



**HAL**  
open science

# Instrumentations radiofréquences pour l'agriculture de précision : application à la filière aviaire pour le sexage précoce in et ex ovo

Patricio Felipe Jaque Gonzalez

## ► To cite this version:

Patricio Felipe Jaque Gonzalez. Instrumentations radiofréquences pour l'agriculture de précision : application à la filière aviaire pour le sexage précoce in et ex ovo. Electronique. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2020. Français. NNT : 2020TOU30274 . tel-03605627

**HAL Id: tel-03605627**

**<https://theses.hal.science/tel-03605627v1>**

Submitted on 11 Mar 2022

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



# THÈSE

En vue de l'obtention du

## DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par L'université Toulouse III – Paul Sabatier

---

Présentée et soutenue par

**PATRICIO FELIPE JAQUE GONZALEZ**

Le 23 septembre 2020

### **Instrumentations radiofréquences pour l'agriculture de précision : Application à la filière aviaire pour le sexage précoce in et ex OVO.**

---

École doctorale et discipline ou spécialité

Ecole doctorale : **GEET – Génie Electrique Electronique et Télécommunications :  
du système au nanosystème**

Specialité : **Electromagnétisme et Systèmes Haute Fréquence**

**Unité de recherche**  
LAAS-CNRS

**Directrice(s) ou Directeur(s) de Thèse**

David DUBUC  
Katia GRENIER  
Thierry VERONESE

**Jury**

Mme Sophie Réhault-Godbert, Mme Valérie Vigneras, M. Jean-Baptiste Bégueret











## REMERCIEMENTS

Mes travaux de thèse ont été réalisés entre février 2017 et Juillet 2020 au sein de l'équipe MH2F au LAAS-CNRS en partenariat avec l'entreprise Ovalie Innovation. Dans ce qui suit, je souhaiterais remercier toutes les personnes qui ont participé d'une façon ou d'une autre à cet enrichissant parcours.

Je voudrais tout d'abord remercier mes encadrants d'avoir élaboré ce projet de recherche et de m'avoir confié sa réalisation en tant que doctorant. Je commencerais par remercier Thierry Véronèse (encadrant industriel) d'avoir soutenu et encouragé l'esprit de recherche tout au long de ce travail et de m'avoir permis de rejoindre l'équipe d'Ovalie Innovation aux réunions de fin d'année, me permettant ainsi de rencontrer mes collègues (coté industriel) et de découvrir leurs projets respectifs. Je remercie également David Dubuc, encadrant académique, qui a dirigé mes travaux de thèse avec expérience et méthodologie scientifique. Je le remercie également de m'avoir invité en qualité d'enseignant vacataire au département GEII de l'IUT Paul Sabatier ; expérience pédagogique et personnelle très formatrice. Enfin je voudrais remercier Katia Grenier, co-encadrante académique et responsable de l'équipe MH2F, qui a encadré mes travaux de thèse en y apportant un regard avisé aussi bien concernant les aspects techniques que dans la valorisation scientifique de ces travaux. Je remercie également son accompagnement tout au long de ma thèse et sa disponibilité en tant que responsable d'équipe, également pour les différentes démarches administratives que requièrent les travaux de thèse. Enfin, je souhaite la remercier pour son accompagnement aux conférences JNM2019 et EuMC2019, lors desquelles nous avons diffusé nos travaux de recherche.

Ensuite je souhaiterais remercier Mylène Da Silva et Juan Martinez d'Ovalie Innovation qui ont participé activement à ce projet en y apportant leur expertise, permettant ainsi d'aborder mes travaux de thèse de façon interdisciplinaire. Nous avons réalisé ensemble de longues campagnes de mesures ainsi que des réunions d'avancement régulières qui ont permis de nous consolider en tant qu'équipe de travail mais aussi de nous rapprocher humainement. Je suis très reconnaissant envers eux, quant à leur participation, leur soutien et leur investissement dans les différentes phases du projet.

Je voudrais remercier tout particulièrement mes collègues Mareva Calvet-Chautard et Ali Moscatiello, pour leur esprit d'équipe et leur soutien, tous deux se sont montrés notamment très disponibles pour répondre à mes (nombreuses) questions, aussi bien linguistiques que scientifiques. Je salue aussi ici les grandes discussions que nous avons pu mener, qui se sont souvent illustrées par des schémas au tableau du bureau. Un remerciement spécial à Maréva avec qui j'ai eu l'honneur de partager quelques travaux de recherche, ainsi que la salle de manip, l'administration de déchets,

le rangement de la salle, et un grand « et cetera ». Je voudrais aussi remercier toutes celles et ceux avec qui j'ai eu l'honneur de partager au LAAS : Amel, Amar, Sylvain, Leyla, Benjamin, Lise et bien sûr mon cousin Manel. Je remercie toutes et tous pour les moments de partages aux repas, les nombreuses pauses café (...et pots de départs). Je voudrais aussi remercier l'équipe MH2F dans son ensemble, en particulier Camille Gironde, toujours disponible pour des questions biologiques liés à mes travaux de recherche et Christophe qui m'a invité aux matchs de football les vendredis me permettant d'envisager ma thèse de façon plus... sportive.

Enfin je voudrais remercier le personnel permanent du laboratoire que j'ai beaucoup sollicité (et embêté) pendant ma thèse pour leur bienveillance et leur réactivité : Xavier Dollat, Sandrine Assie, Charline Blatché, Louisa Boyer, Alexandre Rumeau, Daniel Medale, Eric Ledenmat, et surtout notre gestionnaire Jeanette Thibaut.

## RESUME

Ce travail de thèse aborde la problématique du sexage précoce des œufs, consistant à déterminer le sexe d'un embryon aviaire, dans ce cas particulier du canard mulard, à un stade précoce de développement embryonnaire. En effet il s'agit d'une problématique mondiale avec de forts enjeux sociétaux liés au bien-être animal ainsi que des enjeux économiques liés à l'agro-industrie. Pour répondre à cette problématique, les développements en cours impliquent des techniques invasives ou non, majoritairement optiques. Dans notre cas, nous nous sommes intéressés au développement d'instrumentations basées sur la technique de spectroscopie radiofréquence (RF) comme méthode de sexage précoce in et ex ovo en raison de son caractère non-invasif et sa capacité à caractériser la matière biologique par ses propriétés diélectriques.

Dans une première partie de ce manuscrit, le Chapitre I, nous étudions le contexte actuel du sexage des œufs, en abordant les enjeux sociétaux et économiques ainsi que les techniques d'analyse existantes ou en cours de développement. Dans ce paysage, nous positionnons la spectroscopie RF comme technique innovante et viable pour une application à grande échelle.

Ensuite, le travail de thèse a été divisé en deux axes principaux. Le premier est décrit dans le chapitre II de cette thèse avec la mise en place d'un système d'analyse RF millifluidique pour évaluer les différents liquides constitutifs de l'œuf et voir s'il est possible de trouver une source de différenciation sexuelle (mâle-femelle) ciblée dans l'œuf. Pour cela nous avons conçu puis optimisé un dispositif de spectroscopie millifluidique RF. Sa caractérisation en termes de sensibilité et de reproductibilité des mesures a été menée à l'aide de liquides de référence. Des protocoles de prélèvements et de préparation des échantillons liquides d'œufs ainsi que des méthodes de mesures ont ensuite été mis en place, appliqués à la discrimination d'œufs clairs et d'œufs fécondés puis du sexe.

Le deuxième axe traite de la mise en place de l'instrumentation d'analyse RF non invasive des œufs. Pour cela une partie a été dédiée à la conception des capteurs permettant d'irradier des ondes électromagnétiques dans l'œuf et de mesurer les ondes réfléchies et transmises par et à travers l'œuf. En utilisant des outils de simulation électrique et électromagnétique, nous avons conçu différentes versions des capteurs dédiés à la mesure des œufs, et défini celui le plus adapté pour l'application visée. Un banc de caractérisation d'œufs et une méthode expérimentale ont été également mis en place pour mesurer des œufs à différents jours d'incubation. Différentes campagnes de mesure sur œuf ont permis de mettre en évidence des améliorations à apporter à l'instrumentation pour une meilleure adaptabilité à la variabilité intrinsèque des œufs.

et une meilleure sensibilité, avec la proposition d'une nouvelle version du banc de spectroscopie RF sur œufs, adaptable à la géométrie de l'œuf.

Ce travail pose donc les premières bases d'une instrumentation RF dédiée à l'analyse non invasive d'œufs, avec pour perspective une possible exploitation pour des problématiques de fraîcheur ou encore de sexage précoce, qui revêtent des enjeux économiques importants pour le secteur agricole et la filière aviaire.

Mots clés : spectroscopie diélectrique, agriculture de précision, radiofréquences, millifluidique, biocapteurs.

### **ABSTRACT**

This doctoral work addresses the issue of early sexing of eggs, consisting in determining the sex of an avian embryo, in this particular case of the mulard duck, at an early stage of embryonic development. Indeed, it is a global problem with strong societal issues related to animal welfare as well as economic issues related to agro-industry. To address these issues, current developments involve techniques, that may or may not be invasive, mainly optical. In our case, we were interested in the development of instrumentation based on the radio frequency (RF) spectroscopy technique as a method of early sexing in and ex ovo due to its non-invasive character and its ability to characterize biological material by its dielectric properties.

In the first part of this document (Chapter I), we study the current context of egg sexing, by addressing societal and economic issues as well as existing or developing analytical techniques. In this landscape, we position RF spectroscopy as an innovative and viable technique for large-scale application.

Then, the work is divided into two main axis. The first one is described in chapter II of this PhD manuscript with the establishment of a millifluidic RF analysis system to evaluate the different constituent fluids of an egg and evaluate if it is possible to find a source of sexual differentiation (male-female). To do this, we design and then optimize an RF millifluidic spectroscopy device. Its characterization in terms of sensitivity and reproducibility of measurements is carried out using reference liquids. Protocols for the collection and preparation of liquid egg samples as well as measurement methods are then set up, applied to the discrimination of clear eggs and fertilized eggs and then gender.

The second axis deals with the implementation of an instrumentation for non-invasive RF analysis of eggs. To do this, a part of the work is dedicated to the design of sensors to irradiate electromagnetic waves in the egg and, to measure the waves reflected and transmitted by and through the egg respectively. Using electrical and

electromagnetic simulation tools, we design different versions of the sensors dedicated to eggs measurements, and define the most suitable for the intended application. An egg characterization test bench and an experimental method are also set up to measure eggs at different incubation days. Various eggs measurement campaigns permit to highlight the improvements which should be made to the instrumentation for a better adaptability to the intrinsic variability of eggs and a better sensitivity, with the proposal of a new version of the RF spectroscopic test-bench of eggs, adapted to the geometry of the egg.

This work therefore lays the first foundations of a RF instrumentation dedicated to the non-invasive analysis of eggs, with the prospect of a possible exploitation for freshness evaluation or even early sexing, which both have significant economic challenges for the agricultural and avian sector.

Key words: dielectric spectroscopy, precision agriculture, microwave, milli-fluidic, biosensors,

## Sommaire

<b>REMERCIEMENTS</b> .....	7
<b>RESUME</b> .....	9
<b>ABSTRACT</b> .....	10
<b>INTRODUCTION GENERALE</b> .....	23
<b>CHAPITRE 1 : MOTIVATION ET ETAT DE L'ART</b> .....	25
<b>I. INTRODUCTION</b> .....	26
<b>II. ENJEUX SOCIETAUX LIES A LA PROBLEMATIQUE DU SEXAGE PRECOCE D'OEUF</b> .....	27
<b>II.1. CONTEXTE ETHIQUE ET DU BIEN-ETRE ANIMAL</b> .....	27
<b>II.2. CONTEXTE ECONOMIQUE</b> .....	28
<b>II.3. DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE AVIAIRE</b> .....	29
II.3.1. Différents constituants d'un œuf fécondé.....	30
II.3.2. Développement embryonnaire du canard mulard.....	32
<b>III. TECHNIQUES EXISTANTES POUR LE SEXAGE DES OEUF</b> 35	
<b>III.1. TECHNIQUES INVASIVES</b> .....	35
<b>III.2. TECHNIQUES NON INVASIVES</b> .....	39
<b>IV. TECHNIQUES EXISTANTES POUR L'ANALYSE RF DE LA QUALITE DES ŒUF</b> .....	43
<b>IV.1. SPECTROSCOPIE DIELECTRIQUE RADIOFREQUENCE</b> .....	43
<b>IV.2. INDICES DE QUALITE DES ŒUF</b> .....	44
<b>IV.3. ANALYSES RF INVASIVES</b> .....	45
<b>IV.4. ANALYSES RF NON-INVASIVES</b> .....	46
<b>V. SPECTROSCOPIE RF POUR LE SEXAGE DES ŒUF</b> .....	51
<b>VI. CONCLUSIONS</b> .....	55
<b>CHAPITRE 2 : INSTRUMENTATION RF POUR L'ANALYSE RF DE LIQUIDES EX-OVO</b> .....	57
<b>I. INTRODUCTION</b> .....	58
<b>II. MOTIVATION</b> .....	59

<b>II.1. POINT SUR L'ETUDE PAR ANALYSE RF DES LIQUIDES CONSTITUTIFS DES ŒUFS .....</b>	<b>59</b>
<b>II.2. ETAT DE L'ART SUR LES DISPOSITIFS DE SPECTROSCOPIE RF POUR L'ANALYSE DE FLUIDES .....</b>	<b>60</b>
<b>III.    DEVELOPPEMENT DE L'INSTRUMENTATION RF DEDIEE A LA CARACTERISATION DE LIQUIDES D'OEUFs.....</b>	<b>63</b>
<b>III.1. PERMITTIVITE ET CONSTANTE DE PROPAGATION .....</b>	<b>63</b>
<b>III.2. CONCEPTION DU DISPOSITIF RF .....</b>	<b>64</b>
III.2.1. Rappel sur le guide d'onde coplanaire .....	64
III.2.2. Principe de fonctionnement du dispositif d'analyse RF ...	65
III.2.3. Architecture du dispositif millifluidique .....	68
III.2.4. Système de mesure de 1 <sup>ère</sup> génération - $V_1$ .....	70
III.2.5. Mesure de liquides modèles pour la validation du dispositif RF $V_1$ .....	72
III.2.6. Conception du dispositif millifluidique de 2 <sup>ème</sup> génération – $V_2$ .....	76
III.2.7. Système de mesure de 2 <sup>ème</sup> génération - $V_2$ .....	78
III.2.8. Mesure des liquides modèles pour la validation du dispositif de mesures RF $V_2$ .....	79
<b>IV.    CARACTERISATION RF DE DIFERENTS LIQUIDES D'OEUFs</b>	<b>84</b>
<b>IV.1. INCUBATION DES ŒUFS ET PRELEVEMENT DES LIQUIDES .....</b>	<b>84</b>
IV.1.1. Œufs de canard Mulard .....	84
IV.1.2. Prélèvement des liquides de l'œuf .....	85
<b>IV.2. CARACTERISATION RF DE LIQUIDES D'ŒUFS MOYENNES ET HOMOGENEISES.....</b>	<b>86</b>
IV.2.1. Cas du jaune « moyenné » .....	87
IV.2.2. Cas du jaune « moyenné » et dilué avec de l'eau DI.....	88
IV.2.3. Cas du fluide allantoïque « moyenné » .....	90
IV.2.4. Cas du Blanc « moyenné » et dilué avec de l'eau DI .....	91
<b>IV.3. CARACTERISATION RF DE LIQUIDES D'ŒUFS INDIVIDUELS – CAS DU JAUNE POUR 40 ŒUFS.....</b>	<b>92</b>
<b>IV.4. CARACTERISATION RF DE LIQUIDES D'ŒUFS INDIVIDUELS – CAS DU BLANC POUR 35 ŒUFS .....</b>	<b>93</b>
<b>IV.5. CARACTERISATION RF DE LIQUIDES D'ŒUFS – CAS DU LIQUIDE EXTRA EMBRYONNAIRE .....</b>	<b>94</b>

IV.5.1. Premiers tests réalisés sur le liquide extra-embryonnaire	95
IV.5.2. Préparation des échantillons du liquide extra-embryonnaire V2 .....	96
IV.5.3. Protocole fluidique V <sub>2</sub> .....	97
IV.5.4. Campagne d'analyse RF du liquide extra-embryonnaire des œufs en J-12.....	99
<b>V. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>101</b>
<b>V.1. INSTRUMENTATION RF MILLIFLUIDIQUE : DISPOSITIF DE     SPECTROSCOPIE RF DE LIQUIDES .....</b>	<b>101</b>
<b>V.2. APPLICATION DE L'INSTRUMENTATION RF MILLIFLUIDIQUE POUR     CARACTERISER DES LIQUIDES ISSUS D'ŒUFS.....</b>	<b>103</b>
<b>CHAPITRE 3 : ANALYSE RF NON-INVASIVE DES ŒUFS (IN-OVO) .....</b>	<b>107</b>
<b>I. INTRODUCTION ET MOTIVATION.....</b>	<b>108</b>
<b>II.    CONCEPTION DES CAPTEURS RF .....</b>	<b>109</b>
<b>II.1. CONCEPTION DU CAPTEUR C1 .....</b>	<b>109</b>
II.1.1. Géométrie du capteur.....	109
II.1.2. Simulations sur HFSS .....	110
II.1.3. Circuit équivalent.....	112
II.1.4. Capteur C1b.....	114
<b>II.2. CAPTEUR C2.....</b>	<b>119</b>
II.2.1. Diagramme de rayonnement du capteur .....	123
II.2.2. Capteurs à grand et petit Gap.....	125
<b>III.    BANC NON INVASIF DE SPECTROSCOPIE DES ŒUFS ....</b>	<b>128</b>
<b>III.1. ETUDE DE SENSIBILITE DES CAPTEURS.....</b>	<b>129</b>
III.1.1. Perturbateur dans l'axe x .....	130
III.1.2. Perturbateur l'axe y .....	132
III.1.3. Perturbateur dans l'axe Z.....	135
III.1.4. Sensibilité des Capteur C2.1 (petit gap) et C2b.....	137
III.1.5. Conclusions et perspectives.....	138
III.1.6. Sensibilité des capteurs sur HFSS .....	139
<b>IV.    MESURES NON INVASIVE DES ŒUFS.....</b>	<b>143</b>
<b>IV.1. CONDITIONS D'INCUBATION ET DE MESURE.....</b>	<b>143</b>

---

<b>IV.2. ANALYSE DE DONNEES .....</b>	<b>146</b>
<b>IV.3. CAMPAGNE N°1 .....</b>	<b>147</b>
IV.3.1. Matériaux et Méthodes .....	147
IV.3.2. Reproductibilité .....	147
IV.3.3. Spectre de l'œuf .....	151
IV.3.4. Mesure des œufs et analyse de donnés .....	152
<b>IV.4. CAMPAGNE N°2 .....</b>	<b>155</b>
IV.4.1. Matériaux et Méthodes .....	155
<b>IV.5. CAMPAGNE N°3 .....</b>	<b>160</b>
<b>IV.6. CAMPAGNE N°4 .....</b>	<b>162</b>
<b>V. ANALYSE DES RESULTATS ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>164</b>
V.1.1. Conception des capteurs souples C3 .....	164
V.1.2. Conception d'un support mécanique œuf capteurs .....	168
<b>VI. CONCLUSION.....</b>	<b>169</b>
<b>CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>170</b>
<b>VII. ANNEXES.....</b>	<b>173</b>
<b>VII.1. RAPPEL SUR L'UTILISATION DES MATRICES S ET T .....</b>	<b>173</b>
VII.1.1. Matrice S.....	173
VII.1.2. Matrice de transfert T.....	174
<b>VIII. BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>179</b>

## Liste des tableaux

Tableau 1 : surface du réseau sanguin .....	32
Tableau 2 récapitulatif techniques existante pour sexage des œufs *Temps estimé, non précisé par les auteurs .....	41
Tableau 3 Résumé des techniques de spectroscopie RF des œufs .....	49
Tableau 4 volume des canaux fluidiques .....	69
Tableau 5 Ecart-types sur la permittivité effective pour chaque solution de BSA mesurée à 2GHz .....	74
Tableau 6 Volumes des canaux fluidiques du dispositif $V_2$ .....	77
Tableau 7 Ecart types de la permittivité complexe pour les différentes concentrations du BSA .....	82
Tableau 8 Ecart-types Jaune moyenné .....	87
Tableau 9 Ecart types à 2 GHz pour les parties réelle et imaginaire de la permittivité pour des œufs mâles, femelles, et clairs. ....	89
Tableau 10 Ecart types pour les fluides allantoïques moyennés en J-12 .....	90
Tableau 11 écart types pour les échantillons de blanc J-12 « moyennés » et dilués x10. ....	91
Tableau 12 Ecart-types du $\Delta\epsilon$ mesuré pour les échantillons de jaune d'œufs mâles et femelles à 2GHz .....	93
Tableau 13 écart-types blanc d'œuf dilué x4 en eau DI des œufs en J-12 .....	94
Tableau 14 écart-types liquide extra-embryonnaire J-12 .....	95
Tableau 15 écart-types liquide extra-embryonnaire soniqués .....	99
Tableau 16 Ecart-type de $\Delta\epsilon$ pour les mâles (M) et femelles (F) et contraste male-femelle $\Delta\mathbf{M} - \mathbf{F}$ du liquide extra-embryonnaire en ED-12 .....	100
Tableau 17 Résumé sensibilité capteurs aux fréquences 2, 3 et 4 GHz .....	139
Tableau 18 Ecart types du module et phase du coefficient de réflexion ( $S_{11}$ ) dû au repositionnement de l'œuf dans le capteur .....	149
Tableau 19 Ecart-types et contraste des œufs fécondés et clairs (non fécondés) à 2.5 GHz .....	163

## Table des illustrations

Figure 1 : Différentes structures d'un œuf non fertilisé à gauche et fertilisé à droite au 8ème jour d'incubation (J-8), schéma d'après (Da Silva 2017).....	30
Figure 2 : Composition des différents constituants de l'œuf d'après (E. C. Li-Chan et Kim 2008).....	30
Figure 3 : Développement embryonnaire du canard mulard d'après (Cornuez et Pain 2015).....	33
Figure 4 : a) schéma du prélèvement de cellules blastodermiques du disque germinale, b) reconstruction de l'image par spectroscopie FT-IR des échantillons des cellules blastodermiques (Steiner et al. 2011). .....	36
Figure 5 : A),B) et C) Processus d'ouverture et de recouvrement de l'œuf d'après (Galli et al. 2016). .....	37
Figure 6 : Résultats d'après (Galli et al. 2016) A) Spectre des vaisseaux sanguins des œufs femelles (rouge) et mâles en (bleu). B) Surface total d'intensité calculée. ....	37
Figure 7 : Procédure de prélèvement du liquide allantoïque à gauche, et résultats des concentrations de sulfate d'estrone en gris clair pour les femelles et gris foncé pour les mâles en fonction du jour d'incubation d'après (Weissmann et al. 2013). ....	38
Figure 8 méthode détection œuf mâle eggXYt (Verma s. d.) .....	39
Figure 9 : système de mesure des œufs par imagerie hyper spectrale d'après (Göhler, Fischer, et Meissner 2016) .....	40
Figure 10 Classification des techniques de sexage en fonction de la longueur d'onde et le temps de mesure.....	42
Figure 11 schéma de spectroscopie diélectrique RF.....	43
Figure 12 : Méthode de mesure de la taille de la poche d' air et de l'épaisseur du blanc "Haugh Unit" (L. Ragni et al. 2007).....	45
Figure 13 : Système de mesures RF par sonde coaxiale d'œufs (L. Ragni et al. 2007) ....	47
Figure 14 : schéma du système de mesure RF capacitive d'œufs (Luigi Ragni, Berardinelli, et Guarnieri 2008) .....	48
Figure 15 : schéma du système de mesure RF par guide d'onde rectangulaire d'œufs (Luigi Ragni, Cevoli, et Berardinelli 2010) .....	49
Figure 16 : Résumé des coefficients de corrélation en fonction de la fréquence pour différents indices de qualité des œufs obtenus dans les différents travaux mentionnés dans IV.4 du chapitre I.....	50
Figure 17 : schéma du système de spectroscopie RF d'un œuf proposé .....	53
Figure 18 schéma du dispositif (à gauche) et photo du même dispositif (à droite) (Grenier et al. 2009) .....	61
Figure 19 schéma du dispositif (a) vu de dessus (b) coupe transversale (c) photo du dispositif (Booth et al. 2010) .....	61
Figure 20 photo du dispositif microfluidique différentiel (Vélez et al. 2017) .....	62

Figure 21 schéma et paramètres dimensionnels d'une ligne coplanaire .....	64
Figure 22 lignes du champ électrique dans la ligne coplanaire.....	65
Figure 23 schéma de lignes de transmission électriquement identiques, avec différentes longueurs, et avec les ports d'entrée et sortie .....	66
Figure 24 Méthode de Bianco-Parodi appliqué à l'étude de liquides .....	67
Figure 25 Dimensions des guides d'ondes coplanaires pour le dispositif RF <b>V1</b> .....	68
Figure 26 Dimensions (en mm) des blocs PDMS et canaux fluidiques pour le dispositif RF <b>V1</b> .....	69
Figure 27 photo (vue de dessus) du dispositif de spectroscopie millifluidique .....	70
Figure 28 schéma du système de mesures millifluidiques $V_1$ .....	71
Figure 29 Schéma du module de calcul de la permittivité relative complexe .....	71
Figure 30 Temps de saturation du canal avec de l'eau DI à 2GHz.....	72
Figure 31 Permittivité effective (parties réelle et imaginaire) du dispositif chargé par de l'eau DI.....	73
Figure 32 permittivité effective mesurée pour différentes concentrations de BSA.....	74
Figure 33 Plan complexe de la permittivité effective du BSA à 2 GHz .....	75
Figure 34 Permittivité effective en fonction de la concentration du BSA .....	75
Figure 35 Schéma du protocole fluidique $V_1$ .....	76
Figure 36 Dimensions des guides d'ondes coplanaires du dispositif de spectroscopie RF millifluidique $V_2$ . .....	77
Figure 37 Dimensions du bloc PDMS contenant les canaux fluidiques .....	77
Figure 38 Photo du dispositif : à gauche vue en coupe, à droite vue de dessus.....	78
Figure 39 Banc de mesures complet de spectroscopie RF millifluidique.....	79
Figure 40 Permittivité effective mesurée de l'Eau DI en fonction du temps à 2 GHz ...	79
Figure 41 Permittivité effective (partie réelle et imaginaire) de l'eau DI .....	80
Figure 42 Permittivité effective de l'éthanol.....	80
Figure 43 Partie réelle de la permittivité mesurée pour les différentes solutions de BSA .....	81
Figure 44 Partie imaginaire de la permittivité mesurée pour les différentes solutions de BSA .....	81
Figure 45 Plan complexe de la permittivité effective des différentes mesures faites des solutions de BSA à 2GHz .....	82
Figure 46 Permittivité effective en fonction des différentes concentrations de BSA .....	83
Figure 47 Photo de la couveuse.....	85
Figure 48 Prélèvements a) du fluide allantoïque b) du jaune c) du fluide amniotique .....	86
Figure 49 Permittivité complexe obtenue pour les échantillons de Jaunes moyennés J-12 moyenné à 2 GHz .....	88

