2338.
- Plantinga, Y., Ghiadoni, L., Magagna, A., Giannarelli, C., Franzoni, F., Taddei, S., & Salvetti, A. (2007). Supplementation with vitamins C and E improves arterial stiffness and endothelial function in essential hypertensive patients. *American journal of hypertension*, 20(4), 392-397.

R

- Rengaraj, D., & Hong, Y. H. (2015). Effects of dietary vitamin E on fertility functions in poultry species. *International journal of molecular sciences*, 16(5), 9910-9921.

S

- Sahin, K., Sahin, N., & Yaralioglu, S. (2002). Effects of vitamin C and vitamin E on lipid peroxidation, blood serum metabolites, and mineral concentrations of laying hens reared at high ambient temperature. *Biological trace element research*, 85(1), 35-45.
- Sahin, K., Sahin, N., Onderci, M., Gursu, M. F., & Issi, M. (2003). Vitamin C and E can alleviate negative effects of heat stress in Japanese quails. *Food, Agriculture and Environment*, 1(2), 244-49.
- Salonen, J. T., Nyssönen, K., Salonen, R., Lakka, H. M., Kaikkonen, J., Porkkala-Sarataho, E., ... & Poulsen, H. E. (2000). Antioxidant Supplementation in Atherosclerosis Prevention (ASAP) study: a randomized trial of the effect of vitamins E and C on 3-year progression of carotid atherosclerosis. *Journal of internal medicine*, 248(5), 377-386.
- Santos, E. T., Sgavioli, S., Castiblanco, D. M. C., Domingues, C. H. D. F., Quadros, T. C. O. D., Borges, L. L., ... & Baraldi-Artoni, S. M. (2018). Glycosaminoglycans and vitamin C in ovo feeding affects bone characteristics of chicks. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 47.

- Sauveur, B. (1988). Reproduction des volailles et production d'ufs. Reproduction des volailles et production d'ufs, 1-476.
- Schaal, T. P. (2008). The Effects of in ovo feeding of fatty acids and antioxidants on broiler chicken hatchability and chick tissue lipids
- Selim, S. A., Gaafar, K. M., & El-ballal, S. S. (2012). Influence of in-ovo administration with vitamin E and ascorbic acid on the performance of Muscovy ducks. Emirates Journal of Food and Agriculture.
- Shakeri, M., Oskoueian, E., Le, H. H., & Shakeri, M. (2020). Strategies to combat heat stress in broiler chickens: unveiling the roles of selenium, vitamin E and vitamin C. Veterinary sciences, 7(2), 71.
- Sharma, J. M., and B. R. Burmester. 1982. Resistance of Marek's disease at hatching in chickens vaccinated as embryos with the turkey herpesvirus. Avian Dis. 26:134–149.
- Sharma, J. M., L. F. Lee, and P. S. Wakenell. 1984. Comparative viral, immunologic, and pathologic responses of chickens inoculated with herpesvirus of turkeys as embryos of at hatch. Am. J. Vet. Res. 45:1619–1623.
- Sharma, J. M., and R. L. Witter. 1983. Embryo vaccination against Marek's disease with serotypes 1, 2, and 3 vaccines administered singly or in combination. Avian Dis. 27:453–463.
- Shojadoost, B., Yitbarek, A., Alizadeh, M., Kulkarni, R. R., Astill, J., Boodhoo, N., & Sharif, S. (2021). Centennial Review: Effects of vitamins A, D, E, and C on the chicken immune system. Poultry Science, 100(4), 100930.
- Simons, L. A., Von Konigsmark, M., Simons, J., Stocker, R., & Celermajer, D. S. (1999). Vitamin E ingestion does not improve arterial endothelial dysfunction in older adults. Atherosclerosis, 143(1), 193-199.
- Soltani, T., Salarmoini, M., Afsharmanesh, M., & Tasharrofi, S. (2019). The Effects of In ovo Injection of Ascorbic Acid on Hatchability, Growth Performance, Intestinal Morphology, and Tibia Breaking Strength in 36h Post Hatch Fasted Broiler Chickens. Poultry Science Journal, 7(1), 43-49
- Srivastava, S., Phadke, R. S., Govil, G., & Rao, C. N. R. (1983). Fluidity, permeability and antioxidant behaviour of model membranes incorporated with α -tocopherol and vitamin E acetate. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 734(2), 353-362.
- Surai, P. F., Fisinin, V. I., & Karadas, F. (2016). Antioxidant systems in chick embryo development. Part 1. Vitamin E, carotenoids and selenium. Animal Nutrition, 2(1), 1-11.
- Surai, P. F. (2002). Natural antioxidants in avian nutrition and reproduction (pp. 5-9). Nottingham: Nottingham University Press.
- Surai, P. F. (2002). Natural antioxidants in avian nutrition and reproduction (pp. 5-9). Nottingham: Nottingham University Press.
- Surai, P. F. (1999). Vitamin E in avian reproduction. Poultry and avian biology reviews, 10, 1-60.

- Surai, P. F. (2007, August). Natural antioxidants in poultry nutrition: new developments. In Proceedings of the 16th European symposium on poultry nutrition (pp. 26-30). Apeldoorn, The Netherlands: World Poultry Science Association.