Figure 50 Permittivité complexe obtenue pour les échantillons de Jaunes moyennés et dilués en eau DI x10 pour des œufs Males (M) femelles (F) et clairs (C).....	89
Figure 51 Plan complexe de $\Delta\epsilon$ à 2 GHz pour les Fluides allantoïques moyennés en J-12 .....	90
Figure 52 Plan complexe de $\Delta\epsilon$ à 2 GHz pour les échantillons de Blanc « moyennés » et dilués x10 .....	91
Figure 53 Plan complexe de $\Delta\epsilon$ à 2 GHz pour 40 échantillons de Jaune d'œuf en ED-12 .....	93
Figure 54 Plan complexe de $\Delta\epsilon$ à 2 GHz pour des échantillons de Blanc dilué avec de l'eau DI (x4) d'œufs en J-12 .....	94
Figure 55 Plan complexe de $\Delta\epsilon$ à 2GHz du Liquide extra embryonnaire pour 5 échantillons Male (M) et 5 femelles (F) à 2GHz.....	95
Figure 56 Banc à ultra-son pour le broyage fin des membranes extra-embryonnaires ...	97
Figure 57 protocole fluide V2 développé pour la mesure RF de liquide extra-embryonnaire .....	98
Figure 58 Plan complexe de la permittivité de l'eau de référence après rinçage du liquide extra-embryonnaire à 2 GHz .....	98
Figure 59 Plan complexe de $\Delta\epsilon$ à 2GHz du liquide extra-embryonnaire en ED-12 .....	100
Figure 60 Permittivité théorique de l'eau DI et de l'éthanol à 20°C .....	102
Figure 61 Permittivité de BSA 50 mg/ml mesuré avec le dispositif de spectroscopie RF millifluidique V2 et avec la sonde Keysight N1501A (probe).....	103
Figure 62 Schéma et dimensions du capteur C1 .....	110
Figure 63 Simulation du capteur C1 sur HFSS à 3GHz .....	110
Figure 64 Module du coefficient de réflexion $ S_{11} $ du capteur C1.....	111
Figure 65 Circuit équivalente simplifié du capteur C1 .....	112
Figure 66 Circuit équivalente du capteur C1 sur ADS.....	113
Figure 67 Coefficient de réflexion $ S_{11} $ du capteur C1 simulations HFSS vs ADS .....	114
Figure 68 Circuit équivalente du capteur C1b .....	114
Figure 69 Tension dans le condensateur ( $V_c$ ) pour les capteurs C1 et C1b simulé sur ADS.....	115
Figure 70 Intensité du champ électrique dans la gap $ E $ (trait continu) et tension dans le condensateur $V_c$ (trait segmenté) des capteurs C1 et C1b .....	116
Figure 71 Simulation HFSS de l'intensité du champ $ E $ pour le capteur C1.b à 2GHz .....	116
Figure 72 Paramètre $ S_{11} $ du capteur C1b en fonction de la fréquence, obtenue par simulation électromagnétique (sur HFSS) et électrique (sur ADS) .....	117
Figure 73 $S_{11}$ module et phase, du capteur C1 mesuré avec un VNA et simulé sur HFSS .....	118

Figure 74 $S_{11}$ en module et phase du capteur C1b mesuré avec un VNA et simulé sur HFSS.....	118
Figure 75 Capteur C2 double face.....	119
Figure 76 Simulation sur HFSS du Capteur C2.....	120
Figure 77 Schéma et dimensions des capteurs C2.....	121
Figure 78 coefficient de réflexion $ S_{11} $ du capteur C2 à grand gap.....	121
Figure 79 coefficient de réflexion $ S_{11} $ du capteur C3b.....	123
Figure 80 Diagramme de rayonnement du capteur C3 entre 1et 4.1 GHz.....	124
Figure 81 Diagramme de rayonnement du capteur C3 entre 5.2 et 8.1 GHz.....	124
Figure 82 Coefficient de réflexion $ S_{11} $ des capteurs C3 grand gap (bleu) et petit gap(rouge).....	125
Figure 83 Schéma mesure des capteurs face à face.....	126
Figure 84 coefficient de transmission $ S_{21} $ capteur C3 grand et petit gap.....	126
Figure 85 coefficient de transmission $ S_{21} $ capteur C2b grand et petit gap.....	127
Figure 86 Support mécanique pour la spectroscopie RF des œufs.....	128
Figure 87 schéma du banc de mesure de la sensibilité des capteurs.....	129
Figure 88 Banc expérimental pour l'étude de sensibilité des capteurs.....	130
Figure 89 variations du module du coefficient de réflexion $ \Delta S_{11} $ en fonction de la position du perturbateur dans l'axe x.....	131
Figure 90 variations de la phase du coefficient de réflexion $ \Delta S_{11} $ en fonction de la position du perturbateur dans l'axe x.....	131
Figure 91 variations du module du coefficient de transmission $ \Delta S_{21} $ en fonction de la position du perturbateur dans l'axe x.....	132
Figure 92 variations du module du coefficient de réflexion $ \Delta S_{11} $ en fonction de la position du perturbateur dans l'axe y.....	133
Figure 93 variations de la phase du coefficient de réflexion $ \Delta S_{11} $ en fonction de la position du perturbateur dans l'axe y.....	134
Figure 94 variations du module du coefficient de transmission $ \Delta S_{21} $ en fonction de la position du perturbateur dans l'axe y.....	134
Figure 95 variations du module du coefficient de réflexion $ \Delta S_{11} $ en fonction de la position du perturbateur dans l'axe z.....	135
Figure 96 variations de la phase du coefficient de réflexion $\Delta\text{phase}(S_{11})$ en fonction de la position du perturbateur dans l'axe z.....	136
Figure 97 variations du module du coefficient de transmission $ \Delta S_{21} $ en fonction de la position du perturbateur dans l'axe z.....	136
Figure 98 variations du module du coefficient de réflexion $ \Delta S_{11} $ du capteur C2.1 en fonction de la position du perturbateur dans l'axe x.....	137

Figure 99 variations du module du coefficient de réflexion $ \Delta S_{11} $ du capteur C2.1 en fonction de la position du perturbateur dans l'axe y.....	138
Figure 100 variations du module du coefficient de réflexion $ \Delta S_{11} $ du capteur C2b en fonction de la position du perturbateur dans l'axe x.....	138
Figure 101 Simulation HFSS – schéma de la structure.....	140
Figure 102 Intensité du champ dans l'axe x.....	141
Figure 103 intensité du champ E dans l'axe y.....	141
Figure 104 Intensité du champ E dans l'axe z.....	142
Figure 105 schéma d'un œuf incubé en position verticale.....	143
Figure 106 incubation et mesure d'un œuf en position horizontale.....	144
Figure 107 a) incubation horizontale des œufs, b) mirage de la position embryon, c) marquage des œufs.....	145
Figure 108 Mesure d'un œuf en position horizontale.....	145
Figure 109 Schéma mesure d'un œuf.....	146
Figure 110 écart type du $ S_{11} $ (dB) dû au mouvement de l'embryon des œufs en J8..	148
Figure 111 Ecart-types du $ S_{11} $ (dB) dû au positionnement des œufs en J8.....	148
Figure 112 écart type du $ S_{21} $ dB dû au mouvement de l'embryon des œufs en J8.....	150
Figure 113 écart type du $ S_{21} $ (dB) due au positionnement des œufs en J8.....	150
Figure 114 Module du coefficient de réflexion $ S_{11} $ d'un œuf en J-8.....	151
Figure 115 Module du coefficient de transmission $ S_{21} $ d'un œuf en J-8.....	151
Figure 116 Coefficient de réflexion des œufs en J8 à 3 GHz.....	152
Figure 117 Contraste male femelle du module du coefficient de réflexion ( $\Delta  S_{11} $ ).....	153
Figure 118 écart-type $ S_{11} $ (dB) œufs mâle (M) et femelles (F).....	153
Figure 119 Contraste mâle-femelle du module du coefficient de transmission ( $\Delta  S_{21} $ ).....	154
Figure 120 écarts types $ S_{21} $ (dB) des œufs mâles (M) et femelles (F) en J8.....	155
Figure 121 moyenne des écarts types du $ S_{11} $ (en dB) des œufs pour différents jours d'incubation.....	156
Figure 122 Plan $ S_{11} $ vs $\phi(S_{11})$ à 3.5 GHz et écart types par œuf (J-8).....	156
Figure 123 Contraste mâle-femelle $\Delta  S_{11} $ dB en fonction de la fréquence aux différents jours d'incubation.....	157
Figure 124 écart types du coefficient de réflexion (en dB) des œufs mâles (M) et femelles (F) en J8.....	157
Figure 125 photo contact capteur1-œuf optimal mais capteur2-œuf non optimal.....	159
Figure 126 moyenne des écart types du coefficient de réflexion (dB) des œufs aux différents jours d'incubation.....	160

---

Figure 127 Contraste des moyennes des mâles et femelles du coefficient de réflexion $\Delta M - F(S_{11})$ .....	161
Figure 128 écart types du coefficient de réflexion (dB) des œufs mâles (M) et femelles (F) en J7.....	161
Figure 129 moyenne des écart-types par œuf aux différents jours d'incubation.....	162
Figure 130 œufs Fécondes (M et F) et non-fécondes (C) en J-5 à 2.5 GHz.....	163
Figure 131 dimensions capteurs souples C3 .....	165
Figure 132 simulation du capteur et modèle d'œuf sur HFSS .....	165
Figure 133 spectre du module de réflexion $ S_{11} $ , capteurs souples C3 (grande gap) et C3.1 (petit gap).....	166
Figure 134 Intensité du champ électrique en fonction de l'axe x (profondeur de détection) aux différents fréquences .....	167
Figure 135 intensité du champ électrique en fonction de l'axe y (fenêtre de détection horizontale) aux différents fréquences.....	167
Figure 136 support mécanique capteurs souples et œuf .....	168
Figure 137 schéma d'une ligne de transmission et des paramètres S.....	173
Figure 138 Schéma d'une ligne de transmission avec des connecteurs en entrée et en sortie .....	174

# INTRODUCTION GENERALE

Les travaux de recherche décrits dans ce manuscrit de thèse s'inscrivent dans un contexte interdisciplinaire qui joint les techniques radiofréquences (RF), plus souvent utilisées pour les systèmes de télécommunications, et l'agriculture de précision et la biologie. Plus précisément, les techniques RF ont été ici utilisées pour la caractérisation des œufs fécondés. En effet, la composition physiologique et biochimique d'un matériau détermine ses propriétés diélectriques, lesquelles vont agir sur l'amplitude et la phase d'un champ électromagnétique placé en interaction avec ce matériau. En mesurant ces variations de champ électromagnétique, il est possible de déterminer alors les propriétés biochimiques ou physiologiques d'un matériau. Grâce notamment à son caractère non-invasif, cette technique, nommée spectroscopie RF, a été développée pour la caractérisation d'entités biologiques telles que : les solutions liquides, les cellules, les tissus, etc. pour des applications biomédicales, ainsi que pour la détermination de l'humidité du sol ou du bois dans des applications agricoles, ou encore pour la détermination de la fraîcheur des aliments tels que les fruits, les céréales, les œufs et les viandes dans l'industrie agro-alimentaire.

Mes travaux de thèse ont été dédiés au développement d'une instrumentation RF pour le sexage précoce des œufs, consistant à déterminer le sexe d'un embryon aviaire, à un stade précoce de développement embryonnaire. Ceci se place comme une solution permettant d'éviter la problématique mondiale de broyage des poussins dans les couvoirs de l'industrie agro-alimentaire. Cette pratique, déjà interdite en Allemagne, et interdite en France à partir de l'année 2021, entraîne de forts enjeux sociétaux liés au bien-être animal ainsi que d'importantes conséquences économiques dans une industrie de grande importance en France et en Europe. Pour répondre à cette problématique, les développements actuels impliquent des techniques majoritairement optiques. Ce travail de thèse constitue alors une première approche au sexage des œufs en utilisant la spectroscopie RF, laquelle jusqu'à présent n'a pas été développée pour une telle problématique.

Ces travaux de recherche ont été divisés en deux axes principaux. L'un est dédié au développement d'une instrumentation RF, nous permettant d'analyser les propriétés diélectriques des liquides constituant les œufs fécondés (sexage ex ovo). Pour cela un dispositif de spectroscopie RF millifluidique a été conçu et évalué avec des protocoles de tests dédiés aux liquides d'œufs particulièrement visqueux et collants. L'autre branche de recherche a été dédiée au développement d'un banc de spectroscopie RF non-invasif d'œuf entier (in ovo) nous permettant d'envoyer des ondes RF dans l'œuf et de mesurer l'énergie réfléchi et transmise par et à travers l'œuf afin d'identifier le sexe de l'embryon.

Ce manuscrit est donc organisé en 3 chapitres :

- Le premier chapitre présente l'état de l'art des techniques existantes pour le sexage des œufs fécondés. De plus, nous avons décrit l'état de l'art des techniques RF utilisées pour l'analyse de la fraîcheur des œufs de consommation. Enfin nous positionnons la spectroscopie RF comme une possible solution au sexage des œufs.
- Le deuxième chapitre décrit les travaux réalisés pour l'analyse RF des liquides constituant les œufs. L'architecture d'un dispositif de spectroscopie RF milli-fluidique est décrite ainsi que les résultats obtenus lors de mesures sur liquides modèles pour validation du dispositif, ainsi que sur les liquides constituant les œufs. La méthode utilisée pour l'extraction de la permittivité de liquides est également décrite. Outre des variations induites par le genre, la possible discrimination de liquides d'œufs clairs et fécondés est aussi abordée.
- Le troisième chapitre aborde les travaux réalisés pour la conception d'un banc non-invasif dédié à la spectroscopie RF des œufs (in ovo). Le processus de conception des capteurs RF dédiés à la mesure des œufs est décrit, ainsi que les méthodes de caractérisation de ces capteurs, le tout en utilisant des simulations électriques, électromagnétiques et des mesures expérimentales en laboratoire. Enfin nous décrivons les méthodes et les résultats obtenus lors de mesures faites sur œufs fécondés à différents stades de développement embryonnaire.

# **CHAPITRE 1 : MOTIVATION ET ETAT DE L'ART**

# I. INTRODUCTION

Ce travail de thèse vise à évaluer l'utilisation de la spectroscopie radiofréquences (RF) comme une méthode de détermination du sexe d'un embryon aviaire, situé à l'intérieur d'un œuf. Le but de cette technique est de pouvoir prédire le sexe à un stade précoce de développement embryonnaire, de façon non-invasive, sans perturber le processus naturel d'incubation.

Le broyage de poussins mâles et de cannetons femelles dans l'industrie agro-alimentaire, plus précisément dans les couvoirs des poules pondeuses et de canards pour la production de foie gras, constitue une pratique de plus en plus questionnée par la société. De plus, l'incubation des œufs « non-productifs » ainsi que le processus de trie et d'euthanasie entraînent des coûts économiques significatifs pour l'industrie. Cette problématique est actuellement étudiée mondialement et notamment en France, où les acteurs impliqués cherchent à trouver des solutions technologiques.

Pour mieux comprendre les enjeux sociétaux et économiques de cette problématique, ceux-ci seront exposés dans un premier temps dans ce chapitre. Nous indiquerons ensuite les principales caractéristiques et évolutions des constituants de l'œuf au cours du développement embryonnaire de la poule et du canard afin de mieux appréhender les possibilités techniques d'analyse envisagées.

Nous présenterons alors l'état de l'art des techniques existantes en cours de développement pour le sexage des œufs et nous introduirons des techniques RF évaluées pour l'analyse de la qualité et de la fraîcheur des œufs de consommation.

Finalement, nous proposerons l'utilisation de la spectroscopie RF pour le sexage des œufs, comme une solution non-invasive et adaptée à une application à grande échelle.

## **II. ENJEUX SOCIETAUX LIES A LA PROBLEMATIQUE DU SEXAGE PRECOCE D'OEUFS**

### **II.1. CONTEXTE ETHIQUE ET DU BIEN-ETRE ANIMAL**

Cette thèse est réalisée dans le contexte économique et sociétal de la production d'œufs de consommation et de volaille de chair, surtout pour les espèces de type canard et poulet, mais aussi potentiellement pour la dinde, la pintade ou la caille.

Dans l'industrie agro-alimentaire, et plus particulièrement dans la filière des œufs, les poules pondeuses destinées aux activités de ponte des œufs, naissent à la suite d'une opération d'accoupage en couvoirs industriels dans lesquels, après éclosion, l'ensemble des poussins né est manuellement trié par sexe. Les femelles aptes pour l'activité de ponte sont sauvegardées, tandis que les poussins mâles sont tués et éliminés.

D'autre part, dans la filière "foie gras", en France, s'ajoute le problème de l'élevage des canards gras. Dans ces activités d'élevage et de gavage, pour garantir la qualité, seuls les mâles sont utilisés, car les foies des femelles trop nervurés et petits, sont inaptes à être valorisé en tant que foie gras. Dans les couvoirs industriels inversement aux poules pondeuses, les cannettes sont tuées et éliminées juste après éclosion.

D'après les données du service de statistiques du ministère de l'agriculture disponibles dans leur plateforme numérique « agreste » (Agreste 2019), environ 91 millions de canards ont éclos en 2019. Si on considère que le rapport de sexe mâle/femelle à la naissance des oiseaux est de 60% en faveur des mâles (Govoroun et Brillard 2004), on peut donc estimer que 36 millions de cannetons femelles ont été éliminées en 2019. De la même façon, on estime que 72 millions de poussins mâles inaptes à la production d'œufs de poule auraient été tués en 2019 dans les couvoirs industriels, en France.

Ces poussins mâles, (et cannetons femelles) sont tués selon des normes en vigueur mais, malgré cela, ces opérations sont de moins en moins acceptées par la société pour des raisons éthiques.

En France, le ministre de l'Agriculture, Didier Guillaume, a fixé à 2021 l'interdiction du broyage des poussins mâles tandis qu'en Allemagne c'est une pratique déjà interdite, remplacée par la détection du sexe au 9<sup>ème</sup> jours d'incubation (42% du processus d'incubation) en utilisant une technique considérée comme invasive et peu efficace par les autorités françaises.

Les enjeux économiques et éthiques sont importants, en France, en Europe et dans le monde. La société questionne de plus en plus ces pratiques dans un secteur économique agricole et industriel, qui occupe une place très importante dans le pays.

## II.2. CONTEXTE ECONOMIQUE

L'incubation des mâles dans la filière œufs et celle des femelles dans la filière foie gras n'ont pas de valorisation économique et engendrent un cycle de production industriellement inutile, et donc coûteux.

**Données économiques des poules pondeuses** : la production d'œufs de poule de consommation dans le monde est d'environ 1140 milliards, dont 116 milliards en Europe, et 14 milliards d'œufs en France (Service Economie ITAVI 2016). Chaque année en France, naissent près de 120 millions de poussins. Parmi eux, environ 72 millions sont des poussins mâles et donc éliminés. En Allemagne, c'est environ le même chiffre. Dans le monde, ce chiffre est de l'ordre 4 milliards de poussins tués par an.

**Données économiques de canards gras** : La production mondiale de foie gras est évaluée à 26 630 tonnes de foie gras cru en 2014. Avec plus de 25 000 tonnes, la production européenne reste très majoritaire au plan international et la France est le principal pays de production de foie gras avec plus de 19 000 tonnes (Service Economique ITAVI 2014). En France, il existe 26 couvoirs principaux dédiés à l'incubation des œufs de canard. En 2019, 91 millions de canetons sont nés en France, parmi lesquels 36 millions sont des canetons mâles à gaver, et le reste, des femelles à éliminer ou à envoyer sur des marchés incertains, comme l'Egypte.

Les enjeux économiques sont donc importants pour la filière « foie gras » et reposent sur deux aspects principaux :

- Eviter l'incubation inutile de 36 millions d'œufs femelles. Estimé à 8 cts €/œufs, le gain direct représente environ 3 à 5 millions d'euros d'économie par an pour les couvoirs français, sans compter les coûts de destruction,

- Permettre l'incubation des mâles à leur optimum de durée, celui-ci étant différent de celui des femelles, et ainsi obtenir des animaux plus robustes pour l'élevage, avec moins de pertes.

Dans un futur proche, la continuité de ces activités et la préservation de ces filières économiques et alimentaires de grande importance en France, ne sera pas possible sans leur acceptation par la société, dans un contexte satisfaisant aussi pour les consommateurs et pour le bien-être animal. Ceci impose la nécessité de développer des technologies de sexage *in ovo* utilisables à grande échelle et sans perturber le processus d'incubation. Jusqu'à présent, les techniques proposées n'ont pas apporté de solutions combinant une efficacité technique avec une viabilité technique et économique.

Dans ce contexte économique et sociétal l'entreprise **Ovalie Innovation**, partenaire industriel de ce projet, intéressé par l'innovation technologique pour l'agriculture, cherche à résoudre cette problématique. En effet, cette entreprise est intéressée par l'implémentation des technologies permettant de déterminer le sexe des embryons de canards (de type mulard) dans les couvoirs de la filière « foie gras » de grande importance dans le sud-ouest de la France. Ovalie innovation a fourni des éléments nécessaires au développement de ce projet ainsi que de l'expertise provenant de professionnels du domaine agricole-aviaire qui ont aussi participé à ce projet.

Afin de bien comprendre les enjeux techniques à résoudre pour réaliser un sexage précoce d'œufs non invasive, sans perturber le processus d'incubation, il est important de connaître comment se déroule le développement embryonnaire aviaire.

## **II.3. DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE AVIAIRE**

Le développement embryonnaire du canard reste peu décrit dans la bibliographie, à la différence de l'espèce Gallus qui a été largement documenté depuis longtemps. Nous allons donc d'abord étudier les différentes structures présentes dans un œuf de poule fécondé, puis nous ferons un descriptif des principaux stades de développement embryonnaire du canard. Cette partie s'appuie sur la thèse de Mylène Da Silva, qui a étudié les liquides allantoïques et amniotiques de l'œuf de poule fécondé (Da Silva 2017), et qui a participé au projet de thèse, en tant que membre de la société Ovalie Innovation.

### II.3.1. Différents constituants d'un œuf fécondé

L'œuf est formé dans l'appareil reproducteur de la poule. Une fois pondu, il est composé de quatre structures principales servant de source de nutriments et d'énergie à l'embryon (Romanoff 1960) : le jaune, la membrane vitelline, le blanc et la coquille (cf. Figure 1 à gauche). Pendant le développement de l'embryon, des structures supplémentaires extra-embryonnaires apparaissent telles que : le sac vitellin, amniotique et allantoïque comme montré dans la Figure 1 (à droite).

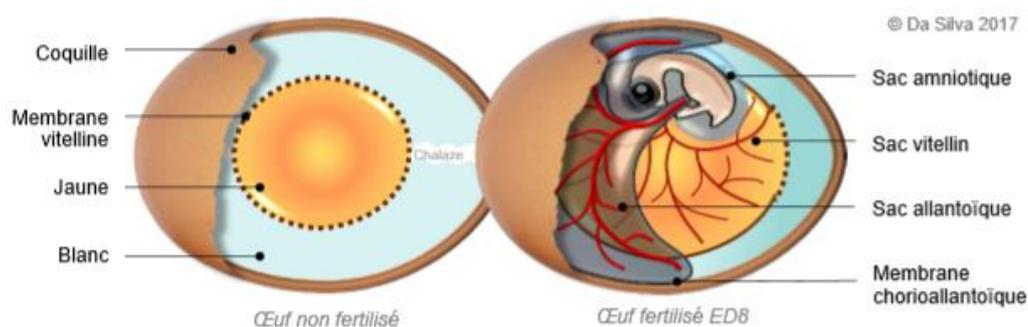


Figure 1 : Différentes structures d'un œuf non fertilisé à gauche et fertilisé à droite au 8ème jour d'incubation (J-8), schéma d'après (Da Silva 2017)

Le jaune, le blanc et la coquille d'un œuf constituent respectivement 29%, 61.5% et 9.5% du poids total d'un œuf sans embryon (Nys et Guyot 2011). La teneur en eau, protéines, minéraux, lipides et glucides des différents constituants d'un œuf fécondé sont présentés dans la Figure 2.

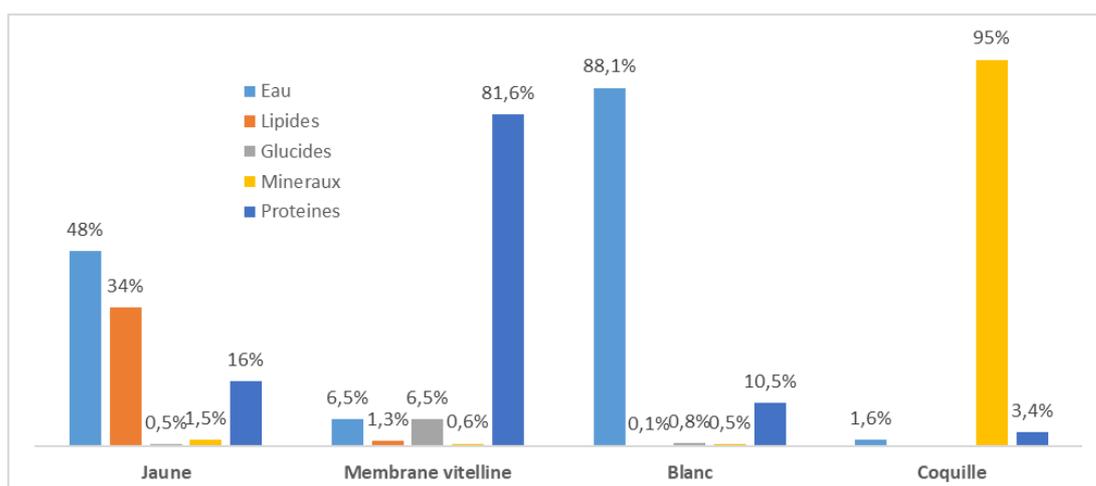


Figure 2 : Composition des différents constituants de l'œuf d'après (E. C. Li-Chan et Kim 2008)

Le jaune, riche en lipides et protéines, apporte des nutriments à l'embryon pendant son développement, et au poussin les premiers jours après éclosion. La

membrane vitelline est une matrice protéique qui entoure le jaune en le séparant physiquement du blanc. Elle constitue ainsi une barrière de protection chimique et physique de l'ovocyte fertilisé, en empêchant les pathogènes d'atteindre le jaune. De plus le blanc constitue une source de nutriments pour l'embryon et sert aussi de protecteur des protéines du jaune. La coquille forme la première barrière physique de protection de l'œuf, ainsi qu'une source de calcium pour la formation du squelette de l'embryon lors de son développement. La coquille contient des pores qui permettent l'échange d'eau et de gaz entre l'œuf et l'extérieur (Freeman et Vince 1974).

Au moment de la ponte de l'œuf entre 40.000 et 60.000 cellules indifférenciées forment le **disque germinal** (aussi nommé blastodisque ou blastoderme). Il a un diamètre compris entre 4 et 5 mm et une épaisseur de 250  $\mu\text{m}$  (Klein et al. 2002). Le blastoderme est une membrane formée de cellules provenant de la segmentation du vitellus, à partir duquel se génèrent les **structures extra-embryonnaires** telles que : le sac vitellin, amniotique et allantoïque. Ces structures apparaissent dès les premiers stades du développement embryonnaire, et ils évoluent en interaction avec les milieux intérieur et extérieur de l'œuf. Leur rôle dans le développement embryonnaire est décrit ci-dessous.

- Le **sac vitellin** recouvre progressivement la totalité du jaune, participe à la digestion et le transport des nutriments du jaune vers l'embryon. Il permet aussi la respiration de l'embryon dans les premiers jours de l'incubation. Le réseau sanguin qui se développe à sa surface est l'élément essentiel à la réalisation de toutes ces actions (Romanoff 1960).
- Le **sac amniotique** entoure l'embryon dans un milieu aqueux en le protégeant des chocs mécaniques, de la déshydratation, et le sépare des autres structures extra-embryonnaires. Le liquide amniotique est composé d'environ 99% d'eau, et un 1% de protéines, ainsi qu'une concentration élevée en ions chlorure, responsable de l'entrée d'eau dans le sac (Baggott 2001)
- Le **sac allantoïque** est le dernier à se créer, il est connecté à l'intestin de l'embryon, et s'étend progressivement au cours du développement embryonnaire (Patten 1920). Il participe au métabolisme de l'embryon, en stockant les déchets, en permettant la respiration de l'embryon et en participant au processus de transfert de calcium provenant de la coquille vers l'embryon. Le fluide allantoïque est en conséquence composé en grand partie par des excréments de l'embryon. Il concentre de l'azote, de l'ammonium et de l'acide urique (Baggott 2001).

### II.3.2. Développement embryonnaire du canard mulard

Le canard mulard, est un hybride provenant du croisement inter générique entre le canard de Barbarie (*Cairina moschata*) et une cane commune (*Anas platyrhynchos*). Il s'agit d'un hybride viable mais infertile, qui est très valorisé dans la filière « foie-gras ». En effet, le canard mulard produit des foies gras lourds et de bonne qualité. Il est aussi reconnu pour sa facilité d'élevage, et sa capacité au gavage. Son utilisation massive, depuis les années 1985 est due au développement de l'insémination artificielle des canes, car l'obtention de canetons par l'accouplement naturel des parents de genres différents était très rare. En 2004, plus de 90 % du foie gras produit en France provient des canards mulards mâles exclusivement (Brun et al. 2005).

Le développement embryonnaire du canard mulard a une durée de 30 jours, de la ponte jusqu'à l'éclosion, à la différence d'un œuf de poule dont l'éclosion a lieu le 21<sup>ème</sup> jour d'incubation. Les chercheurs de l'INRA de Bordeaux ont fait une étude comparative des développements embryonnaires du canard de Barbarie (*Carina Moschata*), du canard de Pékin (*Anas platyrhynchos*) et de leur hybride, le canard mulard (Cornuez et Pain 2015). La Figure 3 montre un résumé des principaux changements au cours du développement embryonnaire du canard mulard.

Pendant les premiers jours de développement embryonnaire, une des principales évolutions des structures de l'œuf est le réseau sanguin placé dans la surface du sac vitellin. Il accroît comme montrer dans le tableau 1.

Jour	Surface réseau sanguin mm <sup>2</sup>
2	879,11
3	955,90
4	2611,56
5	3418,07

Tableau 1 : surface du réseau sanguin

De plus le canard mulard présente une caractéristique particulière, il s'agit d'un dimorphisme sexuel qui est dû au phénotype *albinos* dont les yeux sont pigmentés noir pour les mâles et rouges pour les femelles (Gourmaud et al. 2014). Cette caractéristique est visible au 8<sup>ème</sup> jour d'incubation.

Dans ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés aux stades précoces du développement embryonnaire, car la détermination du sexe doit se faire avant le 15<sup>ème</sup> jour d'incubation pour éviter la souffrance chez l'animal, et durant le premier tiers

(avant le 10<sup>ème</sup> jour) pour avoir une solution économiquement intéressante pour l'industrie agro-alimentaire.

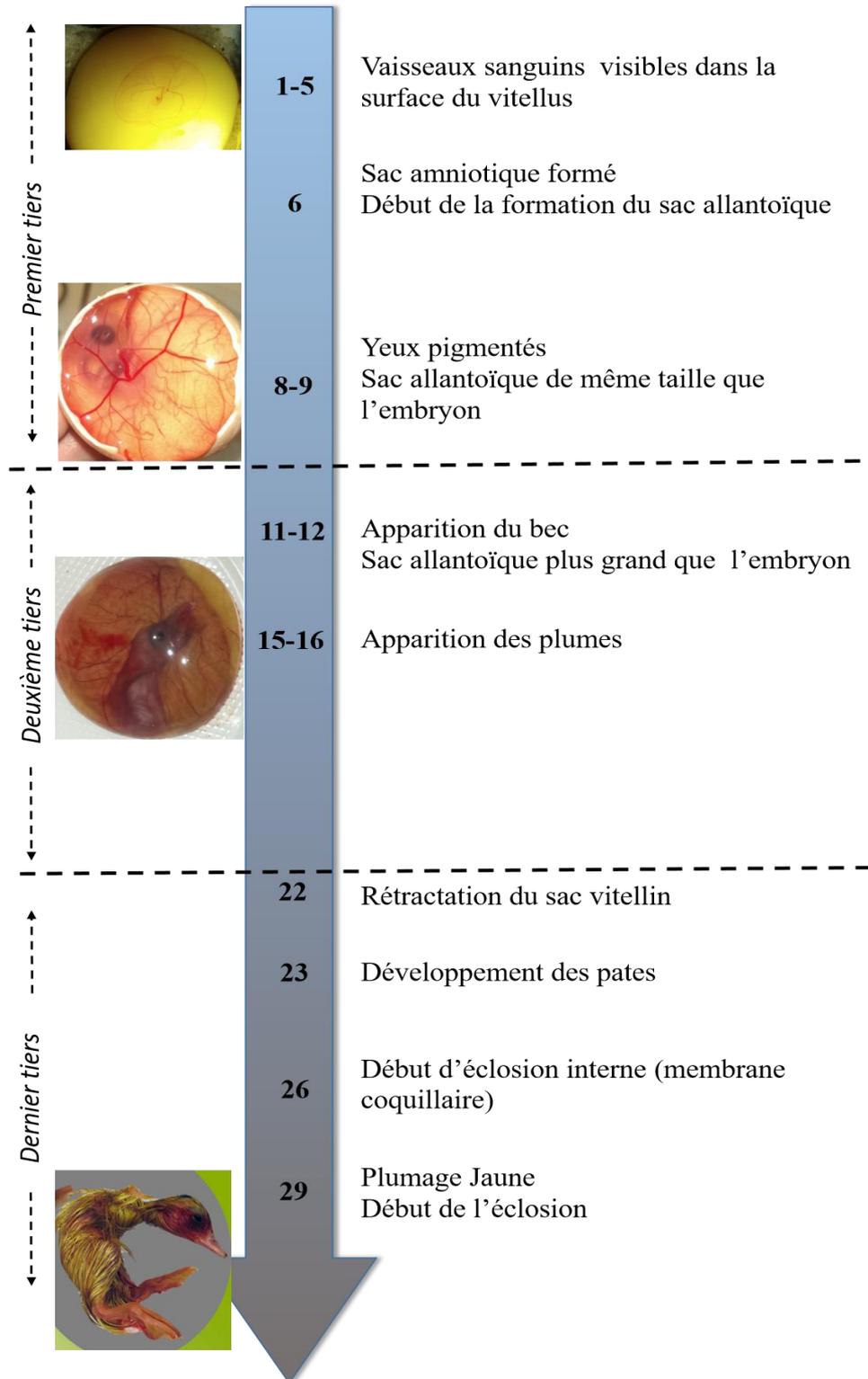


Figure 3 : Développement embryonnaire du canard mulard d'après (Cornuez et Pain 2015).

Pendant le développement embryonnaire aviaire, les différentes structures présentes dans l'œuf subissent des transformations. Ces changements sont liés les uns avec les autres et pourraient se présenter différemment selon le sexe de l'embryon. De plus, ces différences pourraient être détectées avec la spectroscopie RF. Les techniques existantes actuellement pour le sexage des œufs utilisent, entre autres, la concentration d'hormones présente dans le fluide allantoïque ainsi que l'information génétique présente dans les cellules du disque germinale comme sources d'information pour identifier le sexe de l'embryon. Nous avons alors étudié l'état de l'art des différentes techniques utilisées actuellement pour le sexage précoce des œufs ainsi que les techniques RF utilisées pour l'évaluation de la fraîcheur des œufs de consommation.

## III. TECHNIQUES EXISTANTES POUR LE SEXAGE DES OEUFS

Divers travaux ont été réalisés pour déterminer le sexe d'un embryon dans un état précoce de développement. La plupart des inventions connues utilisent des techniques du domaine de l'optique, en explorant un spectre large en fréquence. Des techniques biochimiques ont aussi été utilisées. L'ensemble de ces travaux est décrit dans cette partie avec une distinction pour les techniques invasives et celles semi voire non invasives.

### III.1. TECHNIQUES INVASIVES

#### Technique d'analyse chromosomique par imagerie infra-rouge

Une première technique est basée sur l'analyse de l'information génétique contenue dans le disque germinale. En effet, aux premiers jours du développement embryonnaire aviaire, entre 40 et 60 mille cellules blastodermiques sont présentes dans l'œuf formant le disque germinale (Ellendorf et Klein, S 2003). Ces cellules contiennent l'information génétique dont les chromosomes sexuels se présentent pour les femelles dans la forme ZW et ZZ pour les mâles (Crawford 1990).

Les chercheurs de l'Université de Leipzig, en Allemagne, ont été capables de reconstruire l'information chromosomique d'un œuf par technique d'imagerie infra-rouge à partir d'un échantillon de cellules blastodermiques au jour 0, avant incubation (Steiner et al. 2011). Pour cela, une ouverture de 1 cm de diamètre dans la coquille de l'œuf est nécessaire pour pouvoir visualiser le disque germinale. Ensuite 1 µg de cellules blastodermiques est prélevé et mesuré par spectroscopie infra-rouge (Figure 4.a). L'image des chromosomes présents dans les cellules blastodermiques est ensuite reconstruite par imagerie FT-IR (Figure 4.b). Le contenu d'ADN des cellules des mâles (ZZ) est 2% plus grand que celui des femelles (ZW). Cette méthode est invasive car elle implique l'ouverture de la coquille et le prélèvement du contenu de l'œuf, ce qui peut avoir un impact négatif dans le développement embryonnaire. Des contaminations sont ensuite possibles entraînant une diminution du taux d'éclosion. De plus l'ouverture de l'œuf rajoute un temps supplémentaire à la procédure de mesure.

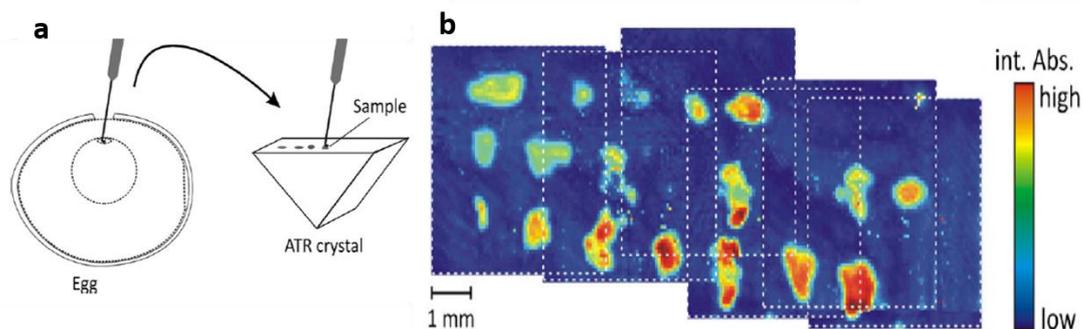


Figure 4 : a) schéma du prélèvement de cellules blastodermiques du disque germinifère, b) reconstruction de l'image par spectroscopie FT-IR des échantillons des cellules blastodermiques (Steiner et al. 2011).

### Analyse de vaisseaux sanguine par spectroscopie de Raman et spectroscopie fluorescente

Une deuxième technique est basée sur l'analyse des vaisseaux sanguins aux premiers jours d'incubation par spectroscopie de Raman et spectroscopie fluorescente (Galli et al. 2016). Entre le troisième et quatrième jour du développement embryonnaire les vaisseaux sanguins forment à la surface du sac vitellin un cercle d'environ 3 cm de diamètre (voir Figure 5b). Lorsque l'œuf est en position verticale les vaisseaux sanguins se déplacent vers la partie haute de l'œuf (Klein et al. 2002).

La méthode utilisée implique une ouverture de la coquille d'un diamètre entre 12 et 15 mm avant incubation. L'œuf est ensuite recouvert avec un para-film biocompatible qui permet la continuation du développement embryonnaire. Cette procédure évite le prélèvement des cellules blastodermiques, mais ajoute une ouverture de la coquille plus importante (Figure 5).

Avec cette méthode deux études ont été menées. Une première en utilisant la spectroscopie de Raman permettant de prédire le sexe d'un embryon au jour 3.5 d'incubation (17% du développement embryonnaire) avec un taux de réussite de 90%, e. Pour cette étude ils ont mesuré 165 œufs dont 36 ont été utilisé pour entraînement de l'algorithme de classification. Une deuxième étude a été faite afin de diminuer le temps de mesure à 10 min et de diminuer le diamètre de l'ouverture de la coquille de 15mm à 12mm. La spectroscopie fluorescente est alors utilisée, avec une source de lumière plus intense et avec un spectre plus large. Les spectres mesurés pour 380 œufs ont été séparés en deux groupes dont 190 pour l'apprentissage et 190 pour les tests d'analyse de données en composante principale (PCA). Avec cette méthode ils ont été capables de prédire le sexe de l'embryon avec un taux de réussite de 93% au jour 3.5 d'incubation (Figure 6).

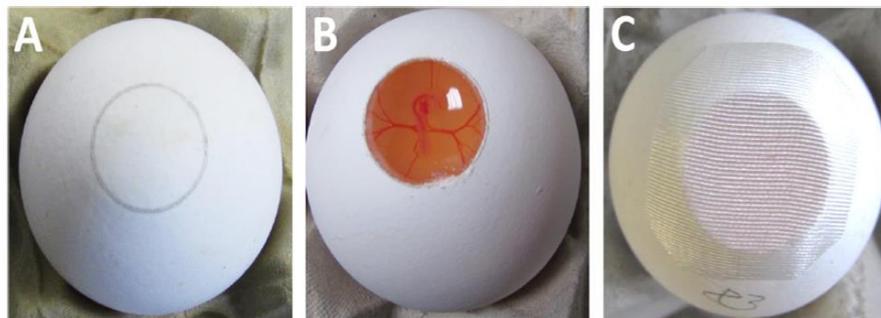


Figure 5 : A),B) et C) Processus d'ouverture et de recouvrement de l'œuf d'après (Galli et al. 2016).

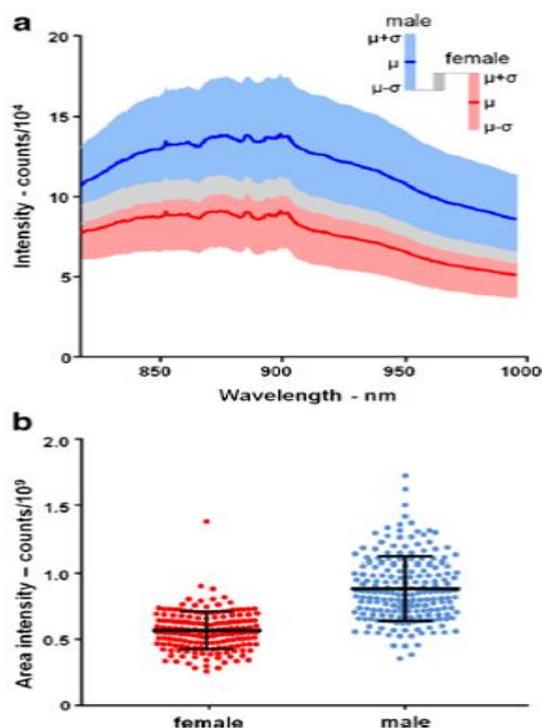


Figure 6 : Résultats d'après (Galli et al. 2016) A) Spectre des vaisseaux sanguins des œufs femelles (rouge) et males en (bleu). B) Surface total d'intensité calculée.

Le fait de percer la coquille rend cette technique peu acceptable à grande échelle car elle ajoute du temps de manipulation pour percer et recouvrir chaque œuf, en plus d'augmenter le risque de contamination de l'œuf avec une conséquente diminution du taux d'éclosion. Le taux d'éclosion observé est de 91% par rapport aux œufs maintenus dans les mêmes conditions d'incubation mais sans ouverture de la coquille.

### Quantification hormonale par analyse chimique

Une autre méthode de sexage a été proposée par (Weissmann et al. 2013). Elle consiste à analyser les concentrations d'hormones présentes dans le fluide allantoïque. Un échantillon de l'ordre de 20 à 50  $\mu\text{L}$  est prélevé avec une seringue de 0.5mm de diamètre (Figure 7 à gauche). Ils ont trouvé une différence de concentration de sulfate d'estrone associé au sexe de l'embryon, visiblement plus faible dans le liquide allantoïque des mâles (Figure 7 à droite). Ce contraste permet, en utilisant des traitements statistiques classiques, de prédire le sexe de l'embryon avec un taux de réussite de 95% au 10<sup>ème</sup> jour d'incubation (40% du développement embryonnaire). Cependant, le temps d'analyse pour chaque échantillon (environ quatre heures) reste trop long pour une application à grande échelle. De plus, ils ont observé un taux d'éclosion 3% plus bas pour le groupe des œufs analysés par cette méthode.

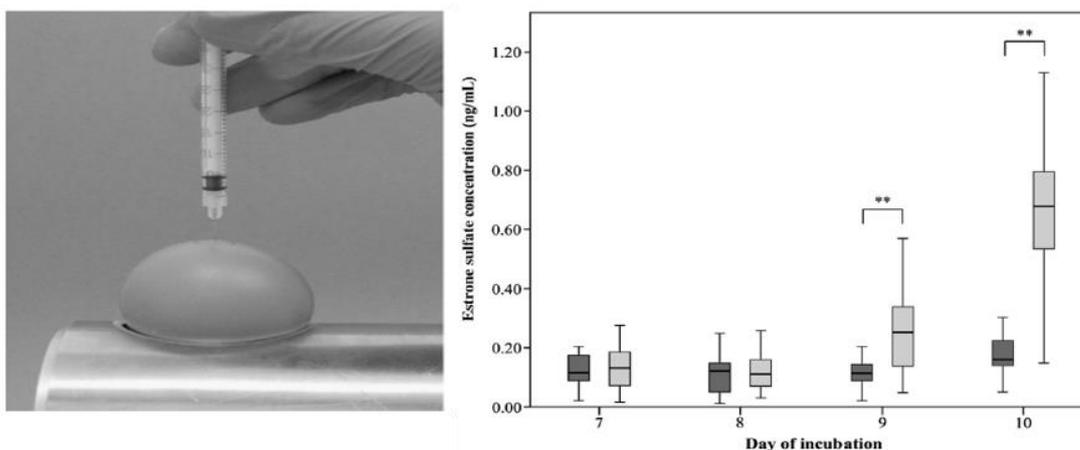


Figure 7 : Procédure de prélèvement du liquide allantoïque à gauche, et résultats des concentrations de sulfate d'estrone en gris clair pour les femelles et gris foncé pour les mâles en fonction du jour d'incubation d'après (Weissmann et al. 2013).

### *Utilisation de biomarqueurs par modification génétique*

Une autre technique a été développée par l'industriel eggXYt permettant de prédire le sexe de l'embryon avant incubation. Il s'agit d'une modification génétique de la poule pondeuse afin que les œufs mâles soient pondus avec un biomarqueur dans le chromosome Z (Offen 2019). Ce biomarqueur (luciférase) est bioluminescent et donc visible avec un éclairage de l'œuf (cf. Figure 8). Les œufs femelles (gardés dans les couvoirs des poules pondeuses) ne sont pas modifiés génétiquement. Cependant le caractère OGM rend cette technique peu acceptable du point de vue éthique pour la société et les consommateurs. Jusqu'à présent il n'y a pas de résultats de sexage publiés en utilisant cette technique.

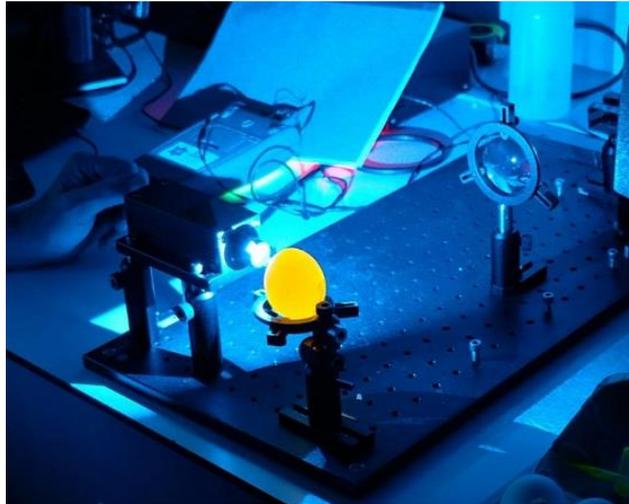


Figure 8 méthode détection œuf mâle eggXYt (Verma s. d.)

## III.2. TECHNIQUES NON INVASIVES

### *Détection de la couleur de plumes par imagerie hyper-spectrale*

La société Allemande EVONTA (Göhler, Fischer, et Meissner 2016) utilise une technique d'imagerie hyper-spectrale afin de détecter la couleur des plumes d'un embryon d'une souche particulière de poulet, laquelle présente un dimorphisme sexuel dans la couleur des plumes (marron pour les femelles et jaune pour les mâles). Les plumes sont visibles à partir du 11<sup>ème</sup> jour d'incubation. Pour chaque mesure, ils utilisent une lampe halogène d'un côté de l'œuf et une caméra hyper spectrale de l'autre (Figure 9). Ultérieurement, une procédure statistique de données est appliquée. Sur un total de 481 spectres mesurés, 244 ont été utilisé pour l'apprentissage de l'algorithme de classification et le reste pour la validation. Ils sont capables de prédire le sexe des embryons avec un taux de 97% au 14<sup>ème</sup> jour d'incubation (7 jours avant éclosion). Cette étude propose une technique non invasive avec un taux de réussite très élevé. Malheureusement, le 14<sup>ème</sup> jour d'incubation chez le poulet (soit au 2 tiers du processus de développement embryonnaire) est un stade trop tardif pour éviter la souffrance chez l'embryon. Un embryon ressent la douleur à partir de la deuxième moitié d'incubation (Close et al. 1997), donc cette solution n'est pas acceptable du point de vue du bien-être animal. De plus, le temps de mesure et le processus de classification par l'algorithme prend considérablement de temps et rend cette technique inadaptée pour une application à grand échelle.

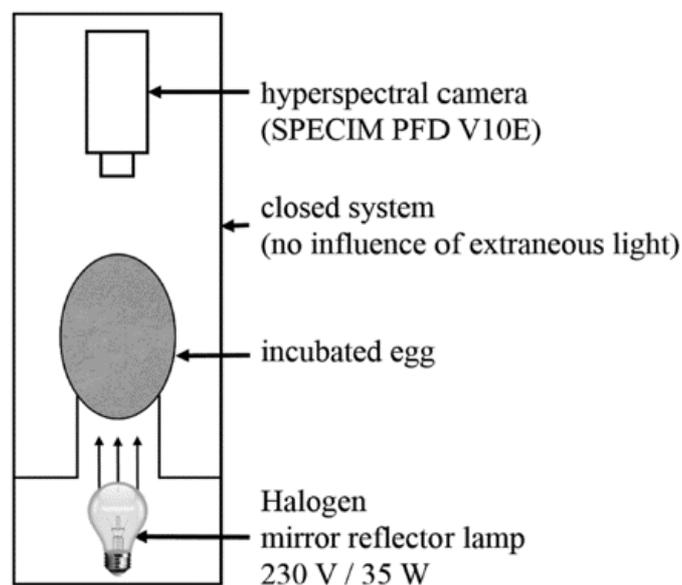


Figure 9 : système de mesure des œufs par imagerie hyper spectrale d'après (Göhler, Fischer, et Meissner 2016)

### *Analyse par chromatographie gazeuse et spectroscopie THz*

Un dispositif a été récemment breveté par la compagnie Novatrans permettant de capturer les molécules organiques présentes dans le gaz à proximité de la coquille d'un œuf afin d'identifier le sexe de l'embryon dans un œuf (Knepper et al. 2019). Il est composé d'une pompe à vide permettant d'aspirer le gaz à proximité d'un œuf et d'une membrane permettant de capturer les particules organiques volatiles, présentes dans le gaz. Ensuite, les échantillons collectés sont analysés par spectroscopie Tera-hertz. L'hypothèse émise est que l'échange gazeux entre l'intérieur de l'œuf et l'extérieur à travers les pores de la coquille contient des particules organiques nous permettant de différencier un œuf mâle d'un œuf femelle quelques jours après sa ponte (avant incubation). Il s'agit donc d'une technique non-invasive apte pour une application à grande échelle. Cependant, le temps du processus, de la collecte de particules jusqu'à la spectroscopie et le post traitement de data pour chaque œuf peut être élevé. Jusqu'à présent, il n'a pas de résultats publiés utilisant cette technique.

### *Synthèse des techniques existantes pour le sexage des œufs*

Le Tableau 2 résume les différentes techniques, décrites précédemment dans ce chapitre, pour le sexage des œufs tenant compte du jour d'incubation (**J**) auquel le sexe de l'embryon est relevé, du taux de réussite (**R**) du sexage, et du temps estimé de mesure par œuf.

	Technique	Méthode	J	R	Temps /œuf
1	Analyse chromosomique par <b>imagerie infra-rouge</b>	- <b>Ouverture œuf</b> ( $\phi=1$ cm) - <b>Prélèvement</b> des cellules blastodermiques (1 $\mu$ g)	0	x	<b>Élevé</b> >10 min*
2	Analyse vaisseaux sanguins par <b>spectroscopie de Raman et Fluorescente</b>	- <b>Ouverture œuf</b> ( $\phi=12-15$ cm)	3.5	93	Court~ 1 min
3	<b>Quantification hormonale</b> pour analyse chimique	- <b>Prélèvement</b> fluide allantoïque (20-50 $\mu$ L) - <b>Perçage œuf</b> avec seringue ( $\phi=0.5$ mm)	10	95	<b>Élevé ~ 4h*</b>
4	Détection couleur de plumes par <b>imagerie hyper spectrale</b>	- Reconstruction d'image : collecte de spectres et traitement donnés - <b>Non-invasive</b>	14	97	<b>Élevé</b>
5	<b>Biomarqueur</b> par <b>modification génétique</b>	- Biomarqueur luminescente chez les œufs mâles. <b>Modification génétique poules pondeuses</b>	0	?	Court~ 1 min*
6	Analyse gazeux par <b>spectroscopie Tera-Hertz</b>	- Capture des particules organiques présent dans le gaz en proximité de l'œuf. - <b>Non-invasive</b>	0	?	<b>Élevé*</b>

Tableau 2 récapitulatif techniques existante pour sexage des œufs

\*Temps estimé, non précisé par les auteurs

La plupart des travaux précédemment décrits pour le sexage des œufs utilisent des techniques du domaine de l'optique. Ceci implique des contraintes mécaniques liées à la précision requise afin de viser l'objective (dans l'œuf) avec un faisceau lumineux. Cette précision dépend de la longueur d'onde utilisée. Plus la longueur d'onde est petite plus de précision est requise. Nous avons donc classifié les techniques, numérotés dans le Tableau 2, en fonction de la longueur d'onde utilisée et en fonction du temps de mesure requis

comme est montré dans la Figure 10. Dans ce graphe nous avons placé la spectroscopie RF ayant une longueur d'onde d'une dizaine des millimètres ainsi qu'un temps très court de mesure ( $< 1$  m). De plus, il s'agit d'une technique non-invasive.

Il est à noter que les techniques 3 et 5 n'utilisent pas de techniques optiques, cependant il s'agit de techniques semi-invasives.

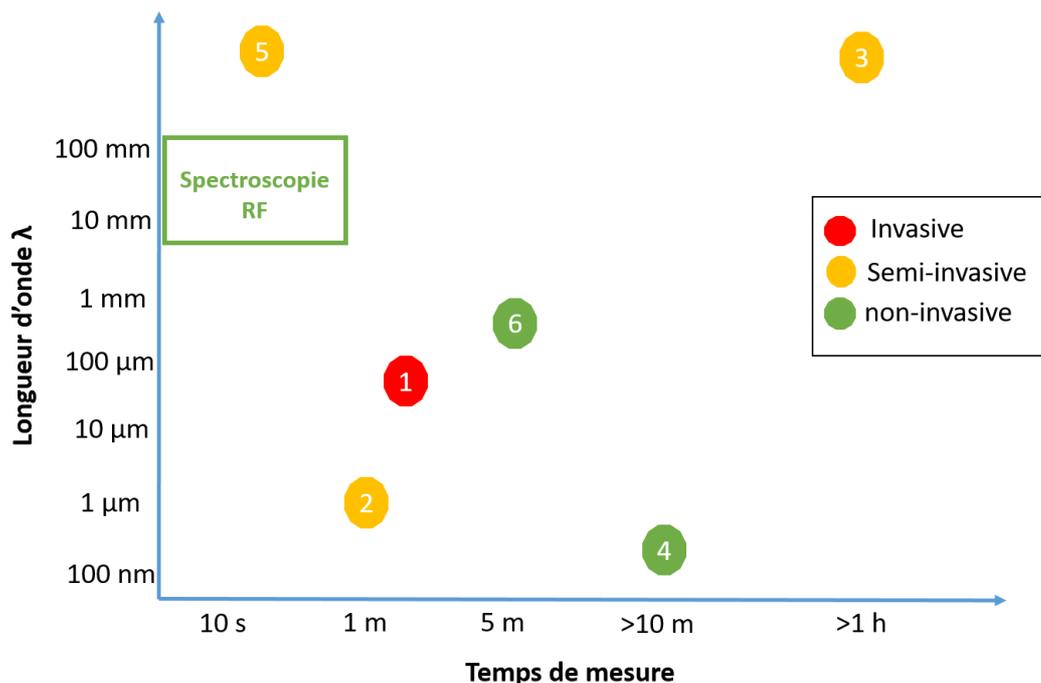


Figure 10 Classification des techniques de sexage en fonction de la longueur d'onde et le temps de mesure

Parmi les techniques existantes pour le sexage des œufs la plage de fréquences RF (30 KHz - 60 GHz) n'a pas été utilisée. Cette plage de fréquences évite la contrainte mécanique des techniques optiques et implique des coûts de fabrication considérablement plus bas.