T

- Tappel, A. L., 1970. Biological antioxidant protection against lipid peroxide damage. *Am J. Clin. Nutr.* 23:1137.
- Tessier, D. M., Khalil, A., Trottier, L., & Fülöp, T. (2009). Effects of vitamin C supplementation on antioxidants and lipid peroxidation markers in elderly subjects with type 2 diabetes. *Archives of gerontology and geriatrics*, 48(1), 67-72.
- Troutman. (2012). What Are the Benefits of Quail Eggs?
- Tullett, S. G. (1990). Science and the art of incubation. *Poultry Science*, 69(1), 1-15.
- Tunsaringkarn T., Tungjaroenchai W and Wattasit S. (2013). Nutrient Benefits of Quail (Coturnix Coturnix Japonica) Eggs. *International Journal of Scientific and Research Publications*, 3:1-8.

U

- Uemura, M., Manabe, H., Yoshida, N., Fujita, N., Ochiai, J., Matsumoto, N., ... & Yoshikawa, T. (2002). α -Tocopherol prevents apoptosis of vascular endothelial cells via a mechanism exceeding that of mere antioxidation. *European journal of pharmacology*, 456(1-3), 29-37

V

- Voljč, M., Frankič, T., Levart, A., Nemec, M., & Salobir, J. (2011). Evaluation of different vitamin E recommendations and bioactivity of α -tocopherol isomers in broiler nutrition by measuring oxidative stress in vivo and the oxidative stability of meat. *Poultry Science*, 90(7), 1478-1488.

W

- Wakenell, PS, T. Bryan, J. Schaeffer, A. Avakian, C. Williams et C. Whitfill. 2002. Effet de la voie d'administration du vaccin in ovo sur l'efficacité et la virémie de son pesvirus de dinde/SB-1. *Aviaire Dis.* 46:274–280.
- Weiser, H., Riss, G., & Kormann, A. W. (1996). Biodiscrimination of the eight α -tocopherol stereoisomers results in preferential accumulation of the four 2 R forms in tissues and plasma of rats. *The Journal of nutrition*, 126(10), 2539-2549.
- Willemsen, H., Debonne, M., Swennen, Q., Everaet, N., Careghi, C., Han, H., Bruggeman, V., Tona, K. and E. Decuyper, (2010). Delay in feed access and spread of hatch:importance of early nutrition. *World Poult. Sci. J.*, 66:177-188.
- Williams, C. J. 2007. In ovo vaccination for disease prevention. *Int. Poult. Prod.* 15:7–9.
- Williams, C. J. 2011. In ovo vaccination and chick quality. *Int. Hatch. Prac.* 19:7–13.

- WILSON, R. L. (1983) Free radical protection: Why vitamin E not vitamin C, b-carotene, or glutathione? *Biology of Vitamin E. Ciba Foundation Symposium* 101. London, UK, The Pitman Press: 19-37.

Y

- Yair, R., R. Shahar, and Z. Uni. 2015. In ovo feeding with minerals and vitamin D3 improves bone properties in hatchlings and mature broilers. *Poult. Sci.* 94:2695–2707.

Z

- Zakaria, A. H., & Al-Anezi, M. A. (1996). Effect of ascorbic acid and cooling during egg incubation on hatchability, culling, mortality, and the body weights of broiler chickens. *Poultry Science*, 75(10), 1204-1209.
- Zakaria, A. H., Al-Latif, A. A., & Al-Anezi, M. A. (1998). Effect of ascorbic acid on embryonic development, hatch time and growth of extended delayed placement of broiler chickens. *Archiv fuer Gefluegelkunde (Germany)*.
- Zhang, H., Elliott, K. E. C., Durojaye, O. A., Fatemi, S. A., & Peebles, E. D. (2018). Effects of in ovo administration of L-ascorbic acid on broiler hatchability and its influence on the effects of pre-placement holding time on broiler quality characteristics. *Poultry science*, 97(6), 1941-1947
- Zhang, H., Elliott, K. E. C., Durojaye, O. A., Fatemi, S. A., Schilling, M. W., & Peebles, E. D. (2019). Effects of in ovo injection of L-ascorbic acid on growth performance, carcass composition, plasma antioxidant capacity, and meat quality in broiler chickens. *Poultry science*, 98(9), 3617-3625.
- Zhu, Y., Zhao, J., Wang, C., Zhang, F., Huang, X., Ren, Z., ... & Yang, X. (2021). Exploring the effectiveness of in ovo feeding of vitamin C based on the embryonic vitamin C synthesis and absorption in broiler chickens. *Journal of animal science and biotechnology*, 12(1), 1-8.