Diverses études ont utilisé la spectroscopie RF pour l'analyse des œufs destinés à la consommation afin de déterminer leur fraîcheur et leur contenu protéique entre autres. Ces travaux sont décrits dans le paragraphe IV de ce chapitre.

## IV. TECHNIQUES EXISTANTES POUR L'ANALYSE RF DE LA QUALITE DES ŒUFS

Jusqu'à présent la spectroscopie RF n'a pas été utilisée pour le sexage des œufs. En revanche diverses études ont été faites en utilisant les ondes RF pour déterminer la qualité des œufs destinés à la consommation.

Afin de mieux comprendre les enjeux techniques impliqués dans l'analyse RF des œufs nous allons décrire, dans un premier temps et de façon concise qu'est-ce que la spectroscopie RF ainsi que la façon de quantifier la qualité des œufs dans l'industrie agroalimentaire.

### IV.1. SPECTROSCOPIE DIELECTRIQUE RADIOFREQUENCE

La spectroscopie diélectrique radiofréquences est une technique non-invasive qui permet de mesurer les propriétés diélectriques d'un matériau à l'état liquide, solide, ou gazeux. La technique consiste à envoyer une onde électromagnétique dans la plage de fréquences RF (allant de 30KHz à 60 GHz) vers le matériau à analyser (voir Figure 11). L'onde propagée à travers le matériau (onde transmise) ainsi que l'onde réfléchiée par le matériau sont modifiées en amplitude et en phase en fonction des propriétés diélectriques du matériau définies par sa constante diélectrique ou permittivité  $\epsilon$ . Les propriétés diélectriques d'un matériau dépendent de sa composition biochimique et de ses caractéristiques physiques

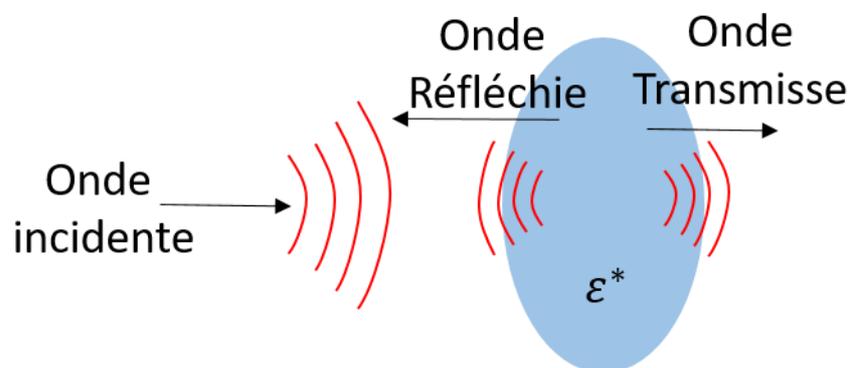


Figure 11 schéma de spectroscopie diélectrique RF

Les propriétés diélectriques des matériaux sont représentées par sa permittivité complexe  $\varepsilon^* = \varepsilon' - j\varepsilon''$  dont la partie réelle ( $\varepsilon'$ ) représente la capacité du matériel de stocker l'énergie électromagnétique et la partie imaginaire ( $\varepsilon''$ ) représente les pertes de cette énergie en forme de chaleur.

La spectroscopie RF a été utilisée dans de nombreux contextes applicatifs tels que la mesure d'humidité du sol ou la détection de canalisation de par sa forte sensibilité à l'eau (Kupfer 2006), ou encore pour vérifier la qualité de matériaux dans l'agriculture, la nourriture et autres.

## IV.2. INDICES DE QUALITE DES ŒUFS

Dans l'industrie agro-alimentaire, c'est une nécessité de déterminer de façon précise la qualité des œufs de consommation, donc non fertilisés, pendant leur stockage. Des indices de qualité biologiques et physiques existent pour quantifier la fraîcheur et la richesse protéique des œufs telles que :

- **Humidité**, ou teneur en eau d'un œuf comme un indice de fraîcheur de l'œuf.
- **Temps de stockage**, lié directement à la teneur en eau et donc à la fraîcheur de l'œuf.
- **Air cell heigh** : la hauteur de la poche d'air est aussi un indice de qualité de l'œuf, associé à la fraîcheur et aux temps de stockage de l'œuf. Elle est mesurée comme est indiqué sur la Figure 12a.
- **Haugh Unit (HU)** : en français « Unité de Haugh », basé sur l'épaisseur de l'albumen d'un œuf cassé et mis sur une surface plane, qui se situe autour du jaune (Haugh 1937), voir Figure 12b. C'est un indicateur de la viscosité du blanc.
- **Yolk Index (YI)** : en français « Indice de Jaune », c'est le rapport entre la hauteur et le diamètre du jaune d'un œuf cassé et mis sur une surface plane (Funk 1948). C'est un indicateur de la richesse protéique du jaune.

Pendant le temps de stockage, les œufs subissent des changements physiologiques, tels que la liquéfaction du blanc, l'augmentation du pH, l'aplanissement du jaune et l'accroissement de la poche d'air (E. Li-Chan 1989).

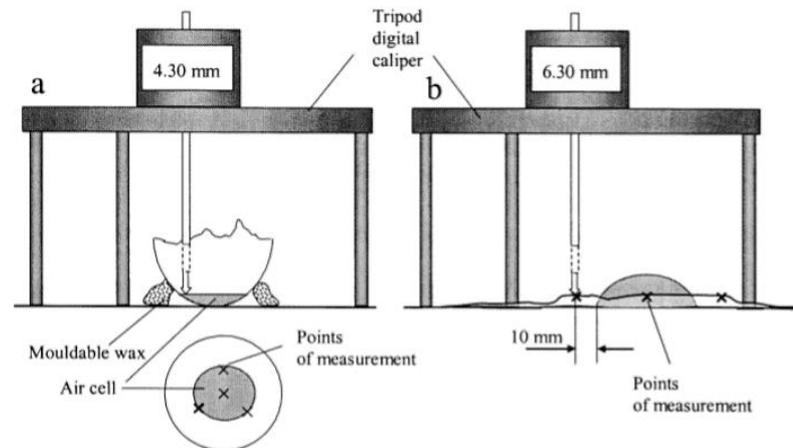


Figure 12 : Méthode de mesure de la taille de la poche d'air et de l'épaisseur du blanc "Haugh Unit" (L. Ragni et al. 2007)

### IV.3. ANALYSES RF INVASIVES

Des études préliminaires ont été menées afin d'étudier les propriétés diélectriques du jaune et de l'albumen, pour déterminer des indices de qualité des œufs indicateurs de la fraîcheur, et du contenu protéique. Il s'agit des méthodes invasives qui impliquent l'ouverture de l'œuf.

Les chercheurs du département d'agriculture aux Etats-Unis ont mesuré les propriétés diélectriques du jaune et de l'albumen d'œufs stockés pendant 5 semaines. Parallèlement des indices de qualités des œufs ont été mesurés avec des procédures mécaniques et biochimiques (Trabelsi et al. 2007).

Pour les mesures diélectriques, une ligne coaxiale à circuit ouvert a été utilisée dans la plage de fréquences de 10 MHz à 1800 MHz. Chaque œuf a été cassé et ouvert dans une surface plane pour mesurer les indices YI et HU au préalable. Ensuite le jaune et le blanc ont été séparés pour les mesures RF.

Les résultats obtenus montrent en général que la permittivité diminue en fonction de la fréquence pour le jaune et le blanc. De plus la valeur mesurée est supérieure pour le blanc. Ceci est dû au fait que la teneur en eau dans le blanc est supérieure à celle du jaune. De plus, la partie réelle de la permittivité du jaune et du blanc présentent une bonne corrélation avec les valeurs des taux d'humidité. Cependant le facteur de pertes ( $\epsilon''$ ) reste peu sensible. Pour les indices HU et YI la partie réelle de la permittivité semble légèrement sensible alors que la partie imaginaire (pertes diélectriques) reste peu sensible.

Une étude similaire a été faite par (Luigi Ragni et al. 2007) afin de mesurer les propriétés diélectriques du jaune et du blanc des œufs en stockage destinés à la consommation. Pour cela, chaque œuf a été cassé et le jaune et le blanc ont été séparés. Des mesures d'indices de qualité tels que le pH, l'humidité, HU, YI, entre autres, ont été faites. Ensuite, des mesures RF ont été réalisées avec une sonde coaxiale en circuit ouvert dans la plage de fréquences de 20 à 1800 MHz. Les liquides de l'œuf ont été mesurés à différents jours de stockage, et des coefficients de corrélation ont été calculés entre les propriétés diélectriques mesurées et les indices de qualité de l'œuf.

Les résultats obtenus montrent une bonne corrélation entre le temps de stockage et les propriétés diélectriques de l'albumen ( $R^2 = 0.98$ ) à 20 MHz tandis que le jaune présente une augmentation continue et significative de la permittivité (de l'ordre du 20%) à 400 MHz pour la partie réelle et à 20 MHz pour la partie imaginaire en fonction du temps de stockage. Ils ont obtenu un coefficient de corrélation entre la constante diélectrique du jaune et la teneur en eau (humidité) de  $R^2 = 0.965$  à 20 MHz et  $R^2 = 0.95$  à 1800 MHz. Nous pouvons attribuer ce résultat à la forte sensibilité des RF à la teneur en eau surtout aux basses fréquences pour lesquelles la permittivité de l'eau est très élevée. De plus, des échanges d'eau entre le blanc et le jaune ont lieu pendant la période de stockage. Cependant ces explications n'ont pas été évoquées dans ce travail.

Ces études montrent que la spectroscopie RF peut être utilisée comme technique de mesure des indices de qualité des œufs propres à la consommation. Ces études restent néanmoins limitées car elles sont réalisées de façon invasive. De plus, il serait intéressant de pouvoir mieux comprendre ce qui est à l'origine des modifications des propriétés diélectriques et de les corréler à des changements de composition chimique ou autres transformations au cours du stockage.

La procédure invasive de casser l'œuf pour mesurer ses liquides constitutifs n'est donc pas envisageable pour une exploitation économique et donc une solution non invasive doit être étudiée.

## **IV.4. ANALYSES RF NON-INVASIVES**

### **Utilisation d'une sonde coaxiale terminée par un circuit ouvert**

Les chercheurs de l'Université de Bologne ont fait 3 travaux différents pour mesurer de façon non-invasive les indices de qualité des œufs en utilisant différentes techniques RF dans différentes bandes de fréquences.

En 2007, ils ont utilisé une sonde coaxiale à circuit ouvert, pour mesurer les propriétés diélectriques des œufs, dans la bande de fréquences entre 10 MHz et 1800 MHz en posant la sonde coaxiale sur la coquille de l'œuf (L. Ragni et al. 2007). Trois différentes zones de l'œuf ont été mesurées, comme illustré dans la Figure 13.

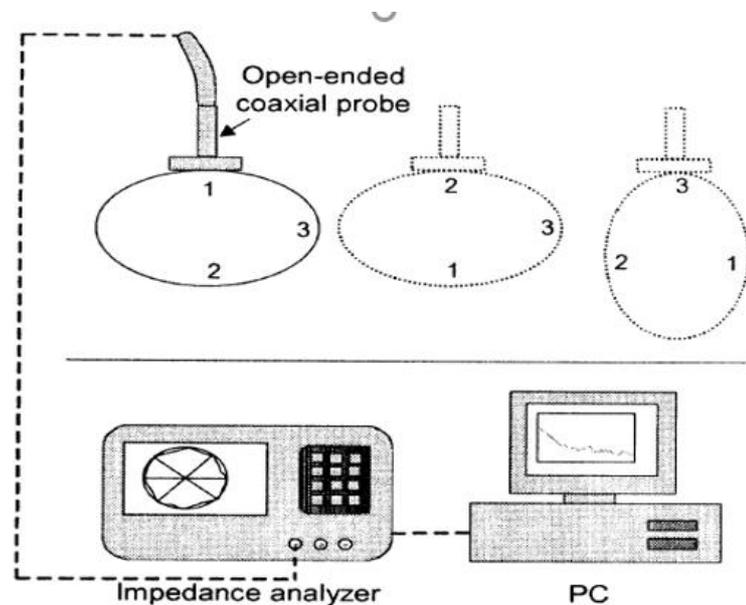


Figure 13 : Système de mesures RF par sonde coaxiale d'œufs (L. Ragni et al. 2007)

Les constantes diélectriques mesurées ont été corrélés par <<Partial Least Squares regression>> (PLS) aux différents indices de qualités, lesquelles ont été mesurés de façon destructive après mesures RF. Les coefficients de corrélation obtenus sont respectivement de 0.92 et 0.98 pour la hauteur de la poche d'air et l'âge de stockage dans la bande de 300-700 MHz, tandis que pour les autres indices de qualité, les coefficients calculés sont respectivement de 0.7 et 0.6 pour HU et YI dans les bandes 10-700 MHz et 10-300 MHz.

### Utilisation d'une capacité à 2 plaques parallèles

Un système différent a été utilisé pour la mesure RF d'œufs (Luigi Ragni, Berardinelli, et Guarnieri 2008). Dans cette procédure, l'œuf est placé au milieu de deux plaques parallèles capacitatives (comme sur la Figure 14), connectées à un circuit différentiel qui permet de mesurer la différence d'amplitude et de phase des deux entrées, dans une bande de fréquences allant de 50 à 500 MHz. Des corrélations ont été faites entre le spectre mesuré et des indices de qualités des œufs à différents jours de stockage en utilisant des modèles statistiques comme PLS (*partial least square*). Des coefficients de corrélation de  $R^2 = 0.99$  pour le temps de stockage est obtenue, de  $R^2 = 0.8$  pour la taille de la poche d'air (*air cell height*), et une corrélation faible de  $R^2 < 0.68$  pour YI et HU.

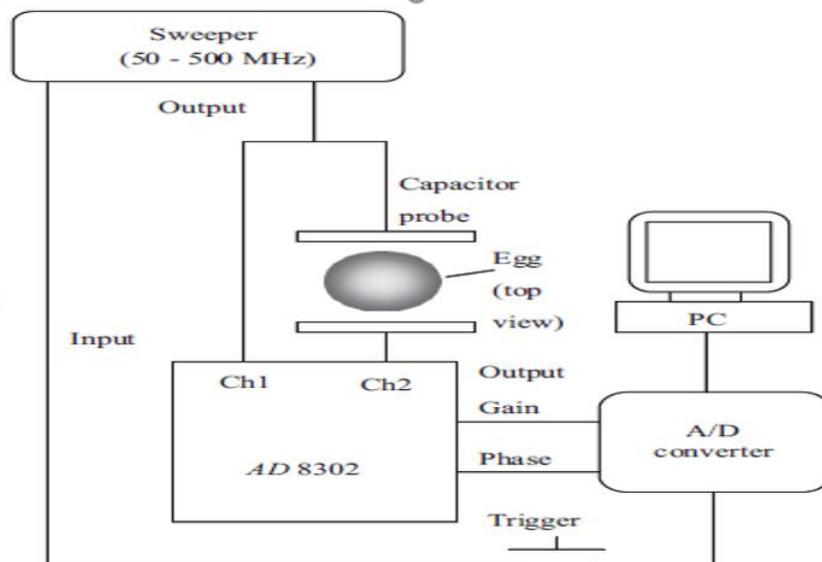


Figure 14 : schéma du système de mesure RF capacitive d'œufs (Luigi Ragni, Berardinelli, et Guarnieri 2008)

### Utilisation d'un guide d'onde rectangulaire

Dans une autre étude, un guide d'onde rectangulaire a été utilisé comme système de mesure non-invasif d'œufs (comme indiqué sur la Figure 15), dans une plage de fréquences entre 0.01 et 22 GHz (Luigi Ragni, Cevoli, et Berardinelli 2010). L'œuf est introduit dans le guide d'onde et deux antennes (transmission et réception) sont introduites de chaque côté de l'œuf dans le guide d'onde. Le signal reçu est ensuite envoyé à un ordinateur pour traiter les données afin de corréler les spectres obtenus avec des indices de qualité des œufs. Une forte corrélation a été obtenue entre 10.5 GHz et 11.5 GHz pour la taille de la poche d'air  $R^2 = 0.92$ , et  $R^2 = 0.85$  et  $R^2 = 0.9$  pour HU et YI respectivement.

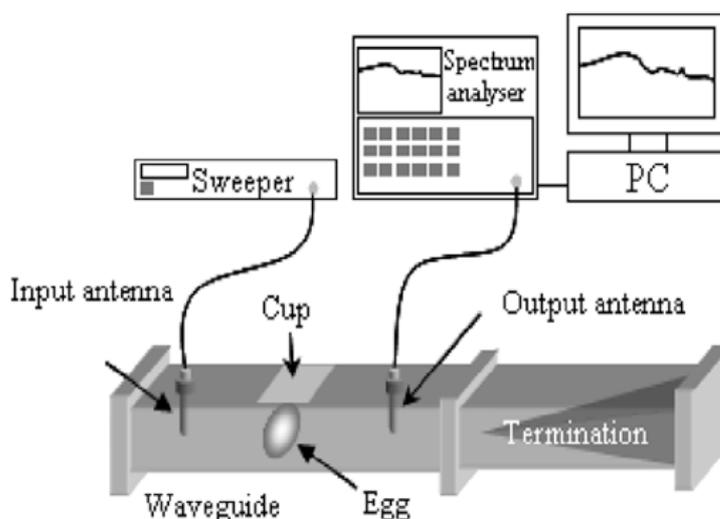


Figure 15 : schéma du système de mesure RF par guide d'onde rectangulaire d'œufs (Luigi Ragni, Cevoli, et Berardinelli 2010)

### Synthèse des techniques non-invasives pour l'analyse RF des œufs

Le Tableau 3 résume les techniques, précédemment décrites, en fonction du capteur utilisé pour la mesure RF des œufs, ainsi que les coefficients de corrélation ( $R^2$ ) obtenus pour les différents indices de qualité des œufs et la gamme de fréquence utilisée.

<i>Sonde / capteur</i>	<i>Indice de qualité</i>	<i><math>R^2</math></i>	<i>Gamme de fréquences</i>
<i>Sonde coaxial à circuit ouvert</i>	Temps de stockage	0.98	300-700 MHz
	Taille poche d'Air	0.92	300-700 MHz
	HU	0.7	10-700 MHz
	YI	0.6	10-300 MHz
<i>Plaques parallèles</i>	Temps de stockage	0.99	50-500Mz
	Taille poche d'Air	0.82	50-500 MHz
	HU	0.7	440-490 MHz
	YI	0.6	440-490 MHz
<i>Guide d'onde</i>	Taille poche d'Air	0.92	
	HU	0.85	10.5 - 11.5 GHz
	YI	0.9	

Tableau 3 Résumé des techniques de spectroscopie RF des œufs

Nous avons alors analysé les coefficients de corrélations des indices de qualité des œufs obtenus dans les différents travaux exposés, en fonction des gammes de fréquences utilisées (cf. Figure 16). Nous pouvons observer qu'à basse fréquence il y a une bonne corrélation pour le temps de stockage et la taille de la poche d'air. En effet ces deux indices sont liés à la teneur en eau d'un œuf présentant alors une forte sensibilité aux ondes RF en basses fréquences. Les indices YI et HU présentent une bonne corrélation aux fréquences plus hautes.

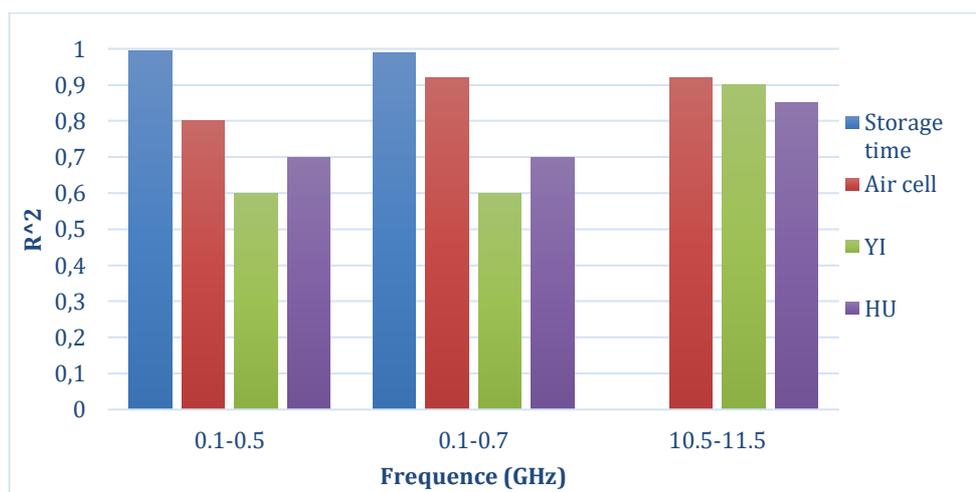


Figure 16 : Résumé des coefficients de corrélation en fonction de la fréquence pour différents indices de qualité des œufs obtenus dans les différents travaux mentionnés dans IV.4 du chapitre I.

Par ailleurs, nous constatons dans les travaux décrits précédemment, l'utilisation de capteurs classiques, que l'on trouve dans le marché, et qui n'ont pas été conçus spécialement pour la mesure des œufs. En conséquence, nous proposons d'utiliser la spectroscopie RF pour l'analyse des œufs en concevant des capteurs dédiés spécifiquement à la mesure des œufs, dans une plage de fréquences assez élevée (GHz) pour atteindre l'intérieur de l'œuf avec les ondes RF.

Nous allons ensuite analyser les enjeux techniques pour le sexage des œufs ainsi que les atouts de la spectroscopie RF pour l'analyse des entités biologiques, qui nous permettent de proposer l'utilisation de cette technique pour le sexage des œufs.

## V. SPECTROSCOPIE RF POUR LE SEXAGE DES ŒUFS

### Critères recherche de la solution technique de sexage d'œufs

Des critères ont été établis pour décrire une méthode idéale de sexage des embryons des poules pondeuses (Kaleta et Redmann 2008). Ces critères peuvent être interpolés aux sexage des œufs de canards, dont la technique de sexage proposé doit au moins satisfaire dans l'idéal les points suivants :

1. La méthode doit être appliquée avant incubation, ou bien dans des stades précoces d'incubation.
2. La méthode ne doit pas affecter la coquille ou l'intérieur de l'œuf.
3. La technique appliquée ne doit pas affecter négativement le développement embryonnaire.
4. Le coût des équipements nécessaires doit être suffisamment faible pour être économiquement rentable.
5. La méthode doit être appliquée à un grand nombre d'œufs (application à grande échelle).
6. Le temps de mesure de l'œuf doit être court.
7. La méthode appliquée doit être acceptable du point de vue bien-être animal.

### Positionnement de la spectroscopie RF pour le sexage précoce d'œufs

Si l'on considère les travaux précédemment cités, la spectroscopie diélectrique RF offre des potentialités intéressantes.

1. Cette technique, à la différence des techniques optiques envisagées pour le sexage des œufs, montre que la coquille de l'œuf ne représente pas une barrière aux ondes RF. De ce fait, cette technique pourrait constituer une solution non-invasive car il est possible de rayonner les ondes à l'intérieur de l'œuf sans nécessairement ouvrir la coquille.
2. Les champs applicatifs de la spectroscopie RF sont divers, elle est particulièrement très pertinente pour l'analyse des entités biologiques. Par exemple, elle a été utilisée pour la mesure de l'humidité du sol, dû à sa forte sensibilité au contenu d'eau (Kupfer 2006), aussi que pour la détection de

charbon dans des conduits, ou encore pour analyser des entités biologiques tels que tissus et cellules en suspension (Schwan 1994; Stuchly et al. 1982). Plus récemment, cette technique a été développée pour l'étude de molécules et cellules biologiques grâce à leurs propriétés diélectriques dans la plage de fréquences RF, en utilisant des dispositifs microfluidiques pour des applications biomédicales (Ning et al. 2014; Zedek, Dubuc, et Grenier 2017).

3. La spectroscopie RF a aussi été utilisée dans le domaine agro-alimentaire dont des travaux ont été menés pour mesurer la qualité et la fraîcheur de divers aliments de consommation tels que des fruits, légumes, céréales, ainsi que de la viande de porc (Nelson, Guo, et Trabelsi 2008; Reyes et al. 2018; Nelson et al. 2007; Redzwan et al. 2018; Ates, Ozen, et Carlak 2017; Nelson et al. 1999; Ji et al. 2010). En outre, diverses applications dans l'agriculture sont décrites dans Brodie, Jacob, et Farrell 2016, comme par exemple l'évaluation de qualité du bois, du sol, ainsi que l'utilisation des ondes RF pour le séchage des récoltes (fruits et légumes) et du bois, grâce aux molécules polaires de l'eau (Manickavasagan, Jayas, et White 2006; Setiady et al. 2009).
4. Le coût des équipements RF est en forte diminution, en raison du fort développement des applications grand public de transmission de données sans fil. Le coût ne devient donc plus un inconvénient et donc une application à grande échelle est économiquement envisageable.
5. Il s'agit d'une technique rapide dont le temps d'exposition aux ondes RF de l'entité à mesurer est très court (de l'ordre des millisecondes) et donc envisageable dans une application à grande échelle comme le sexage des œufs sans perturber le processus d'incubation.

En conséquence dans ce travail de thèse, nous proposons l'utilisation de la spectroscopie RF pour déterminer le sexe d'un embryon à l'intérieur d'un œuf. Le principe de fonctionnement de la méthode proposée consiste à rayonner des ondes dans le spectre RF (dans un premier temps entre 0.1 et 10 GHz) à l'intérieur d'un œuf et de mesurer ainsi l'énergie réfléchie et transmise dans l'œuf. Une onde électromagnétique est caractérisée par son amplitude (ou module) et sa phase ; tous deux étant dépendants du milieu de propagation. Dans ce cas, ce signal électromagnétique est modifié en amplitude et en phase au contact de l'œuf, dû aux propriétés biochimiques et physiques du contenu de l'œuf.

L'objectif est ici de trouver une signature dans le spectre du signal réfléchi, du signal transmis, ou bien d'un mélange des deux signaux, qui permettrait de différencier un œuf contenant un embryon mâle d'un œuf contenant un embryon femelle.

Le système de spectroscopie RF proposé pour le sexage des œufs est présenté dans la Figure 17, et il est composé par :

1. Un système d'illumination RF composé de 2 capteurs ; dédiés spécifiquement aux mesures des œufs, permettant d'envoyer les ondes vers l'œuf et de mesurer les ondes réfléchies et transmises.
2. Un Analyseur de Réseau Vectoriel (ARV) ; utilisé pour mesurer le coefficient de transmission et de réflexion des capteurs en contact avec l'œuf, dans un spectre large en fréquences (0.1 - 10GHz).
3. Un module de calcul sur ordinateur ; nécessaire pour traiter les différents spectres d'œufs, ainsi que la classification selon le sexe de l'embryon contenu dans l'œuf mesuré, par l'utilisation d'algorithmes basés sur des méthodes statistiques (par exemple sur les réseaux de neurones).

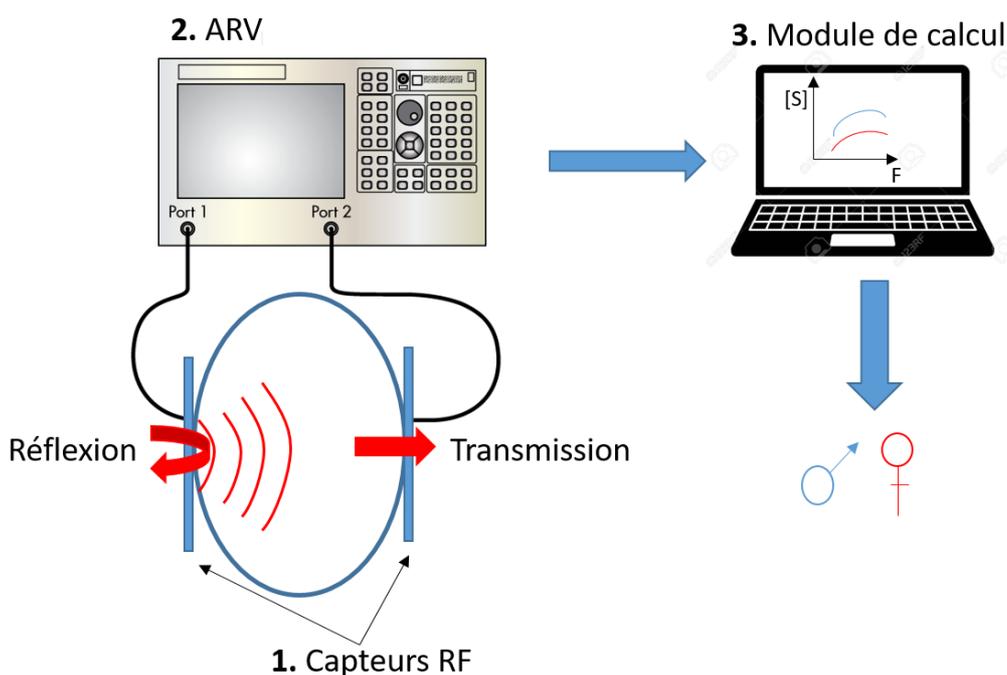


Figure 17 : schéma du système de spectroscopie RF d'un œuf proposé

### **Hypothèse sur le sexage des œufs**

L'hypothèse initialement émise est qu'il existerait des différences physiologiques ou biochimiques entre un œuf contenant un embryon mâle et un œuf contenant un embryon femelle. Ces différences seraient détectées à partir de propriétés diélectriques des œufs en utilisant la spectroscopie RF aux stades précoces du développement embryonnaire.

### **Méthode de recherche**

Dans un premier temps, nous allons étudier les propriétés diélectriques des différents liquides d'un œuf. Le but est de trouver une source, à l'intérieur de l'œuf, contenant l'information qui permettrait de différencier un œuf mâle d'un œuf femelle par spectroscopie RF. L'hypothèse étant ici qu'il existerait une différence de contenu biochimique dans les constituants d'un œuf permettant de différencier un œuf mâle d'un œuf femelle. Pour cela un dispositif de spectroscopie RF de liquides a été conçu (Jaques Gonzalez et al. 2019).

La deuxième phase de ce travail de thèse a été dédié à la conception d'un système non invasif de spectroscopie RF nous permettant d'analyser par spectroscopie RF la zone d'intérêt dans l'œuf. Pour cela des capteurs RF nous permettant d'envoyer les ondes dans l'œuf ont été conçus.

## VI. CONCLUSIONS

Dans ce chapitre, nous avons exposé les enjeux sociétaux du bien-être animal et les enjeux économiques associés à la problématique de sexage précoce d'œufs, qui ont motivé ce travail de thèse. Nous avons pour cela présenté l'évolution des différentes structures de l'œuf au cours du développement embryonnaire chez la poule, largement documenté, et enfin nous avons fait un descriptif des principaux stades du développement du canard mulard, espèce aviaire étudiée dans cette thèse.

L'état de l'art concernant les techniques existantes de sexage des œufs, a été aussi exposé. Dans la plupart des cas, il s'agit de méthodes invasives, qui peuvent avoir des effets négatifs dans le développement de l'embryon. Une solution non-invasive existe mais à un stade très avancé de développement embryonnaire, constituant ainsi une solution non acceptable du point de vue bien-être animal. Parmi les techniques envisagées, aucune ne fait mention de la spectroscopie diélectrique radiofréquences. Or cette technique a déjà montré des potentialités intéressantes pour mesurer la qualité d'œufs dédiés à la consommation. Cet état de l'art nous a donc permis de positionner notre proposition de technique de sexage in-ovo par spectroscopie diélectrique radiofréquences. Il s'agit d'une méthode non invasive, nécessitant un temps très court de mesure et des capteurs spécialement conçus pour la mesure d'œufs, avec une fréquence suffisamment haute pour que les ondes électromagnétiques puissent passer la coquille et pénétrer dans l'œuf.

La pertinence de cette technique réside sur une hypothèse, à savoir qu'il existerait une différence physiologique, ou biochimique entre un œuf contenant un embryon mâle et un œuf contenant un embryon femelle, qui pourrait se traduire par des propriétés diélectriques différentes des œufs. Ceci constitue 2 voies de recherche :

- L'une concerne l'étude des différents constituants de l'œuf par spectroscopie RF à différents stades de développement embryonnaire, afin de trouver une source contenant l'information qui permet de différencier un embryon mâle d'un embryon femelle à l'intérieur d'un œuf.

- L'autre correspond au développement d'une instrumentation de spectroscopie RF dédiée au sexage précoce et non invasif d'œufs. Les méthodes utilisées, les dispositifs conçus et les résultats obtenus pour ces deux axes, sont exposés dans les Chapitres 2 et 3 respectivement.



**CHAPITRE 2 :  
INSTRUMENTATION RF POUR  
L'ANALYSE RF DE LIQUIDES  
EX-OVO**

# I. INTRODUCTION

Afin de trouver une source biochimique qui permettrait de différencier un œuf contenant un embryon mâle d'un œuf contenant un embryon femelle, il nous est paru nécessaire d'avoir une instrumentation RF dédiée à l'analyse de liquides présentant un volume de quelques millilitres, comme c'est le cas pour les œufs. Ainsi, ce second chapitre de la thèse est dédié au développement d'une telle instrumentation RF. Pour cela un dispositif de spectroscopie RF de liquides a été conçu, permettant de mesurer les caractéristiques hautes fréquences de ces liquides, jusqu'à l'extraction de leurs propriétés diélectriques. Ce dispositif est ensuite exploité dans l'étude des différents liquides d'œuf dans la plage de fréquences radio.

Ainsi, dans ce deuxième chapitre, nous ferons d'abord un point sur d'une part l'étude des liquides constitutifs des œufs et d'autre part les dispositifs de spectroscopie RF existants pour l'analyse de liquides. Puis nous aborderons certains concepts théoriques de radiofréquences, nécessaires afin d'appréhender les techniques utilisées dans cette étude.

Nous décrirons dans un second temps le dispositif de spectroscopie RF millifluidique conçu pour l'étude de liquides des œufs, ainsi que les tests de validation effectués. Deux versions du dispositif seront décrites ( $V_1$  et  $V_2$ ), elles résultent d'un processus d'optimisation afin d'augmenter la sensibilité.

Enfin, nous exposerons les résultats des différentes campagnes de mesures de liquides d'œufs. Une analyse des résultats obtenus sera faite et nous donnerons les perspectives de cette étude, d'une part sur l'étude des liquides et d'autre part sur la conception du dispositif de spectroscopie RF millifluidique.

## **II. MOTIVATION**

### **II.1. POINT SUR L'ÉTUDE PAR ANALYSE RF DES LIQUIDES CONSTITUTIFS DES ŒUFS**

Dans le paragraphe IV du Chapitre 1, nous avons évoqué deux travaux qui portaient sur l'étude des propriétés diélectriques des liquides d'œufs de consommation stockés. L'objectif de ces travaux était de déterminer leur indice de qualité tels que leur fraîcheur, le temps de stockage ainsi que le contenu protéique (Trabelsi et al. 2007; Luigi Ragni et al. 2007). Les résultats obtenus dans ces travaux ont permis de mettre en avant les potentialités des techniques RF pour l'étude des propriétés biochimiques des liquides des œufs. La constante diélectrique mesurée montre une forte sensibilité à la teneur en eau du jaune et du blanc, permettant d'évaluer la fraîcheur d'un œuf. Concernant l'analyse des indices liés au contenu protéique des œufs tels que l'indice de jaune et la hauteur du blanc, les résultats obtenus ont montré une sensibilité faible. Il est important de noter que ces études ont été faites en utilisant des sondes coaxiales classiques que l'on trouve dans le marché et qui ne sont donc pas adaptées spécifiquement à la mesure des liquides de l'œuf.

Une autre étude a été aussi évoquée dans le paragraphe III.1 du Chapitre 1, dans laquelle il a été montré qu'il est possible de discriminer un œuf mâle d'un œuf femelle chez la poule au 10<sup>ème</sup> jour d'incubation à partir de la concentration d'hormones, notamment du sulfate d'estrone présent dans le liquide allantoïque (Weissmann et al. 2013). Cependant cette différence de l'ordre de 0.6 ng/ml étant très faible, elle paraît difficilement détectable avec un dispositif RF, qui ne permet pas de voir des traces d'un composé chimique.

Une autre étude a montré que les concentrations en testostérone, androstenedione, progestérone, œstradiol, dihydrotestostérone et glucose dans le jaune des œufs de poule avant incubation n'étaient pas significativement différentes selon le sexe de l'embryon développé (Aslam et al. 2013). L'hypothèse reposait sur le fait que les hormones dans le jaune (vitellus) auraient une influence dans la ségrégation des chromosomes sexuels dans la première division méiotique des œufs (Petrie et al. 2001), hypothèse testée avec des œufs de paon. Par ailleurs dans une autre étude, la concentration en œstradiol dans les œufs de cailles a été trouvée significativement supérieure dans la coquille des femelles au 15<sup>ème</sup> jour d'incubation. Ce résultat révélerait un possible passage des hormones depuis l'intérieur de l'œuf vers la coquille (Qasimi et al. 2018).

Ces études nous permettent d'émettre l'hypothèse qu'il est possible de trouver des différences biochimiques dans les liquides constituant les œufs selon le sexe de l'embryon. De plus, ces différences pourraient être détectées par des ondes RF. Pour cela il est nécessaire de concevoir un dispositif RF dédié à la mesure des liquides des œufs. Nous allons donc dans le paragraphe suivant étudier des dispositifs de spectroscopie RF des liquides, existants.

## **II.2. ETAT DE L'ART SUR LES DISPOSITIFS DE SPECTROSCOPIE RF POUR L'ANALYSE DE FLUIDES**

Le principe d'un dispositif de spectroscopie RF fluide est de faire interagir une onde électromagnétique avec un fluide. Cette interaction va modifier l'onde en amplitude et en phase du fait des propriétés diélectriques du liquide. Pour cela il est nécessaire que le dispositif intègre une ligne de transmission permettant de propager une onde ainsi qu'une structure fluide qui facilite l'interaction entre un liquide et l'onde propagée. Différentes méthodes mathématiques permettent d'extraire la permittivité du liquide à partir des signaux électromagnétiques mesurés.

Un dispositif micro-fluidique pour l'analyse des solutions biologiques telles que l'hémoglobine, l'ADN, et l'E. coli a été conçu en utilisant des guides d'onde coplanaires avec des dimensions micro-métriques entre 40 MHz et 26.5 GHz (Facer, Notterman, et Sohn 2001). La permittivité a été extraite en basse fréquences ( $f < 100$  MHz) à partir de l'impédance mesurée. Pour des fréquences supérieures à 100MHz, les paramètres S (coefficients de réflexion et de transmission) ont été analysés pour différents liquides, sans en extraire la permittivité mais en faisant une analyse comparative avec un liquide de référence. La structure micro-fluidique utilisée n'est pas décrite.

Un autre dispositif de spectroscopie micro-fluidique a été réalisé par Grenier et al. 2009. Celui-ci est composé d'un guide d'onde coplaire avec un canal micro-fluidique dédié à l'étude des solutions biologiques. Le canal fluide fabriqué en polydiméthylsiloxane (PDMS) a un volume inférieur à 3  $\mu$ L et est placé au-dessus des guides d'ondes (cf. Figure 18). Les lignes coplanaires ont une longueur totale de 3 mm et le substrat utilisé est du quartz. La permittivité relative complexe des solutions modèles a été mesurée pour l'éthanol pur et l'eau déionisée (DI) avec des écarts-types de 3 et 1.7% respectivement à 25 GHz. Une procédure de calibration a été mise en place afin d'extraire la permittivité du liquide en éliminant les effets des différentes parties du dispositif qui interagissent (et modifient) le signal propagé. Une procédure mathématique a été utilisée pour extraire la permittivité du liquide à partir des

paramètres « S » mesurés. Les mesures s'effectuent avec un analyseur de réseau vectoriel (ARV). La technologie initiale a été modifiée pour augmenter la répétabilité et la sensibilité des mesures en utilisant des murs fluidiques en SU8 et un capôt en PDMS (Artis 2014). Ce type de structure a permis de mesurer différents liquides, que ce soit des alcools, des solutions aqueuses de molécules ou des suspensions cellulaires ou de nanoparticules.

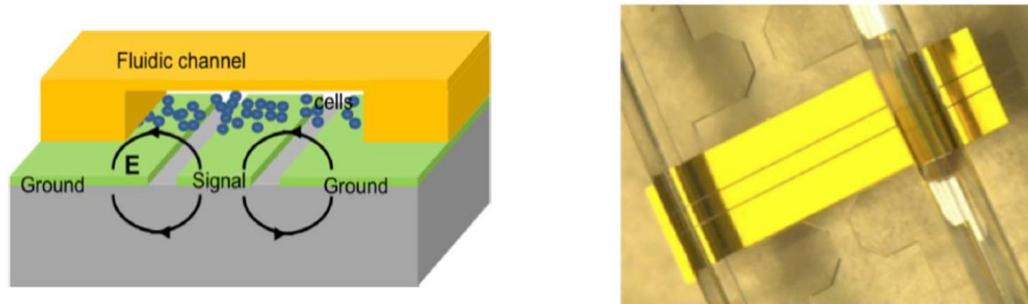


Figure 18 schéma du dispositif (à gauche) et photo du même dispositif (à droite) (Grenier et al. 2009)

En utilisant le même principe de fabrication, a été conçu un dispositif micro-fluidique permettant d'extraire la permittivité complexe des solutions biologiques et des réactifs chimiques dans la bande de fréquence de 40MHz à 45GHz (Booth et al. 2010). Le dispositif est composé d'un canal fluide fabriqué en PDMS qui permet de placer le liquide sur des lignes coplanaires en utilisant aussi le quartz comme substrat. Des méthodes de calibrage ont également été mises en place pour pouvoir extraire la permittivité complexe du liquide en mesurant différentes lignes sans et avec PDMS ; ces structures étant intégrées dans la même puce (Figure 19). Des tests pour valider le dispositif ont été faits en utilisant le méthanol comme liquide modèle.

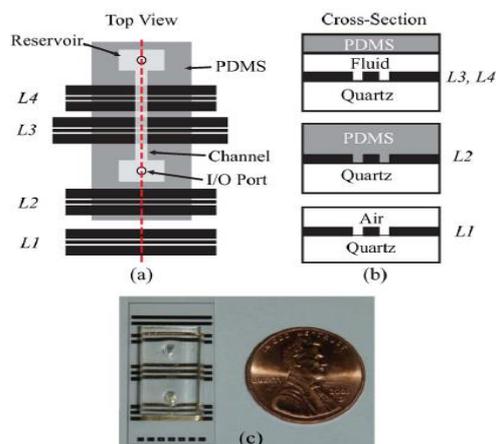


Figure 19 schéma du dispositif (a) vu de dessus (b) coupe transversale (c) photo du dispositif (Booth et al. 2010)

Une nouvelle méthode hybride pour caractériser des nano-liquides considère d'abord le calcul des permittivités du matériel SU8 utilisé pour la fabrication du canal fluide (Liu et al. 2017). Cette méthode implique seulement la mesure de la structure sans liquide, et ne nécessite pas de mesures des structures supplémentaires pour calibrage. Pour extraire la permittivité de liquides 3 algorithmes différents ont été mis en place. Afin de la valider, de l'eau déionisée (DI) à température ambiante a été utilisée.

Ces dispositifs présentés requièrent un processus de fabrication complexe (micro-fabrication) en salle blanche. Cette contrainte est nécessaire si on veut caractériser des liquides qui se présentent en faible quantité (micro ou nano litres). Or dans l'œuf les liquides se présentent avec des volumes bien plus élevés (milli-litres), particulièrement le jaune et le blanc qui sont par ailleurs des liquides très visqueux et collants. En conséquence il est nécessaire de développer un dispositif adapté aux liquides de l'œuf.

Un dispositif micro-fluidique (180  $\mu$ L) permet d'identifier des solutions d'éthanol par rapport à de l'eau DI à différentes concentrations à partir de leur réponse en fréquence. Il est composé de résonateurs en anneau à coupure capacitive, fabriqués en technologie micro ruban (Vélez et al. 2017) avec un substrat en FR4. La méthode consiste en l'analyse différentielle de deux liquides (dont l'un, ici l'eau, est utilisée comme liquide de référence) en utilisant deux canaux fluidiques. Ces canaux sont fabriqués en PDMS et placés sur les résonateurs qui concentrent l'énergie électromagnétique (cf. Figure 20). Les paramètres S sont mesurés en transmission ( $S_{21}$ ) en fonction de la fréquence (entre 0.8 et 1GHz). La deuxième fréquence de résonance présente une forte sensibilité aux différentes concentrations d'éthanol.

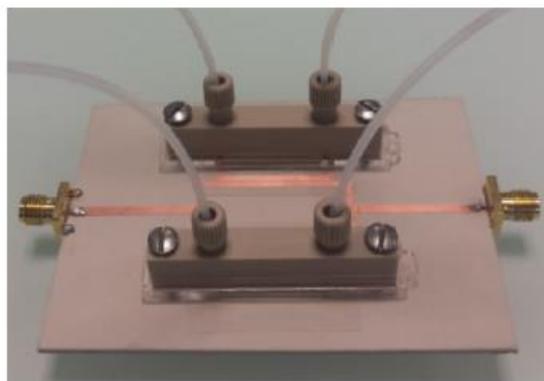


Figure 20 photo du dispositif microfluidique différentiel (Vélez et al. 2017)

Ce dispositif ne demande pas de procédures complexes de micro-fabrication ; autant pour la fabrication de canaux fluidiques que pour le circuit imprimé. De plus les canaux fluidiques présentent un volume plus élevé de l'ordre de 0.2 ml. Il s'agit donc d'une technique plus accessible en termes de coûts de fabrication et de matériaux.

En nous basant sur ces travaux, nous nous sommes intéressés à développer un nouveau dispositif millifluidique, adapté à l'analyse diélectrique hyperfréquence des liquides constitutifs des œufs.

### **III. DEVELOPPEMENT DE L'INSTRUMENTATION RF DEDIEE A LA CARACTERISATION DE LIQUIDES D'OEUF**

#### **III.1. PERMITTIVITE ET CONSTANTE DE PROPAGATION**

La caractérisation diélectrique d'un matériau est réalisée en mesurant sa permittivité relative complexe (ou constante diélectrique)  $\varepsilon_r^*$ . Elle est définie par rapport au vide  $\varepsilon_0$  et varie en fonction de la fréquence du champ électromagnétique appliqué (Faucheron 1970).

$$\frac{\varepsilon}{\varepsilon_0} = \varepsilon_r^* = \varepsilon_r' - j\varepsilon_r''$$

Où la partie réelle ( $\varepsilon_r'$ ) représente la capacité d'un matériau à stocker l'énergie électromagnétique et la partie imaginaire représente les pertes dans le matériau sous forme de chaleur (Pozar 2006). Les matériaux utilisés en RF sont souvent caractérisés par la partie réelle de la permittivité relative  $\varepsilon_r = \varepsilon_r' \varepsilon_0$  et la tangente de pertes ( $\tan(\delta) = \varepsilon_r'' / \varepsilon_r'$ ). La mesure des valeurs  $\varepsilon_r'$  et  $\varepsilon_r''$  donnent une information sur la composition structurale du matériau ; elle est donc très utile pour la caractérisation des matériaux.

Ces propriétés diélectriques interviennent dans la constante de propagation complexe d'une onde, qui est définie par :

$$\gamma = \alpha + j\beta$$

Où  $\alpha$  est la constante d'atténuation (Np/m) et  $\beta$  est la constante de phase (rad/m). Pour une ligne parfaite sans pertes dans le conducteur ( $\alpha \approx 0$ ), la constante de propagation est définie comme :

$$\gamma = j\beta = j \frac{2\pi f}{v} = j \frac{2\pi f \sqrt{\epsilon_r^*}}{c}$$

La constante de propagation est une fonction de la fréquence ( $f$ ), et de la vitesse de propagation de l'onde ( $v$ ), qui elle-même dépend de la permittivité complexe relative du milieu de propagation.

## III.2. CONCEPTION DU DISPOSITIF RF

Nous avons choisi de concevoir un dispositif millifluidique RF, qui soit adapté aux liquides des œufs. Nous avons choisi pour cela la technologie des guides d'onde coplanaires, imprimés sur un substrat de type FR4 avec des dimensions millimétriques (donc sans besoin de micro-fabrication) ainsi que celle du PDMS pour les canaux fluidiques. Pour extraire la permittivité du liquide nous avons utilisé la technique de Bianco et Parodi (expliqué ci-dessous) permettant de calculer la constante de propagation d'une onde propagée par deux lignes de transmission électriquement identiques avec des longueurs différentes, dans la gamme de fréquence de 0.1 MHz à 4GHz.

### III.2.1. Rappel sur le guide d'onde coplanaire

Pour la caractérisation RF des liquides, nous avons utilisé des guides d'ondes coplanaires. Ceux-ci sont constitués d'un conducteur central placé entre deux plans de masse métalliques (Simons 2004) sur un substrat de permittivité  $\epsilon$ . L'épaisseur de la métallisation  $t$ , la largeur du conducteur central  $w$ , la largeur de la séparation avec le plan de masse  $s$  et la hauteur du substrat  $h$ , sont indiquées sur la Figure 21. Ces dimensions, ainsi que les matériaux utilisés pour le substrat et la métallisation vont déterminer l'impédance caractéristique  $Z_c$ , et l'atténuation  $\alpha$  de la ligne.

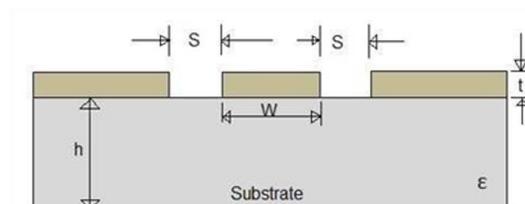


Figure 21 schéma et paramètres dimensionnels d'une ligne coplanaire

L'onde électrique se propage le long de la ligne, au niveau des fentes coplanaires, entre le conducteur et les plans de masse ainsi que dans l'air et dans le substrat. Les lignes de champ électrique dans une ligne d'onde coplanaire sont montrées dans Figure 22.

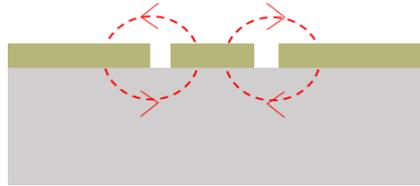


Figure 22 lignes du champ électrique dans la ligne coplanaire

La permittivité effective correspond à la moyenne des permittivités de différents matériaux qui interagissent avec l'onde propagée. Dans ce cas, la permittivité effective  $\epsilon_{eff}$  est donnée par :

$$\epsilon_{eff} \simeq \frac{\epsilon_{substrat} + \epsilon_{air}}{2}$$

La vitesse de l'onde qui se propage dans cette ligne coplanaire est donnée alors par:

$$v = \frac{c}{\sqrt{\epsilon_{eff}}}$$

Pour concevoir les lignes coplanaires, nous avons utilisé le logiciel « Tx-Line » qui permet de calculer les dimensions d'un guide d'onde à partir des propriétés des matériaux utilisés.

### III.2.2. Principe de fonctionnement du dispositif d'analyse RF

Pour concevoir notre dispositif, nous nous sommes intéressés à la technique de Bianco et Parodi.

#### III.2.2.1. Technique de Bianco et Parodi

Cette technique permet d'extraire la constante de propagation  $\gamma$  d'une onde qui se propage dans deux lignes de transmissions. Ces deux lignes ont les mêmes caractéristiques électriques dont une impédance caractéristique  $Z_0$ , mais elle sont de différentes longueurs (Bianco et Parodi 1976), comme représenté dans la Figure 23.

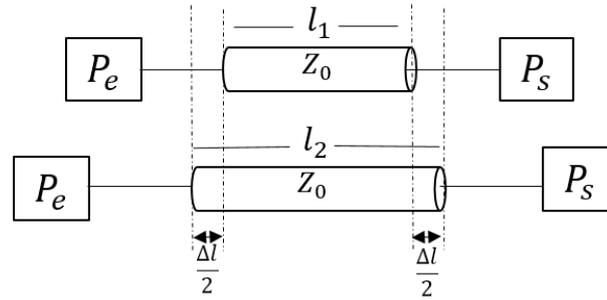


Figure 23 schéma de lignes de transmission électriquement identiques, avec différentes longueurs, et avec les ports d'entrée et sortie

Les ports  $P_e$  et  $P_s$ , correspondent aux transitions entre les lignes de transmission et l'instrument de mesure tel qu'un analyseur de réseau vectoriel (ARV). Les ports incluent aussi des connecteurs, des câbles, et tout élément pouvant assurer la connexion à l'ARV.

Les matrices de transfert (voir annexe VII.1) du système en cascade  $T_1$  et  $T_2$  sont composées des matrices des lignes,  $T_{L_1}$  et  $T_{L_2}$  ainsi que par les matrices de ports  $T_e$  et  $T_s$ , comme suit :

$$T_1 = T_e T_{L_1} T_s$$

$$T_2 = T_e T_{L_2} T_s$$

En considérant les accès comme identiques ( $T_e = T_s$ ), symétriques ( $t_{11} = t_{22}$ ) et réciproques ( $\det(T) = t_{11}t_{22} - t_{21}t_{12} = 1$ ), nous obtenons après quelques manipulations algébriques des produits  $T_1 T_2^{-1}$  et  $T_2 T_1^{-1}$  :

$$T_1 T_2^{-1} = T_e T_{L_1} T_{L_2}^{-1} T_e^{-1} = T_s^{-1} T_{L_2}^{-1} T_{L_1} T_s$$

$$T_2 T_1^{-1} = T_e T_{L_2} T_{L_1}^{-1} T_e^{-1} = T_s^{-1} T_{L_1}^{-1} T_{L_2} T_s$$

En additionnant, les deux équations précédentes nous obtenons :

$$\begin{aligned} T_1 T_2^{-1} + T_2 T_1^{-1} &= T_e^{-1} [T_{L_1} T_{L_2}^{-1} + T_{L_2} T_{L_1}^{-1}] T_e \\ &= T_s^{-1} [T_{L_2}^{-1} T_{L_1} + T_{L_1}^{-1} T_{L_2}] T_s \end{aligned}$$

Du fait de la symétrie et de la réciprocity des matrices de transfert des lignes  $T_{L_i}$  ( $i = 1,2$ ) et du système en cascade  $T_i$  ( $i = 1,2$ ) nous savons que :

$$T_{L_2}^{-1} T_{L_1} = T_{L_1}^{-1} T_{L_2}$$

$$T_{L_1} T_{L_2}^{-1} = T_{L_2} T_{L_1}^{-1}$$

$$T_1 T_2^{-1} = T_2 T_1^{-1}$$

La matrice de transfert d'une ligne de transmission adaptée, de longueur  $l$ , est donnée par :

$$T_l = \begin{bmatrix} e^{-\gamma l} & 0 \\ 0 & e^{\gamma l} \end{bmatrix}$$

Où  $\gamma$  est la constante de propagation de l'onde propagée par la ligne.