Références numériques :

- Enzo life science. Oxidative Stress .Comprehensive Tools for Quantifying Cellular Responses to Oxidative Damage. Consulter le 15 /05/2022 .
<https://www.enzolifesciences.com/platforms/cellular-analysis/oxidative-stress/> .
- Healthfully, What Are the Benefits of Quail Eggs?, consulter le 18 /05/2022 .
http://www.ehow.com/list_6671158_benefits-quail-eggs_.html .
- Tpeoefouaga.canalblog. Les "pouvoirs" de l'oeuf en cuisine .consulter le 04/06/2022 .(<http://tpeoefouaga.canalblog.com/archives/2013/02/05/26339050.html>) .
- Keller M .Caille japonaise .NICS .<https://www6.val-de-loire.inrae.fr/prc-neuroendo-comp/Approches-modeles-e;t-outils/Modeles-animaux/Caille-japonaise> .

Résumé

L'administration de nutriments par alimentation *in-ovo* est considérée comme une méthode efficace pour contrôler les maladies aviaires, améliorer les performances d'éclosion, réduire la mortalité embryonnaire, augmenter le poids relatif des poussins à l'éclosion et réduire la perte de poids chez les nouveau-nés. Cette étude a été menée afin de déterminer et d'évaluer l'effets de la vitamine E α -tocophérol (Vit E α), la vitamine E acétate (Vit E act) et la vitamine C (Vit C) et leur association sur différents paramètres zootechniques (les stades de mortalité embryonnaire, le taux d'éclosion, le poids relatif après éclosion, et la perte en poids des cailleaux). Un total de 252 œufs de caille japonaise (*Coturnix japonica*) a été réparti au hasard en 4 groupes de traitements pour la première expérience (E1) et en 6 groupes de traitements pour la deuxième expérience (E2). L'injection dans les œufs s'est faite au jour 9 d'incubation (J+9) et le site d'injection était la chambre à air des œufs. Les groupes de E1 sont repartis comme suit : un groupe témoin non injecté C(-) ; un groupe témoin positif injecté avec de l'eau physiologique C(+); un groupe injecté avec 3mg/œuf de vitamine E alpha tocophérol (Vit E α) ; un groupe injecté avec 3mg/œufs de vitamine E acétate (Vit E act). Pour la E2 : c'est la même répartition que la E1 avec 2 groupes supplémentaires : un groupe injecté avec 1mg/œuf de vitamine C (Vit C) et un groupe injecté avec l'association de 1mg de Vit C + 3mg de Vit E α / œuf. L'injection de la vitamine C a révélé le pourcentage d'éclosion le plus élevé avec un faible taux de mortalités embryonnaires. Le groupe injecté avec la Vit E act a enregistré le taux le plus bas en mortalités embryonnaires tardives (MET) proche de celui de l'association Vit C + Vit E α . L'augmentation du poids relatif est observée chez le groupe injecté avec de l' α tocophérol. Les résultats de la présente étude nous poussent à croire qu'une synergie entre les deux vitamines E et C existe et fait effet pendant le développement embryonnaire des cailles japonaises ; le faible taux de MET chez le groupe de Vit C + Vit E α peut indiquer une baisse du stress oxydatif. Cependant ce groupe n'a pas montré d'effet en ce qui concerne le poids relatif et le pourcentage d'éclosion d'une manière significative comparé au reste des groupes de vitamines.

Mots clés : *in-ovo*, éclosion, mortalité embryonnaire, poids, caille japonaise, vitamine E, vitamine C.

Abstract

The administration of nutrients by *in-ovo* feeding is considered as an effective method for controlling and healing avian diseases, improving hatching performance in poultry, reducing embryonic mortalities, increasing the relative weight of chicks at hatching, reducing weight loss in newborns and increasing meat quality. This study was conducted to determine and evaluate the effects of vitamin E α -tocopherol (Vit E α), vitamin E acetate (Vit E act) and vitamin C (Vit C) and their association on different zootechnical parameters (the stages of embryonic mortality, the hatching rate, the relative weight after hatching and the weight loss of the chicks). A total of 252 Japanese quail (*Coturnix japonica*) eggs were randomly allocated into 4 treatment groups for the first experiment (E1), and 6 treatment groups for the second experiment (E2). The eggs were injected on day 9 of incubation (D+9), in the eggs air chamber. The groups of E1 are distributed as follows : an uninjected control group C(-) ; a positive control group injected with C(+) saline ; a group injected with 3mg/egg of vitamin E alpha tocopherol (Vit E α) and a group injected with 3mg/egg of vitamin E acetate (Vit E act). For E2 : it is the same distribution as E1 with 2 additional groups : a group injected with 1mg/egg of vitamin C (Vit C) and a group injected with the combination of 1mg of Vit C + 3mg of Vit E α / egg. Vitamin C injection revealed the highest hatching percentage and the lowest mortality rate. The group injected with Vit E act recorded the lowest rate of late embryonic mortality, values similar to those of Vit C + Vit E association. An increase in relative weight is also observed in the group injected with α tocopherol along with an increase in weight loss in the non-injected group. The results of the present study lead us to believe that a synergy between the two vitamins E and C exists and has an effect during the embryonic development of Japanese quail, the low level of MET in the group of Vit C + Vit E α may indicate a decrease in oxidative stress. However this group did not show any significant effect on relative weight and hatch percentage compared to the rest of the vitamin groups.

Key words : *in-ovo*, hatching, embryonic mortalities, weight, Japanese quail, vitamin E, vitamin C.