Finalement, il est possible de déduire  $\gamma$ , à partir des matrices de transfert  $T_1$ ,  $T_2$  et de la différence des longueurs des lignes  $\Delta l = l_2 - l_1$  comme suit :

$$\gamma = \frac{1}{\Delta l} \cosh^{-1} \left( \frac{\text{tr}(T_1 T_2^{-1} + T_2 T_1^{-1})}{4} \right)$$

La technique de Bianco-Parodi, permet l'extraction de la constante de propagation de deux lignes uniformes de mêmes caractéristiques et de longueurs différentes, en éliminant l'effet des accès (connecteurs, câbles, etc.).

Nous avons donc utilisé cette technique pour étudier les propriétés diélectriques des liquides. Nous avons ainsi placé du liquide au milieu du système décrit précédemment, en utilisant des canaux fluidiques de différentes longueurs. Cette méthode nous a permis de calculer la constante de propagation du liquide (cf Figure 24).

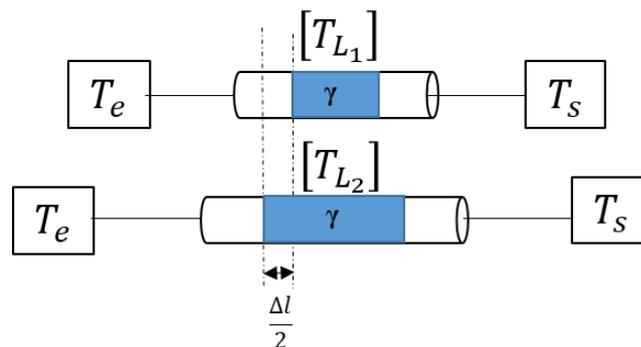


Figure 24 Méthode de Bianco-Parodi appliquée à l'étude de liquides

### III.2.3. Architecture du dispositif millifluidique

Les lignes de transmission ont été conçues en utilisant des guides d'onde coplanaires sur carte de circuit imprimé (PCB). Les matériaux utilisés dans les différents composants du dispositif ainsi que ses dimensions et le système complet de mesure sont décrits ci-dessous. Les tests effectués pour valider le dispositif et les protocoles fluidiques établis sont décrits dans cette partie.

Dans le cadre de mes travaux de thèse, deux versions du dispositif ont été conçues en utilisant ce même principe. Dans un premier temps nous avons adapté une carte PCB, contenant deux guides d'onde coplanaires ( $50 \Omega$ ), conçue précédemment pour l'analyse différentielle des liquides. Nous avons modifié cette carte afin d'appliquer la technique de Bianco-Parodi pour calculer la permittivité des liquides. Les premières campagnes de mesures de liquides des œufs ont été faites avec cette version du dispositif ( $V_1$ ).

#### Dispositif RF - Version 1 ( $V_1$ )

Le dispositif de spectroscopie RF millifluidique est composé de deux lignes coplanaires électriquement identiques (impédance caractéristique  $Z_c=50 \Omega$ ) et ayant des longueurs différentes. Les dimensions de la carte PCB ainsi que la géométrie des lignes coplanaires comme la largeur du conducteur ( $w$ ), la taille de la coupure capacitive ( $s$ ) entre le conducteur et le plan de masse, la hauteur du substrat ( $h$ ) et l'épaisseur de la métallisation ( $t$ ) sont montrées dans la Figure 25. Le substrat utilisé dans la fabrication des lignes coplanaires est le RO4003 avec une permittivité relative du  $\epsilon_r=3.38$  et une faible constante de pertes  $\tan(\delta)=0.0027$ . La métallisation est composée d'une couche de cuivre de  $18\mu\text{m}$  d'épaisseur suivie de  $4\mu\text{m}$  de nickel et de  $0.1\mu\text{m}$  d'or. Les circuits ont été fabriqués par la société CIRLY.

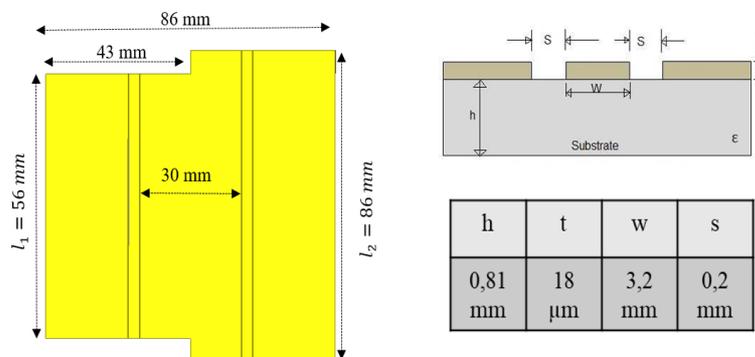


Figure 25 Dimensions des guides d'ondes coplanaires pour le dispositif RF  $V_1$

Une lame de film sec de  $18\ \mu\text{m}$  d'épaisseur est posée directement sur les lignes coplanaires pour faciliter le nettoyage et éviter que des particules présentes dans les liquides restent sur les lignes. Le film est laminé sur le PCB à une température de  $65^\circ\text{C}$  et sous pression, dans la salle blanche du laboratoire LAAS-CNRS.

Dans un second temps deux blocs contenant chacun un canal fluidique, ont été fabriqués en PDMS (polydiméthylsiloxane). Pour ceci le négatif de la structure a d'abord été fabriqué en teflon avec une imprimante 3D à l'atelier mécanique du LAAS-CNRS afin de créer un moule pour le PDMS. Les canaux fluidiques permettent de confiner un volume de liquide donné sur les guides d'onde coplanaires, au centre du dispositif. Les dimensions (en millimètres) des blocs PDMS et des canaux fluidiques sont montrés dans la Figure 26.

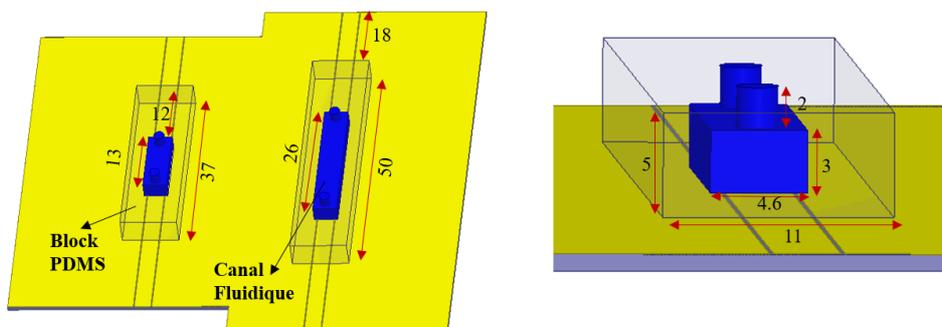


Figure 26 Dimensions (en mm) des blocs PDMS et canaux fluidiques pour le dispositif RF V1

Les volumes de chaque canal fluidique sont indiqués dans le Tableau 4 ci-dessous.

Canal fluidique	Volume (ml)
ch1	0.18
ch2	0.36

Tableau 4 volume des canaux fluidiques

Enfin, deux structures fabriquées en Polyétheréthercétone (PEEK) sont posées sur chaque bloc PDMS, facilitant l'entrée et la sortie des liquides dans les canaux fluidiques, en utilisant des embouts fluidiques, comme montré dans la Figure 27.

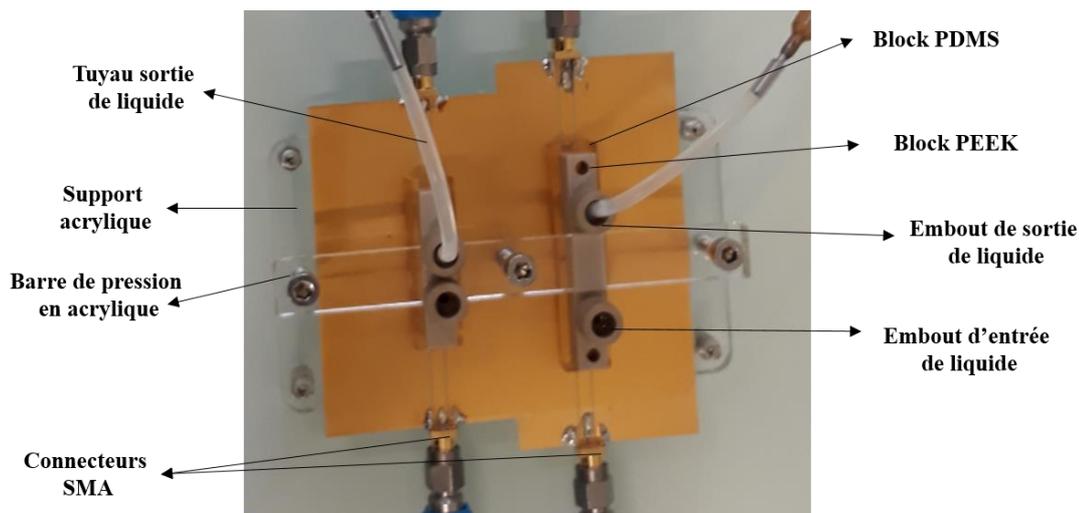


Figure 27 photo (vue de dessus) du dispositif de spectroscopie millifluidique

Un support du dispositif fabriqué en acrylique est placé en dessous du PCB et permet de visser une barre (également en acrylique) au-dessus du dispositif. Cette barre permet d'exercer une pression sur les blocs PEEK et en conséquence sur les blocs PDMS. Par cette pression, le liquide, contenu à l'intérieur des canaux fluidiques, est ainsi confiné sur les lignes coplanaires. Une bonne étanchéité des canaux fluidiques est assurée.

Pour mesurer chaque ligne avec un ARV, des connecteurs SMA ont été soudés aux extrémités des lignes coplanaires.

### III.2.4. Système de mesure de 1<sup>ère</sup> génération - V<sub>1</sub>

Le banc complet de mesures, utilisé pour mesurer un liquide, et montré dans la Figure 28, est composé par :

1. Le dispositif de spectroscopie RF millifluidique contenant le liquide à mesurer,
2. Deux analyseurs de réseau vectoriel (ARV) à deux ports, configurés identiquement, pour mesurer les paramètres S des lignes  $L_1$  et  $L_2$  respectivement,
3. Un module de calcul permettant d'extraire la permittivité relative complexe ( $\epsilon_r^*$ ) du liquide à partir des paramètres S mesurés par les ARVs.

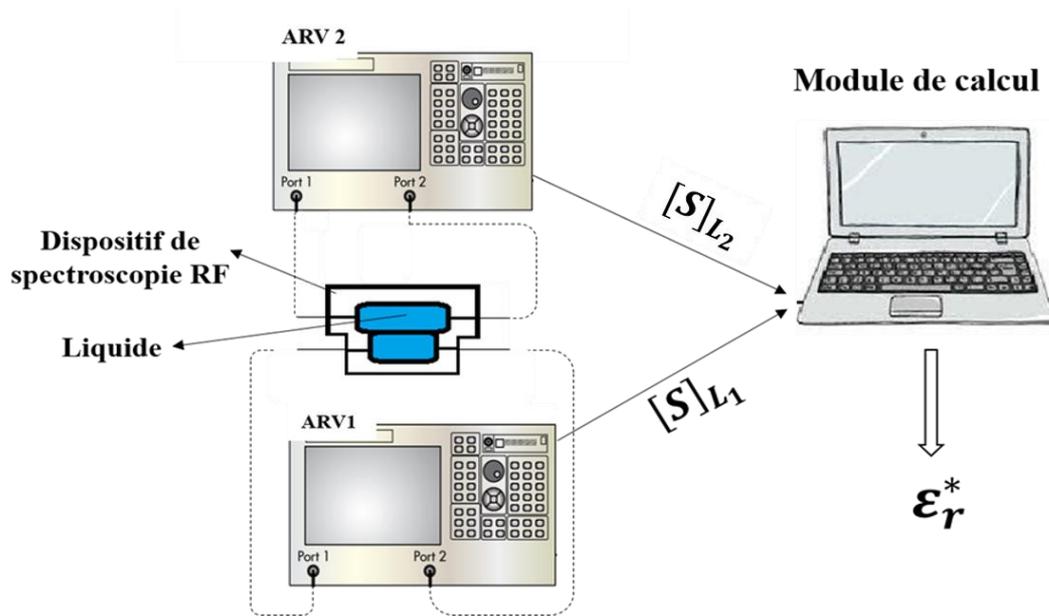


Figure 28 schéma du système de mesures millifluidiques  $V_1$

Les différentes étapes du module de calcul développé sur le logiciel MATLAB sont représentées dans le schéma de la Figure 29. Tout d'abord les matrices  $[S]$  mesurées pour chaque ligne du dispositif avec les ARV sont converties dans leur matrice de transfert  $[T]$  respective. Dans un deuxième temps, en utilisant la technique de Bianco et Parodi, la constante de propagation  $\gamma$  de l'onde propagée par le liquide est calculée à partir des matrices  $T$ .

Finalement la permittivité relative effective complexe ( $\epsilon_r^*$ ) est calculée à partir de la constante de propagation  $\gamma$ , la vitesse de propagation de la lumière dans le vide ( $c$ ) et la fréquence ( $f$ ) selon l'équation :

$$\epsilon_r^* = \sqrt{\frac{\gamma c}{2\pi f}}$$

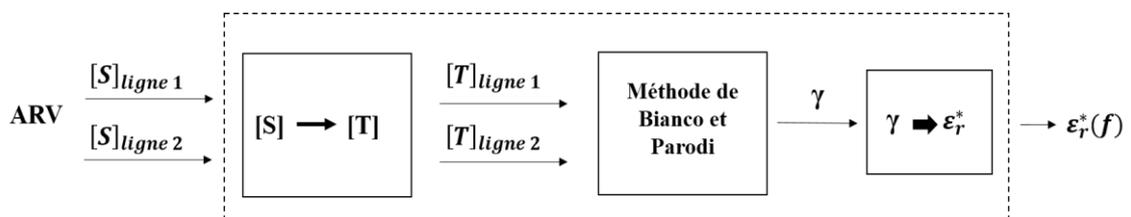


Figure 29 Schéma du module de calcul de la permittivité relative complexe

Il est important de noter que la permittivité relative effective extraite à ce stade ne correspond pas à celle du liquide seul mais à celle de l'ensemble fluide dans le capteur.

### III.2.5. Mesure de liquides modèles pour la validation du dispositif RF V<sub>1</sub>

Pour valider le dispositif, des liquides modèles ont été mesurés tels que : l'eau dé-ionisée (eau DI) et des solutions d'albumine de sérum bovin (BSA).

L'eau constitue notre milieu de référence, car elle est utilisée pour rincer les canaux, et parce qu'elle est présente également dans la plupart des liquides à mesurer. Avant de mesurer un liquide, il est nécessaire de saturer les canaux fluidiques, ce qui signifie ; introduire le milieu de référence et attendre le temps nécessaire pour que les pores des parois du bloc PDMS absorbent suffisamment d'eau pour stabiliser la mesure des liquides. Pour mesurer le temps de saturation, nous avons rempli les canaux fluidiques avec de l'eau DI à température ambiante et nous avons pris des mesures toutes les 5 minutes. La partie réelle de la permittivité effective relative mesurée en fonction du temps est montrée dans la Figure 30.

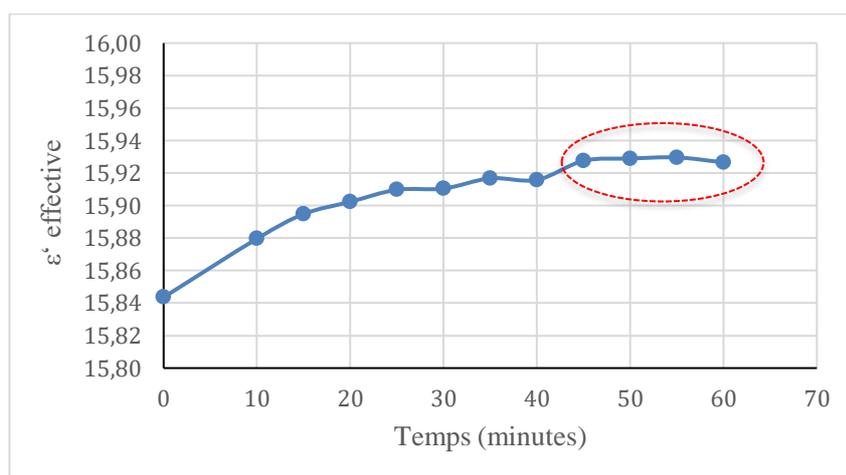


Figure 30 Temps de saturation du canal avec de l'eau DI à 2GHz

Nous pouvons observer qu'à partir de 45 min, la valeur de la permittivité effective de l'eau se stabilise à une valeur moyenne de 15.9 et un écart type de 0.001 (calculé sur les 4 dernières mesures).

Il est important de noter que la valeur mesurée correspond à la permittivité effective de l'ensemble du dispositif contenant le liquide. Cela correspond à la moyenne pondérée entre les permittivités relatives de tous les matériaux qui interagissent avec l'onde électromagnétique propagée, tels que le substrat, le PDMS, l'air et le liquide.

Une fois que le canal fluide est saturé (après  $t=45$  min), il est possible d'obtenir la valeur de la permittivité effective mesurée avec de l'eau (partie réelle et imaginaire) en fonction de la fréquence, qui est montrée dans la Figure 31.

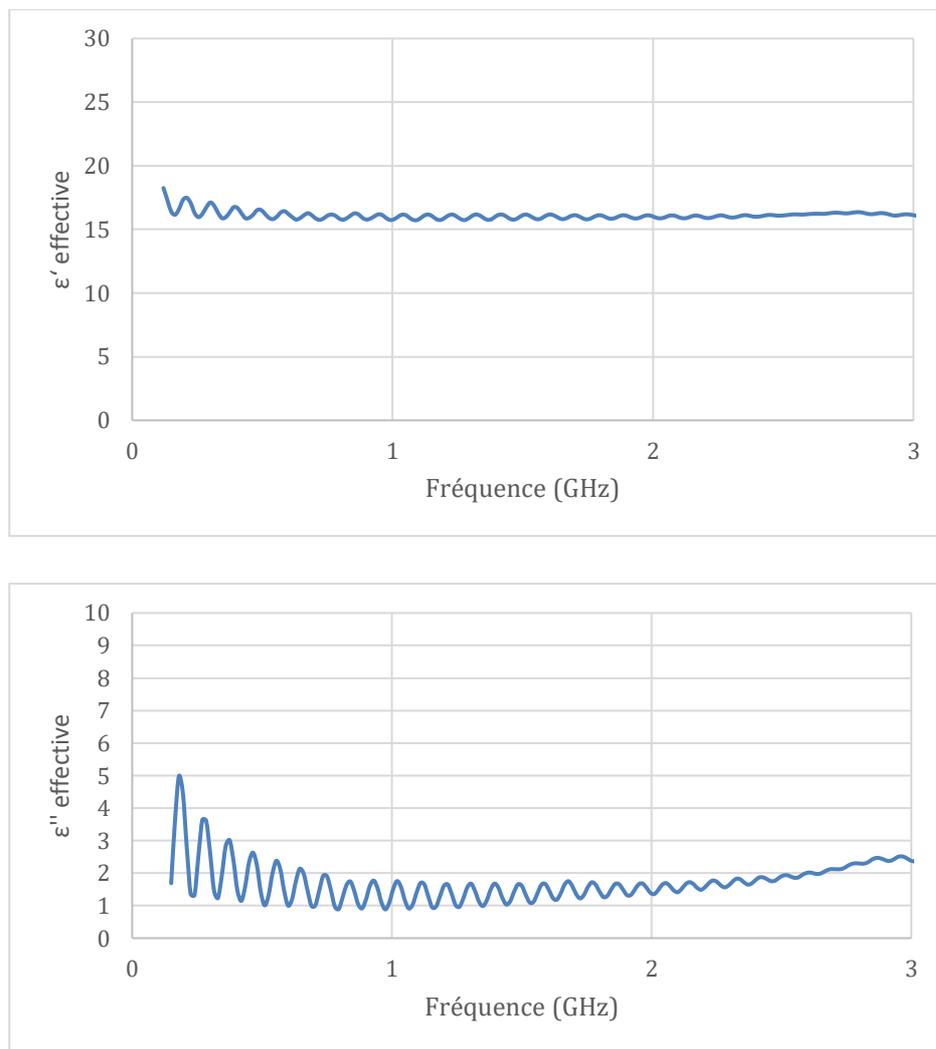


Figure 31 Permittivité effective (parties réelle et imaginaire) du dispositif chargé par de l'eau DI

Des solutions de BSA avec de l'eau DI ont ensuite été mesurées aux concentrations de 10, 100 et 200 mg/ml. Les échantillons ont été préparés à température ambiante et mixés avec un vortex pour les homogénéiser. Chaque solution a été introduite dans le canal et mesurée 5 fois consécutives afin de tester la répétabilité du dispositif à la mesure d'un même liquide. Les valeurs moyennes des permittivités effectives mesurées pour chaque solution, partie réelle et imaginaire, sont montrées dans la Figure 32 :

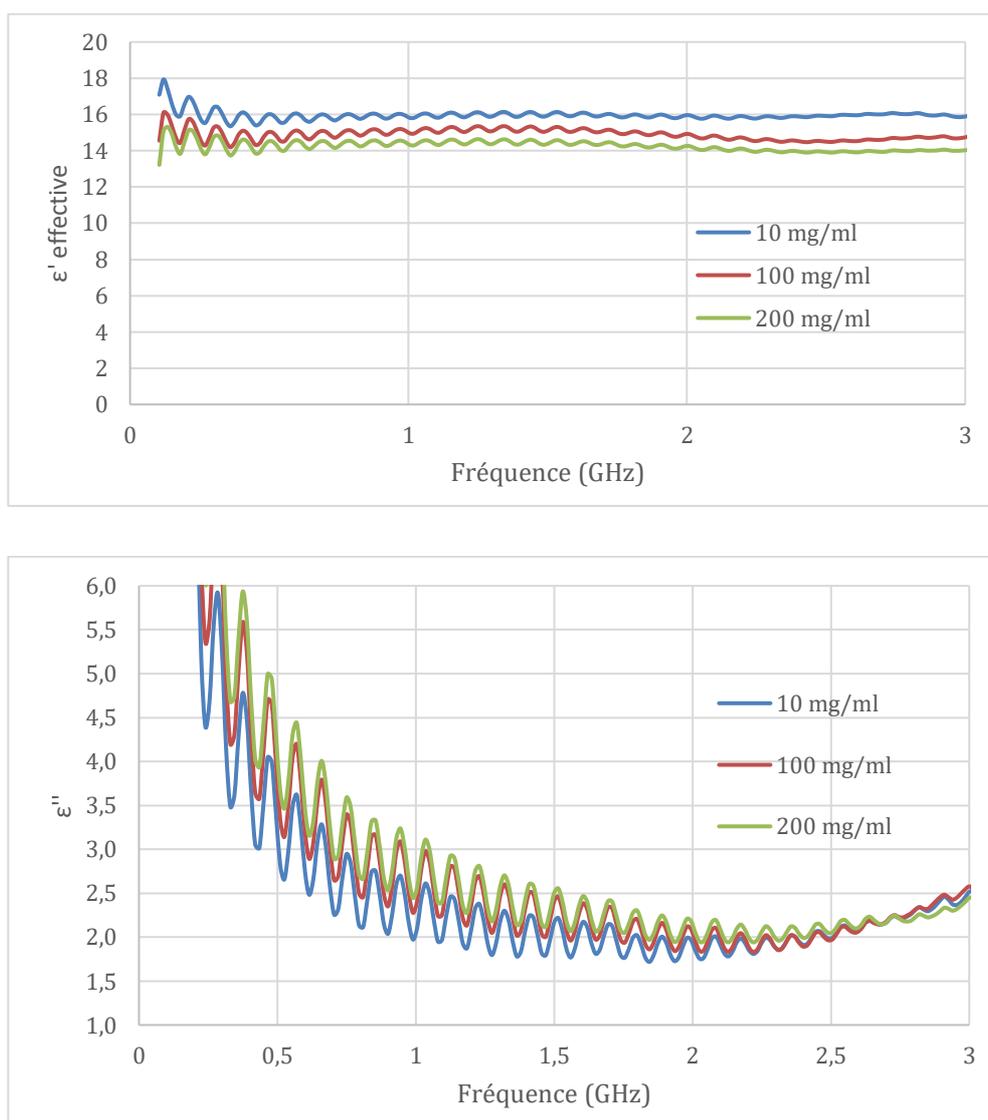


Figure 32 permittivité effective mesurée pour différentes concentrations de BSA

Dans le plan complexe de la permittivité ( $\epsilon''$  en fonction de  $\epsilon'$ ), à une fréquence de 2 GHz et montré dans la Figure 33, sont distinguables les différentes mesures que nous avons réalisé pour chaque solution de BSA. Les écarts types calculés sur les 5 mesures de chaque solution à 2 GHz, pour les parties réelle et imaginaire de la permittivité effective, sont exposés dans le Tableau 5 :

Concentration BSA (mg/ml)	Ecart-type $\sigma$ $\epsilon'$	Ecart-type $\sigma$ $\epsilon''$
10	0,01	0,01
100	0,05	0,02
200	0,12	0,02

Tableau 5 Ecart-types sur la permittivité effective pour chaque solution de BSA mesurée à 2GHz

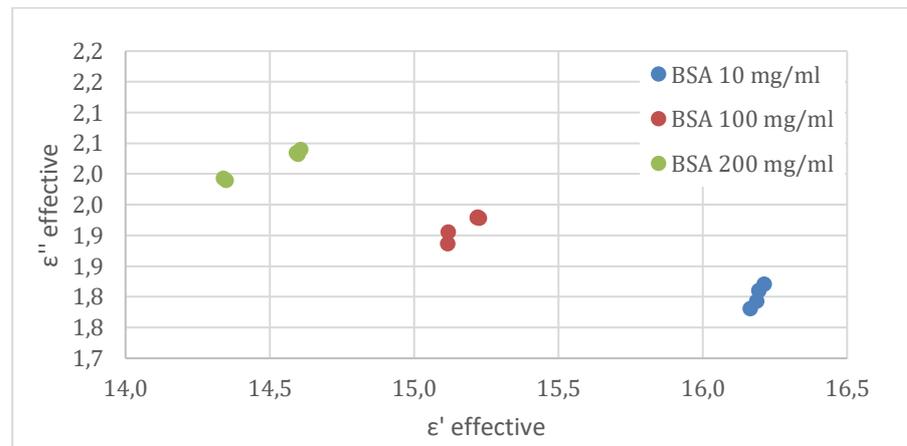


Figure 33 Plan complexe de la permittivité effective du BSA à 2 GHz

Nous pouvons observer des écarts types très faibles, proches du niveau du bruit du dispositif contenant de l'eau DI, pour les solutions à 10 et 100 mg/ml. Pour la solution à 200 mg/ml cet écart type augmente dû possiblement à des particules qui restent dans les canaux fluidiques. En effet il s'agit d'un liquide plus concentré, plus visqueux, et qui rend en conséquence plus difficile de nettoyer les canaux fluidiques après son passage. Cependant l'écart type reste acceptable.

Ce résultat nous permet de démontrer qu'avec le dispositif de spectroscopie RF millifluidique, il est possible de discerner 3 solutions de différentes concentrations à partir de leur permittivité effective mesurée. La relation entre la permittivité effective et les concentrations des solutions BSA est montrée dans la Figure 34 :

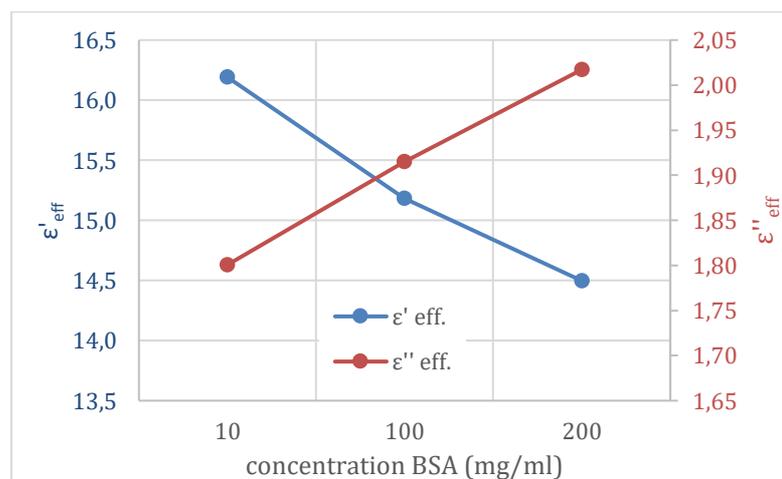


Figure 34 Permittivité effective en fonction de la concentration du BSA

On observe une relation quasi linéaire entre la valeur de la permittivité effective mesurée et les différentes concentrations de BSA. Ce résultat est utile car il nous

permettra d'identifier une éventuelle différence de contenu entre les liquides provenant d'œufs, et notamment entre un œuf femelle et un œuf mâle.

Les résultats obtenus par l'utilisation de liquides modèles nous permettent de valider le dispositif de spectroscopie RF millifluidique, pour la mesure des différents liquides de l'œuf.

Grâce à ces premiers tests, un protocole fluide a été consolidé. Ce protocole comprend le temps de saturation et les procédures de remplissage et de rinçage des canaux comme le montre le schéma de la Figure 35.

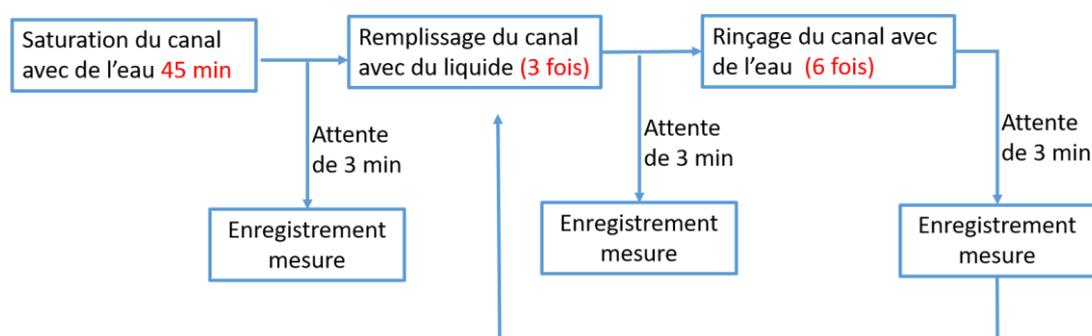


Figure 35 Schéma du protocole fluide V1

L'eau constitue notre milieu de référence, elle est donc mesurée avant la mesure d'un liquide, comme une représentation de l'état du canal fluide.

### III.2.6. Conception du dispositif millifluidique de 2<sup>ème</sup> génération – V<sub>2</sub>

Une deuxième version du dispositif a été conçue, en optimisant la version 1 (V<sub>1</sub>) avec comme objectif d'augmenter la sensibilité du dispositif aux contrastes pour des concentrations plus faibles des solutions fluidiques. A ce moment, nous étions intéressés par les liquides qui sont disponibles en grande quantité, notamment le liquide extra-embryonnaire décrit dans la suite de ce chapitre (cf. paragraphe IV.5). Ceci nous a permis d'augmenter la taille des canaux fluidiques afin d'augmenter la sensibilité du dispositif.

Pour ce faire, nous avons augmenté la largeur et la hauteur des canaux fluidiques, afin d'éloigner les parois du PDMS des ondes rayonnées dans le gap (s) des guides d'ondes coplanaires. Nous avons aussi diminué la longueur des lignes et en conséquence la taille de la carte PCB. Cependant la géométrie des guides d'onde coplanaires (s, h, w, t) assurant une impédance caractéristique de 50 ohms n'a pas été modifiée. Idem pour les matériaux et les procédés utilisés pour sa fabrication (substrat

et métallisation). Les dimensions de la carte PCB ainsi que la géométrie des guides d'onde coplanaires sont montrées dans la Figure 36.

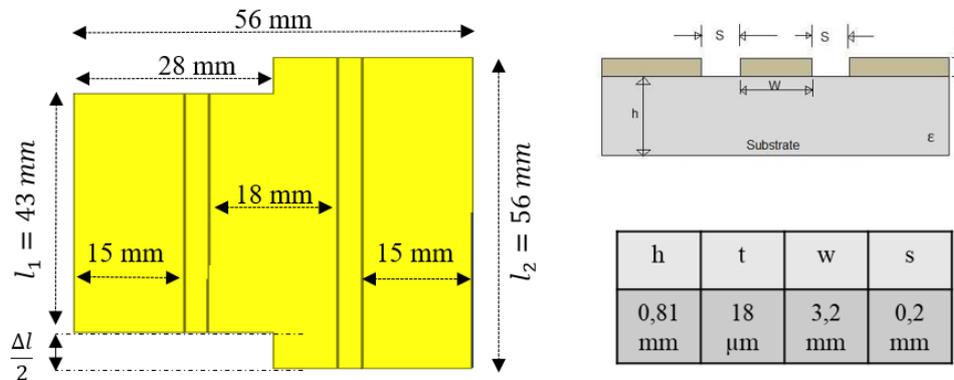


Figure 36 Dimensions des guides d'ondes coplanaires du dispositif de spectroscopie RF millifluidique  $V_2$ .

Le bloc PDMS a été modifié pour cette version du dispositif ( $V_2$ ). Il est composé d'une seule structure contenant les deux canaux fluidiques nous permettant de diminuer les possibles erreurs de positionnement du bloc sur les lignes coplanaires. La largeur des parois a été diminuée (verticalement) aux niveaux des accès afin de minimiser les pertes de signal dans le PDMS. D'autre part, les entrées et sorties de liquides ont été déplacées au bord des canaux fluidiques. Les dimensions du bloc PDMS du dispositif  $V_2$ , sont montrées dans la Figure 37.

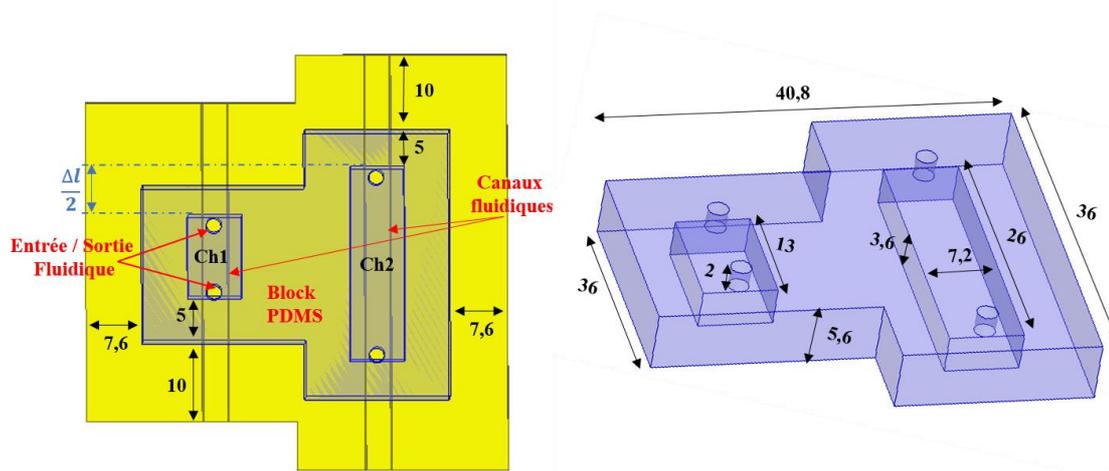


Figure 37 Dimensions du bloc PDMS contenant les canaux fluidiques

Les volumes des canaux fluidiques du dispositif  $V_2$  sont montrés dans le Tableau 6.

Canal fluide	Volume (ml)
ch1	0.34
ch2	0.67

Tableau 6 Volumes des canaux fluidiques du dispositif  $V_2$

De la même façon, un seul bloc PEEK a été conçu pour faciliter l'entrée et la sortie des liquides dans les canaux fluidiques. Ce bloc est vissé à un support situé en dessous de la structure, fabriqué en acrylique. Cela permet de confiner le liquide par pression sur les lignes. Des photos de la structure sont montrées dans la Figure 38.

Tel que dans le dispositif  $V_1$ , dans le dispositif  $V_2$ , l'entrée et la sortie des liquides sont également facilités par l'utilisation d'embouts et de tuyaux. Les connecteurs SMA, précédemment soudés dans la version  $V_1$ , sont cette fois-ci des connecteurs vissés afin de diminuer les pertes dues aux soudures et d'améliorer la symétrie et la réciprocité du dispositif.

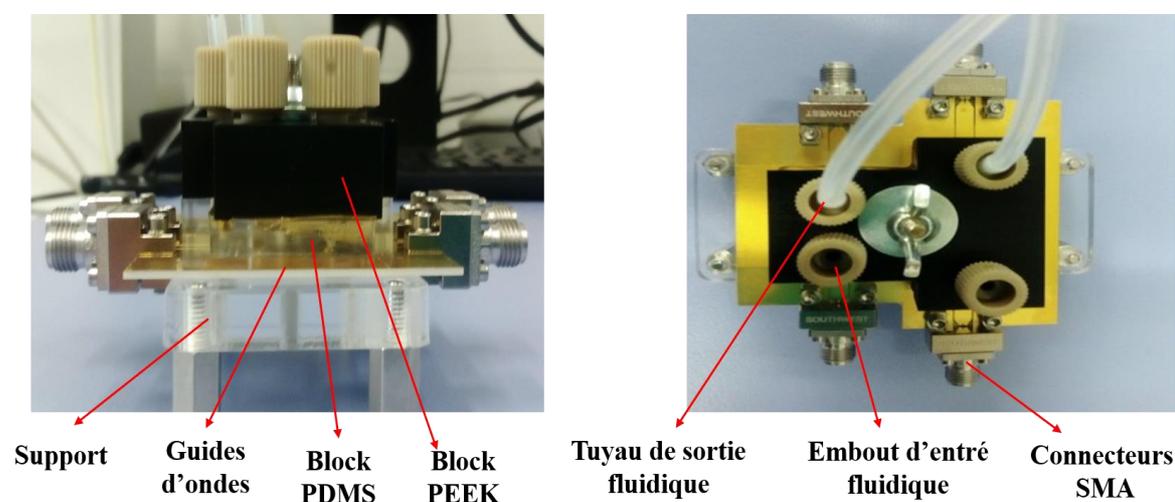


Figure 38 Photo du dispositif : à gauche vue en coupe, à droite vue de dessus

### III.2.7. Système de mesure de 2<sup>ème</sup> génération - $V_2$

Le banc de mesures complet de version  $V_2$  et montré dans le schéma de la Figure 39 comprend l'utilisation de commutateurs qui nous permettent de mesurer les deux lignes du dispositif ( $L_1$  et  $L_2$ ) avec un seul ARV à deux ports. Le module de calcul reste identique. Le système de mesures  $V_2$  est composé de :

1. D'un **dispositif millifluidique** contenant un liquide,
2. Deux **commutateurs RF** ( $SW_1$  et  $SW_2$  dans le schéma pour switch 1 et switch 2) reliant chaque ligne du dispositif à un analyseur de réseau vectoriel ARV à deux ports,
3. Un **ARV**, permettant la mesure des paramètres S des lignes en fonction de la fréquence,
4. Un **Module de calcul**, permettant d'extraire la permittivité du liquide à partir des paramètres S mesurés par l'ARV.

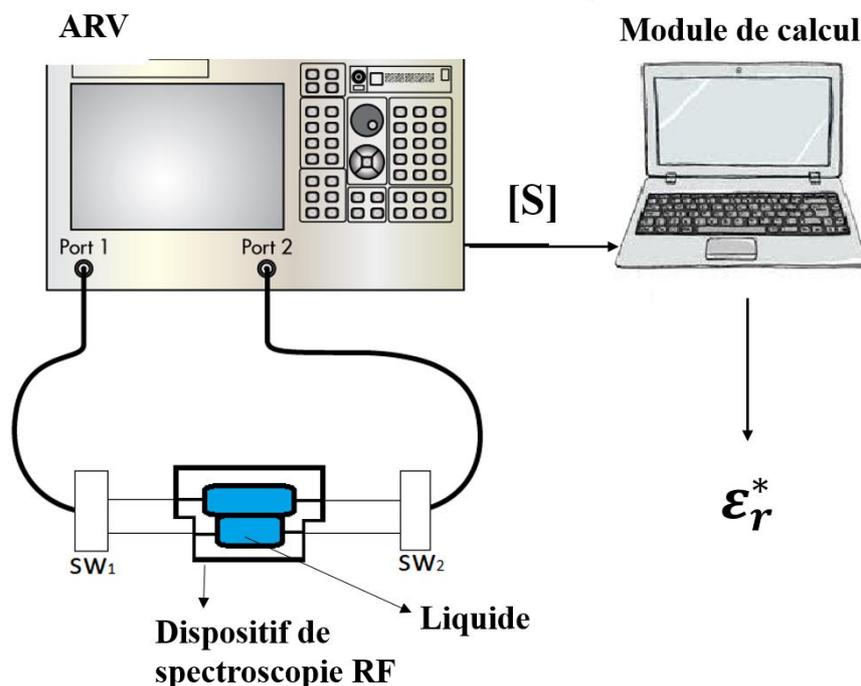


Figure 39 Banc de mesures complet de spectroscopie RF millifluidique

### III.2.8. Mesure des liquides modèles pour la validation du dispositif de mesures RF V<sub>2</sub>

Dans cette nouvelle version du dispositif, le temps de saturation du canal, en utilisant toujours l'eau DI comme milieu de référence, a augmenté par rapport au dispositif V1. Cela s'explique par le fait que les canaux fluidiques sont plus grands et par conséquent une surface plus importante du PDMS est en contact avec l'eau. Le temps de saturation pour le dispositif V2 est de 70 minutes comme est montré dans la Figure 40. Un fois l'eau saturée la valeur de la permittivité effective se stabilise à une valeur moyenne de 18.9 et un écart type de 0.004.

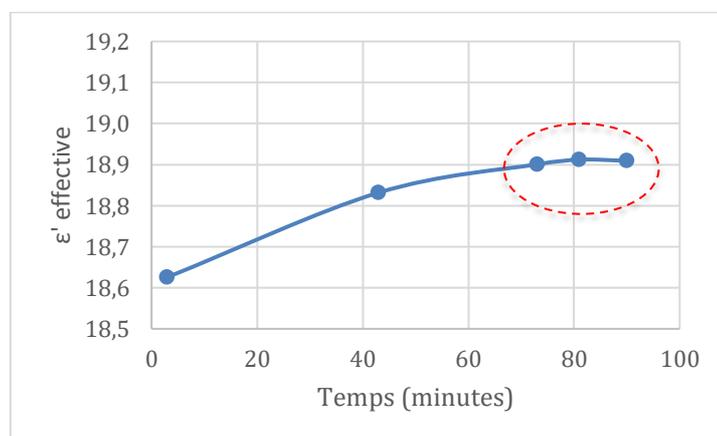


Figure 40 Permittivité effective mesurée de l'Eau DI en fonction du temps à 2 GHz

Une fois les canaux fluidiques saturés (70 minutes) avec de l'eau DI, la permittivité effective complexe de l'eau mesurée à température ambiante est montrée dans la Figure 41. Afin de quantifier la répétabilité de base du dispositif à la mesure d'un liquide, nous avons rempli 10 fois successivement les canaux fluidiques avec de l'eau DI, mesurant chaque fois la permittivité effective. Nous avons obtenu un écart type de 0.009 pour la partie réelle et de 0.005 pour la partie imaginaire à une fréquence de 2 GHz.

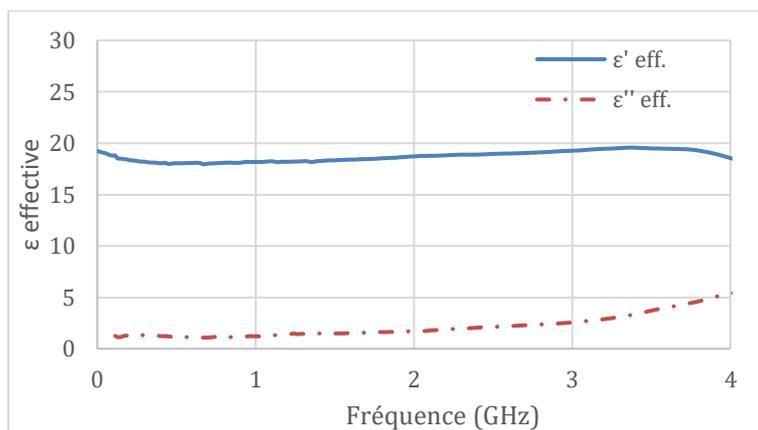


Figure 41 Permittivité effective (partie réelle et imaginaire) de l'eau DI

De la même façon nous avons mesuré de l'éthanol pur (100%) 5 fois consécutives et nous avons obtenu un écart-type de 0.01 pour la partie réelle et 0.008 pour la partie imaginaire de la permittivité effective à la fréquence de 2 GHz. La permittivité effective complexe en fonction de la fréquence mesurée pour l'éthanol pur est montrée dans la Figure 42.

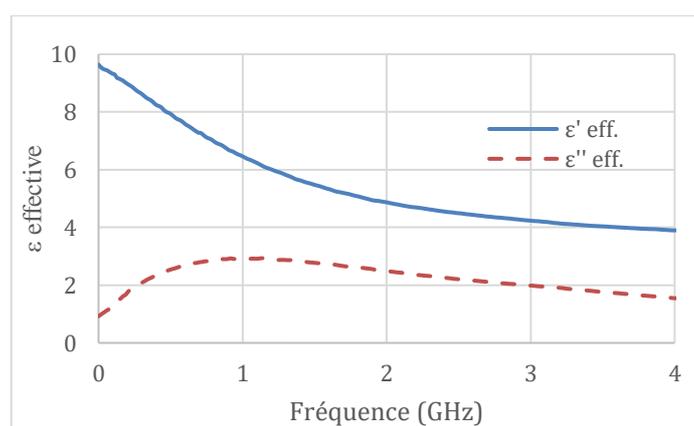


Figure 42 Permittivité effective de l'éthanol

Finalement des solutions aqueuses de BSA aux concentrations de 10, 50 et 100 mg/ml ont été mesurées. A la différence des tests faits pour le prototype V<sub>1</sub>, nous avons utilisé une gamme de concentrations plus serrée (100 mg/ml comme concentration haute de BSA plutôt que 200 mg/ml). En effet lors de la conception du dispositif V<sub>2</sub>

nous cherchions, dans l'analyse des liquides des œufs, des différences pour des concentrations faibles. En conséquence nous avons évalué la répétabilité du dispositif sur de gammes des concentration plus serrés. Les permittivités effectives pour les différentes solutions de BSA, sont montrées dans la Figure 43 pour la partie réelle et dans la Figure 44 pour la partie imaginaire. Le plan complexe de la permittivité effective (cf. Figure 45) montre les différentes mesures réalisées pour chaque solution à 2 GHz. Les écart-types obtenus pour la permittivité effective calculée pour chaque solution sont exposés dans le Tableau 7 .

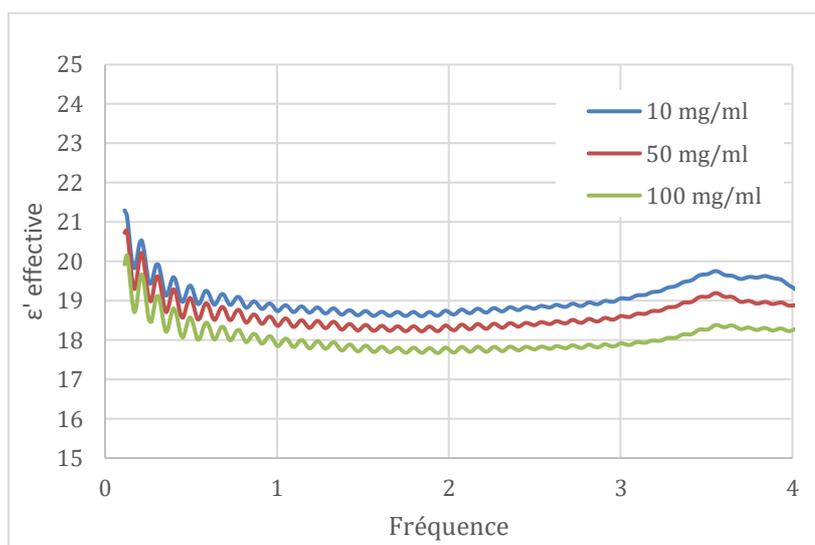


Figure 43 Partie réelle de la permittivité mesurée pour les différentes solutions de BSA

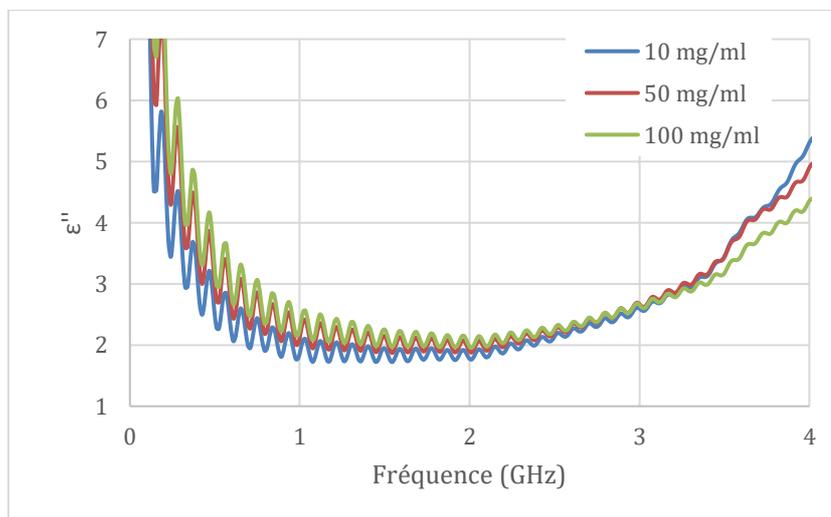


Figure 44 Partie imaginaire de la permittivité mesurée pour les différentes solutions de BSA

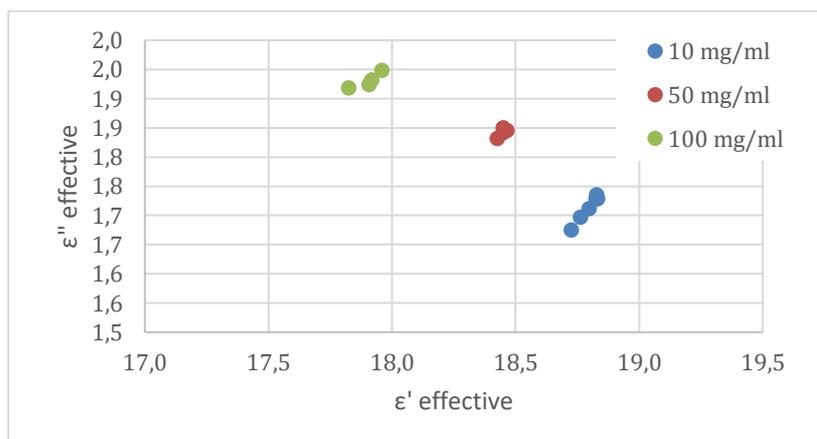


Figure 45 Plan complexe de la permittivité effective des différentes mesures faites des solutions de BSA à 2GHz

Concentration BSA (mg/ml)	Ecart-type $\sigma(\epsilon')$	Ecart-type $\sigma(\epsilon'')$
10	0,02	0,02
50	0,01	0,005
100	0,04	0,009

Tableau 7 Ecart types de la permittivité complexe pour les différentes concentrations du BSA

Les écart types obtenus sont légèrement inférieurs à ceux obtenus avec le dispositif  $V_1$  ( $\sigma(\epsilon')=0,05$  et  $\sigma(\epsilon'')=0,02$  pour une concentration de 100 mg/ml). Cependant, ils sont très proches au niveau du bruit de la mesure et ainsi nous ne pouvons pas conclure sur une possible amélioration de la répétabilité du dispositif. En revanche nous avons obtenu ces valeurs en utilisant une gamme des concentrations plus serré ( $\Delta=50\text{mg/ml}$ ) à celle utilisé pour le dispositif  $V_1$  ( $\Delta=100\text{mg/ml}$ ).

Nous retrouvons, comme nous pouvions nous y attendre, une relation quasi linéaire entre la valeur de permittivité effective mesurée et les différentes concentrations de BSA avec la version 2 du dispositif, comme cela est visible dans la Figure 46.

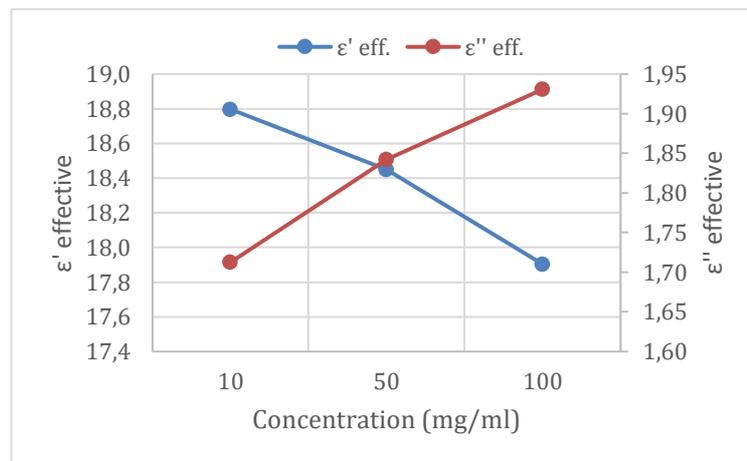


Figure 46 Permittivité effective en fonction des différentes concentrations de BSA

Ce résultat nous est utile, car comme dans la version  $V_1$ , il montre la capacité du dispositif de distinguer différentes solutions fluidiques à partir de ses propriétés diélectriques, représentées par sa permittivité effective complexe.

Cette version du dispositif a été conçue pour mesurer les liquides d'œuf lorsqu'ils sont présents en grand volume. En effet, le volume des canaux fluidiques a été doublé par rapport à la version  $V_1$ . De plus, pour remplir les canaux avec du liquide, il faut considérer les volumes morts dans les embouts d'entrée et dans les tuyaux de sortie (environ 0.15 ml de plus pour chaque canal). Enfin, le volume total pour remplir les deux canaux fluidiques a augmenté de 0.8 à 1.3 ml.

Le dispositif  $V_2$  présente une très bonne répétabilité à la mesure des liquides modèles tels que l'eau et l'éthanol. Nous avons également obtenu une bonne répétabilité à la mesure des différentes solutions de BSA en utilisant une gamme de concentrations plus serrée ( $\Delta=50$  mg/ml) que celle utilisée pour le dispositif  $V_1$  ( $\Delta=100$  mg/ml). De plus, la valeur de la permittivité effective mesurée pour l'eau DI a augmenté d'environ 18% (pour la partie réelle) en comparaison à celle obtenue avec le dispositif  $V_1$ . Nous attribuons ceci au fait d'avoir éloigné les parois du PDMS des fentes des lignes coplanaires, où le champ électromagnétique est concentré, grâce à l'augmentation de la largeur et hauteur des canaux fluidiques. Ceci nous a permis de diminuer l'influence du PDMS sur la valeur mesurée et en conséquence d'augmenter la sensibilité du dispositif à la mesure du liquide.

## **IV. CARACTERISATION RF DE DIFERENTS LIQUIDES D'OEUFS**

Avec les dispositifs de spectroscopie RF millifluidique décrits précédemment, nous avons réalisé différentes campagnes des mesures, afin de mesurer les propriétés diélectriques de différents liquides d'œuf. Le but était de trouver une signature spectrale (dans la plage RF) qui différencie un œuf male d'un œuf femelle, avec l'hypothèse que le contenu biochimique des liquides d'un œuf peut présenter des différences selon le sexe de l'embryon. Il peut s'agir de différences de concentrations de lipides, de protéines, de la teneur en eau, de concentration d'hormones, de pH, ou autres.

### **IV.1. INCUBATION DES ŒUFS ET PRELEVEMENT DES LIQUIDES**

#### **IV.1.1. Œufs de canard Mulard**

Les œufs de canard utilisés dans ce projet proviennent du couvoir de la société Sud-Ouest Accoupage (SOA) détenue par le holding MVVH (Maïsador, Vivadour et Val de Sèvre) à Aignan, dans le Gers (32000) en France. Le couvoir s'approvisionne d'œufs à couver (OAC) plusieurs fois par semaine depuis les fermes de ponte dont les troupeaux de canes « Pékin » et troupeau de mâles « Barbarie » sont utilisés pour pratiquer l'insémination artificielle 3 fois par semaine. Puis les œufs pondus sont envoyés à Aignan où ils sont stockés dans une chambre froide (entre 16 et 18°C) avant incubation.

Nous prenons ces œufs stockés dans la chambre froide du couvoir, et nous les mettons en incubation dans une couveuse modèle « *ova easy 380 advance-ex* » de la marque BRINSEA, permettant l'incubation de 180 œufs (voir Figure 47).



Figure 47 Photo de la couveuse

Les œufs sont incubés à une température de 37.7 °C avec un taux d'humidité de 57%. En utilisant une pompe d'eau automatisée, l'humidité reste stable pendant le processus d'incubation. De plus, les œufs sont basculés (de façon automatisée) d'un côté (-45°) et de l'autre (+45°), toutes les heures, pour éviter que la membrane vitelline ne se colle à la coquille. Ce qui peut affecter le développement embryonnaire, voire provoquer la mort de l'embryon. Il s'agit des mêmes conditions d'incubation implémentées dans les couvoirs industriels. L'utilisation de la couveuse nous permet d'avoir un contrôle sur tout le processus d'incubation des œufs.

Lors des campagnes de mesures réalisées, l'incubation des œufs n'a pas duré plus de 15 jours, à l'exception d'un test, en particulier, dont nous avons prolongé l'incubation jusqu'au 17<sup>ème</sup> jour. Nous nous sommes toujours limités aux deux tiers du processus d'incubation (20 jours), limite imposée pour les protocoles éthiques d'expérimentation animale du laboratoire LAAS-CNRS.

#### **IV.1.2. Prélèvement des liquides de l'œuf**

Pour démarrer cette étude, Mylène Da Silva a rejoint la société Ovalie Innovation, en tant que membre spécialisé dans l'étude des fluides des œufs de poule, pour établir des procédés et des protocoles nous permettant de prélever les liquides d'un œuf de canard. Des tests ont été faits pour valider ces protocoles utilisés dans cette partie du projet.

Le protocole des prélèvements des liquides de l'œuf commence avec l'ouverture de l'œuf par le côté de la chambre d'air. Il faut, ensuite, enlever la membrane coquillière pour pouvoir accéder directement avec une seringue au liquide allantoïque et au jaune (voir Figure 48 a et b respectivement).

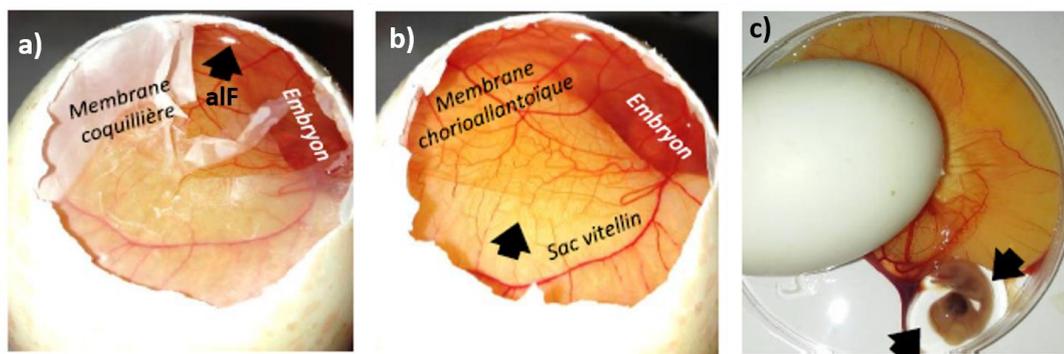


Figure 48 Prélèvements a) du fluide allantoïque b) du jaune c) du fluide amniotique

Le blanc est ensuite récupéré en perçant la coquille du côté inverse. Le reste du contenu de l'œuf est versé sur une surface plate pour récupérer avec une seringue le fluide présent dans le sac amniotique (amF) autour de l'embryon (voir Figure 48.c).

De surcroît, pour les embryons de canard mulard spécifiquement, en J-12, c'est à dire au 12<sup>ième</sup> jour d'incubation, le sexe est révélé par la couleur des yeux se présentant noire pour les mâles et rouges pour les femelles. Autrement, il serait nécessaire de prélever des tissus de l'embryon pour pouvoir relever biologiquement leur sexe par la technique de réaction en chaîne par polymérase (PCR).

## IV.2. CARACTERISATION RF DE LIQUIDES D'ŒUFS MOYENNES ET HOMOGENEISES

Les liquides de l'œuf, dans leur état naturel, se présentent non homogènes, et dans certains cas très visqueux et collants (comme le jaune et le blanc). Il est donc nécessaire d'homogénéiser les liquides des œufs pour rendre la mesure plus répétable. Une dilution avec de l'eau de-ionisée (DI) facilite la fluidique dans le cas des liquides visqueux. Des vortex et centrifugeuses ont été utilisés afin d'homogénéiser les liquides.

S'ajoute à cela la dispersion intrinsèque des œufs ayant les mêmes conditions d'incubation et dont un même liquide peut se présenter différemment d'un œuf à l'autre. Pour un premier test, nous avons moyenné des liquides d'œufs en les fusionnant dans un seul échantillon, soit un même liquide provenant de différents œufs contenant un embryon du même sexe. Pour chaque liquide prélevé d'un groupe d'œufs, nous obtenons deux échantillons, un provenant des œufs mâles (M) et un autre provenant des œufs femelles (F). Cette procédure réduit la dispersion intrinsèque des œufs, permettant, d'une part, de cibler plus facilement une possible source de différenciation sexuelle dans l'œuf, et de l'autre, d'évaluer la répétabilité du dispositif pour la mesure des liquides de l'œuf.

### IV.2.1. Cas du jaune « moyenné »

Dans un premier temps, nous avons analysé des œufs au jour 12 d'incubation (J-12).

Le jaune prélevé de 8 œufs mâles, et 8 œufs femelles, ont été mélangés, de sorte à avoir deux liquides uniques et homogènes, par sexe, qui représentent la moyenne de chaque groupe de 8 œufs. Chaque liquide a été mélangé avec un vortex pendant 1 minute, et centrifugé pendant 10 minutes, à 3000 G. Chaque liquide a été mesuré 5 fois pour quantifier la répétabilité du dispositif de mesure RF contenant du jaune. Ces tests ont été réalisés avec le dispositif RF V<sub>1</sub>.

Tel que montré précédemment dans le protocole fluide, l'eau est mesurée avant la mesure de chaque liquide, comme une référence. La valeur de la permittivité effective référencée à l'eau est exprimée comme suit :

$$\Delta \varepsilon_{eff} = \varepsilon_{eff_{Liquide}} - \varepsilon_{eff_{Eau}}$$

Ainsi toute dérive liée à une contamination des canaux fluidiques est minimisée.

Le plan complexe de la permittivité référencée à l'eau ( $\Delta\varepsilon$ ) mesurée pour le jaune moyenné des œufs en J-12, à 2 GHz est montré dans la Figure 49. Chaque échantillon a été mesuré 5 fois. Les écarts-types calculés pour les 5 mesures de chaque liquide ainsi que la différence des moyennes des permittivités, mesurées pour les œufs mâles et femelles  $\Delta_{\bar{M}-\bar{F}}$ , sont exposés dans le Tableau 8. Cette différence de moyennes mâle femelle est donnée par l'équation :

$$\Delta_{M-F} = \overline{\Delta\varepsilon_{Male}} - \overline{\Delta\varepsilon_{Female}}$$

Sexe	$\Delta\varepsilon'$	$\Delta\varepsilon''$
$\sigma$ (M)	0,1	0,02
$\sigma$ (F)	0,02	0,003
$\Delta_{\bar{M}-\bar{F}}$	0.2	0.03

Tableau 8 Ecart-types Jaune moyenné

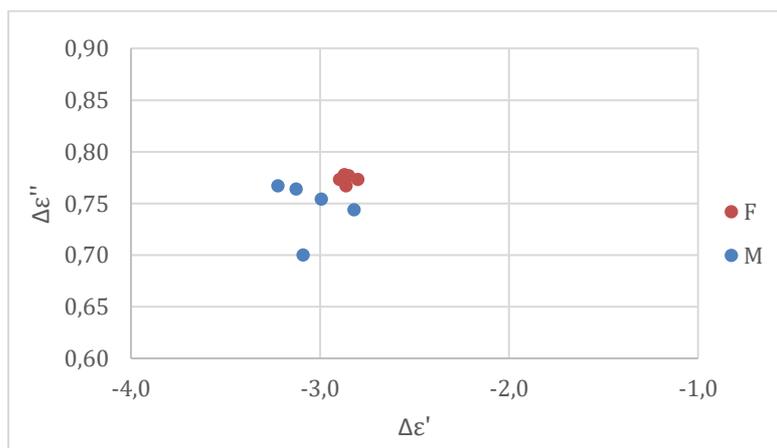


Figure 49 Permittivité complexe obtenue pour les échantillons de Jaunes moyennés J-12 moyenné à 2 GHz

On observe une dispersion plus élevée pour la mesure de l'échantillon de jaune provenant des œufs mâles. Ceci est dû probablement à une contamination du canal fluide pendant la mesure des échantillons mâles. Cependant, la différence entre les moyennes des permittivités mâles et femelle ( $\Delta_{\overline{M}-\overline{F}}$ ) reste plus élevée que la dispersion obtenue. En conclusion, ce premier test révèle le jaune comme une possible source de différenciation sexuelle chez l'œuf.

#### IV.2.2. Cas du jaune « moyenné » et dilué avec de l'eau DI

Afin d'éviter la dispersion due à la contamination des canaux fluidiques, nous avons dilué une partie des échantillons précédemment mesurés dans 10 fois leur volume (x10) avec de l'eau DI. Le jaune provenant des œufs non fécondés (clairs) a été aussi mélangé (moyenné) et mesuré. Pour évaluer la répétabilité du dispositif, chaque échantillon a été mesuré 5 fois. La Figure 50 montre la permittivité effective référencée à l'eau ( $\Delta\epsilon$ ), obtenue à 2 GHz pour chaque mesure faite avec le dispositif RF V<sub>1</sub>.

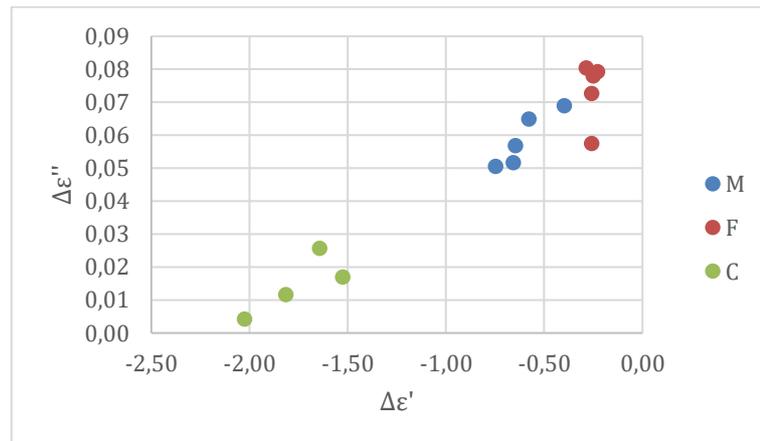


Figure 50 Permittivité complexe obtenue pour les échantillons de Jaunes moyennés et dilués en eau DI x10 pour des œufs Males (M) femelles (F) et clairs (C)

Les écart-types entre les œufs mâles, femelles, et clairs, ainsi que la différence des moyennes mâle-femelle ( $\Delta_{\bar{M}-\bar{F}}$ ) et la différence des moyennes œufs fécondés-clairs ( $\Delta_{\bar{Fec.}-\bar{C}}$ ) sont montrés dans le Tableau 9:

Sexe	$\Delta \epsilon'$	$\Delta \epsilon''$
$\sigma$ (M)	0.02	0.02
$\sigma$ (F)	0.07	0.008
$\sigma$ (C)	0.16	0.01
$\Delta_{\bar{M}-\bar{F}}$	0.3	0.02
$\Delta_{\bar{Fec.}-\bar{C}}$	1.32	0.05

Tableau 9 Ecart types à 2 GHz pour les parties réelle et imaginaire de la permittivité pour des œufs mâles, femelles, et clairs.

En diluant le jaune, la répétabilité de la mesure a été améliorée, ceci est dû à la facilité de rinçage des canaux. Nous retrouvons un bon contraste mâle/femelle malgré la dilution des échantillons. De plus nous observons un excellent contraste entre les œufs fécondés et les œufs clairs (non-fécondés).

L'hypothèse que nous avons attribuée à cette piste de sexage, est une éventuelle différence de vitesse de croissance entre les embryons des différents sexes. Ceci a un effet notamment sur la consommation des nutriments de l'embryon présents dans le jaune, étant la principale source de nutriments pendant le développement embryonnaire. Cependant, pour confirmer cette piste de sexage, il nous faut augmenter le nombre d'œufs mesurés, ainsi qu'utiliser un échantillon unique par œuf et donc employer des liquides non-moyennés, ce qui fera l'objet d'un paragraphe ultérieur (IV.3).

### IV.2.3. Cas du fluide allantoïque « moyenné »

Le fluide allantoïque a été aussi mesuré dans ces premiers tests, en prenant 8 échantillons mâles et 8 femelles provenant d'œufs en J-12, les mêmes œufs utilisés pour la mesure du jaune moyenné, en utilisant le même protocole de préparation, à savoir que chaque échantillon a été mélangé avec un vortex pendant 1 minute et centrifugé 10 minutes à 3000 G.

La permittivité effective pour chaque mesure faite du liquide allantoïque et obtenu avec le dispositif RF  $V_1$  est montrée dans le plan complexe de la permittivité sur la Figure 51, à une fréquence de 2 GHz. De plus, les écarts-types calculés pour 5 mesures de chaque liquide sont montrés dans le Tableau 10.

La répétabilité obtenue en mesurant le liquide allantoïque est très performante, car il s'agit d'un liquide aqueux dans son état naturel, et donc facile à nettoyer. Cependant, les résultats ne montrent pas une différence entre les échantillons mâles et femelles. La différence entre les moyennes des mâles et femelles ( $\Delta_{\bar{M}-\bar{F}}$ ) est très faible pour la partie réelle de la permittivité référencé à l'eau ( $\Delta\epsilon'$ ). Pour la partie imaginaire ( $\Delta\epsilon''$ ) cette différence augmente, mais la dispersion restant inférieure a cette différence ne permet pas de discriminer l'échantillon mâle de l'échantillon femelle (voir Figure 51).

Sexe	$\Delta\epsilon'$	$\Delta\epsilon''$
$\sigma$ (M)	0.02	0.07
$\sigma$ (F)	0.06	0.05
$\Delta_{\bar{M}-\bar{F}}$	0.05	0.1

Tableau 10 Ecart types pour les fluides allantoïques moyennés en J-12

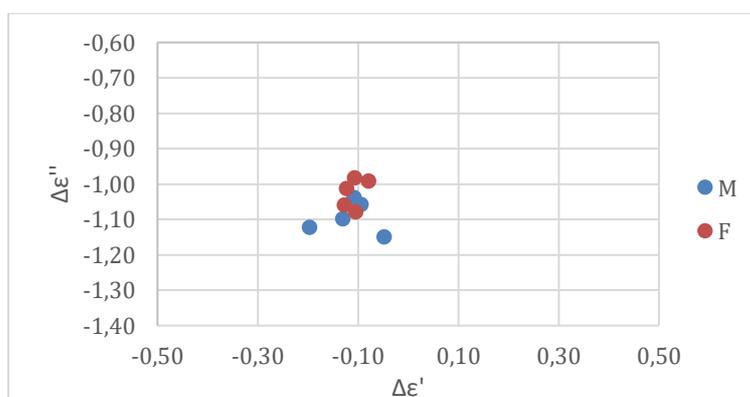


Figure 51 Plan complexe de  $\Delta\epsilon$  à 2 GHz pour les Fluides allantoïques moyennés en J-12

Le fluide allantoïque a été confirmé précédemment comme une source de discrimination male-femelle dans les œufs de poule (Weissmann et al. 2013). En effet ils ont montré que l'hormone sulfate d'estrone se présente en plus faible concentration chez les mâles. Cependant cette différence de concentration est très faible (de l'ordre de nano-grammes/ml), et donc difficile à identifier avec les techniques RF, qui ne sont pas adaptées à la détection de traces de molécules.

#### IV.2.4. Cas du Blanc « moyenné » et dilué avec de l'eau DI

Le blanc provenant des œufs en J-12 a été également moyenné en trois échantillons, un male (M), un femelle (F), et un provenant d'œufs clairs (C). Tous les échantillons ont été dilués dans 10 fois leur volume (x10) avec de l'eau DI. Chaque échantillon a été mesuré 3 fois pour quantifier la répétabilité de la mesure de ce liquide avec le dispositif millifluidique V<sub>1</sub>. Les permittivités référencées à l'eau ( $\Delta\epsilon$ ), obtenues à partir des mesures faites pour chaque liquide à une fréquence de 2 GHz, sont montrés dans la Figure 52. De plus, les écarts-types obtenus pour les 3 mesures de chaque échantillon, ainsi que les contrastes des moyennes male-femelle et œuf fécondés-clairs, sont exposés dans le Tableau 11.

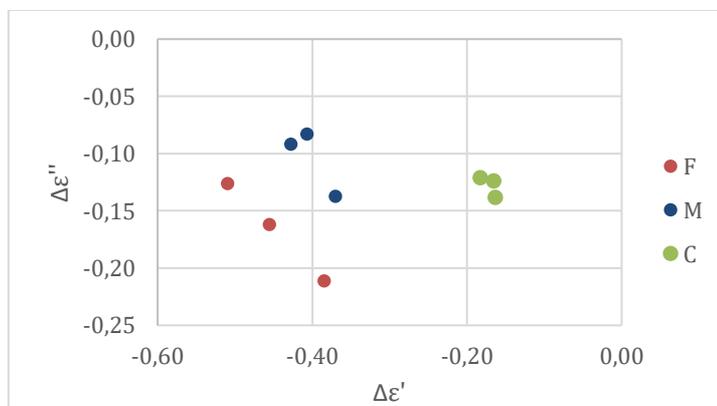


Figure 52 Plan complexe de  $\Delta\epsilon$  à 2 GHz pour les échantillons de Blanc « moyennés » et dilués x10

Sexe	$\Delta\epsilon'$	$\Delta\epsilon''$
$\sigma$ (M)	0.02	0.02
$\sigma$ (F)	0.04	0.03
$\sigma$ (C)	0.008	0.006
$\Delta_{\bar{M}-\bar{F}}$	0.05	0.06
$\Delta_{\bar{Fec.}-\bar{C}}$	0.25	0.007

Tableau 11 écart types pour les échantillons de blanc J-12 « moyennés » et dilués x10

La dilution du blanc x10 en eau DI a permis d'augmenter la liquidité de l'échantillon, et par conséquent, d'obtenir une bonne répétabilité de la permittivité mesurée. Cependant, le contraste des moyennes des mâles et femelles  $\Delta_{\bar{M}-\bar{F}}$  est du même ordre que la dispersion obtenue pour les œufs du même sexe. Ceci peut être attribué à la dilution du liquide, diminuant ainsi le contraste M-F. En revanche, l'analyse visuelle du plan complexe de  $\Delta\epsilon$  de la Figure 52, permet de bien différencier les trois liquides mesurés. Nous garderons alors ce résultat comme une piste de différenciation sexuelle que nous analyserons ci-après. De plus, nous observons une excellente discrimination des œufs clairs par rapport aux œufs fécondés.

### **IV.3. CARACTERISATION RF DE LIQUIDES D'ŒUFS INDIVIDUELS – CAS DU JAUNE POUR 40 ŒUFS**

Sur la base des précédents résultats obtenus en mesurant des échantillons de jaune moyennés, nous avons mené une première campagne de mesures avec un nombre important d'œufs. Les œufs mesurés ont été incubés, dans les locaux d'Ovalie Innovation à Auch, suivant le même protocole des manipulations précédentes. Au jour 12 d'incubation (J-12), les œufs ont été transportés au laboratoire LAAS-CNRS à 37°C pour effectuer les prélèvements et mesures RF suivant les protocoles décrits dans le paragraphe IV.1 de ce chapitre. Les échantillons de jaune ont été centrifugés pendant 10 minutes à 3000G pour les homogénéiser. Ensuite, ils ont été directement mesurés dans le dispositif de spectroscopie millifluidique RF V<sub>1</sub>, à température ambiante.

La permittivité des 40 échantillons de jaune, dont 20 mâles et 20 femelles, a été mesurée. La permittivité effective référencée à l'eau ( $\Delta\epsilon$ ), est montrée dans le plan complexe à la fréquence de 2 GHz sur la Figure 53. Ce résultat ne nous permet pas de discriminer les échantillons mâles des femelles au niveau œuf individuel. En effet, la dispersion entre les œufs de même sexe est très élevée, supérieure à la différence entre la moyenne des mâles et femelles. Les écarts-types calculés sur les 20 échantillons de chaque sexe sont exposés dans le Tableau 12.

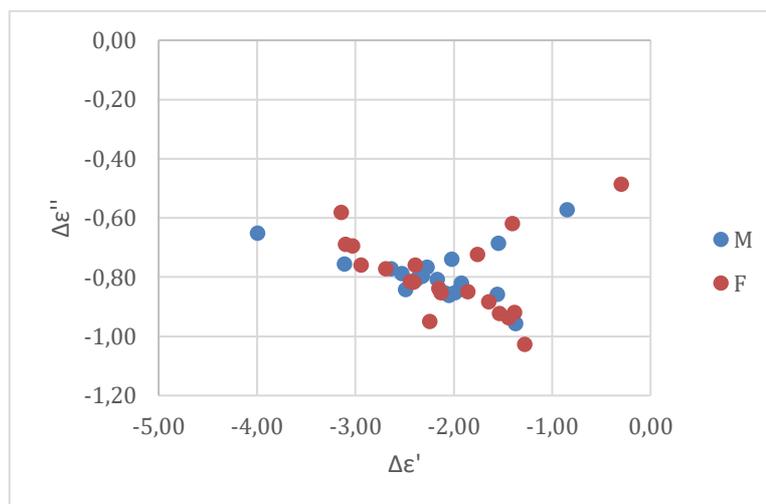


Figure 53 Plan complexe de  $\Delta\epsilon$  à 2 GHz pour 40 échantillons de Jaune d'œuf en ED-12

Sexe	$\Delta\epsilon'$	$\Delta\epsilon''$
$\sigma$ (M)	0.33	0.04
$\sigma$ (F)	0.4	0.1

Tableau 12 Ecart-types du  $\Delta\epsilon$  mesuré pour les échantillons de jaune d'œufs mâles et femelles à 2GHz

Nous concluons donc que les mesures RF réalisées avec le dispositif RF  $V_1$  sur le jaune d'un nombre important d'œufs individuels (40), ne permet pas de statuer sur le sexe de l'embryon. Autrement dit, la différence liée au sexe est inférieure à la dispersion intrinsèque entre œufs.

#### IV.4. CARACTERISATION RF DE LIQUIDES D'ŒUFS INDIVIDUELS – CAS DU BLANC POUR 35 ŒUFS

Le blanc a été prélevé sur 35 œufs en J-12 utilisés pour la mesure du Jaune, précédemment décrite dans ce chapitre. Les échantillons ont été stockés à  $-20^\circ\text{C}$ , juste après prélèvement, puis décongelés le lendemain et dilués en eau DI dans 4 fois leur volume (x4). L'objectif est d'avoir un fluide suffisamment dilué pour pouvoir rincer les canaux fluidiques, et en même temps, de minimiser la dilution pour ne pas perdre d'informations à cause de la dilution. Finalement, les échantillons ont été mélangés avec un vortex pendant 1 minute, et centrifugés à 3000G pendant 10 minutes à température ambiante. La permittivité effective référencée à l'eau mesurée pour 16

échantillons mâles (M) et 19 échantillons femelles est montrée dans le plan complexe de  $\Delta\varepsilon$  sur la Figure 54 à 2 GHz, en utilisant le dispositif RF V<sub>1</sub>.

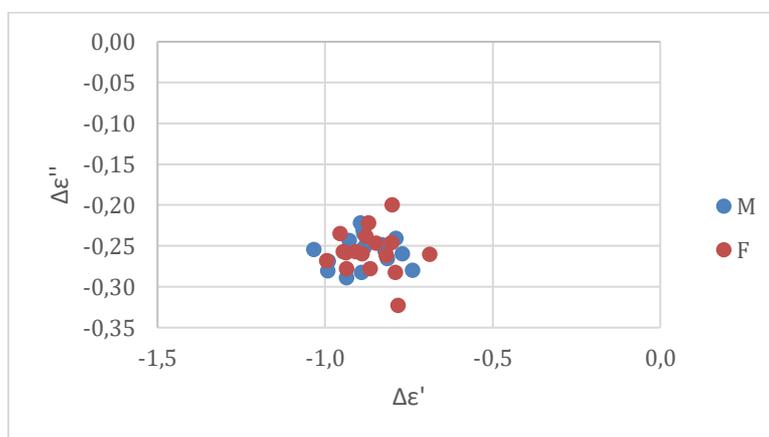


Figure 54 Plan complexe de  $\Delta\varepsilon$  à 2 GHz pour des échantillons de Blanc dilué avec de l'eau DI (x4) d'œufs en J-12

Sexe	$\Delta\varepsilon'$	$\Delta\varepsilon''$
$\sigma$ (M)	0.06	0.01
$\sigma$ (F)	0.06	0.02

Tableau 13 écart-types blanc d'œuf dilué x4 en eau DI des œufs en J-12

On observe que la dispersion entre les différents œufs du même sexe est considérablement inférieure à celle obtenue pour la mesure du jaune, bien que provenant des mêmes œufs (cf. Tableau 13). Ceci indique que le blanc présente des propriétés diélectriques similaires entre les différents œufs. Cependant, ce liquide se présente de façon similaire entre œufs de différent sexe. En définitive, ce liquide ne porte pas d'information qui pourrait nous permettre de discriminer diélectriquement un œuf mâle d'un œuf femelle.

#### IV.5. CARACTERISATION RF DE LIQUIDES D'ŒUFS – CAS DU LIQUIDE EXTRA EMBRYONNAIRE

Une autre hypothèse posée, après cette première campagne de mesures de liquides d'œufs, est que la source de différenciation sexuelle ne se trouve pas dans un liquide en particulier mais dans l'ensemble des liquides de l'œuf, y compris les membranes extra-embryonnaires. Nous avons donc décidé de mesurer un liquide composé de tous les liquides et membranes intra-coquillières d'un œuf (sans l'embryon et sans la coquille), nommé « liquide extra-embryonnaire ».

### IV.5.1. Premiers tests réalisés sur le liquide extra-embryonnaire

Nous avons mesuré 10 échantillons du liquide extra-embryonnaire, dont 5 provenant d'œufs mâles et 5 d'œufs femelles en J-12. Ces échantillons ont été prélevés puis broyés avec un turrax permettant de casser les membranes. Les échantillons ont été, par la suite, stockés à  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Avant de réaliser les mesures RF, chaque échantillon a été décongelé et dilué dans deux fois son volume (x2) avec de l'eau DI. Postérieurement, ils ont été mélangés avec un vortex pendant 1 minute, et centrifugés à 3000G pendant 10 minutes. Les mesures ont été faites à température ambiante en utilisant le dispositif RF V<sub>1</sub>.

Le plan complexe à 2 GHz de la Figure 55 montre la permittivité effective mesurée pour chaque échantillon de liquide extra-embryonnaire référencé à l'eau ( $\Delta\epsilon$ ). Les écarts-types calculés entre les échantillons mâles et femelles sont exposés dans le Tableau 14. Nous observons que la dispersion est inférieure à la différence des moyennes entre mâles et femelles  $\Delta_{\bar{M}-\bar{F}}$ .

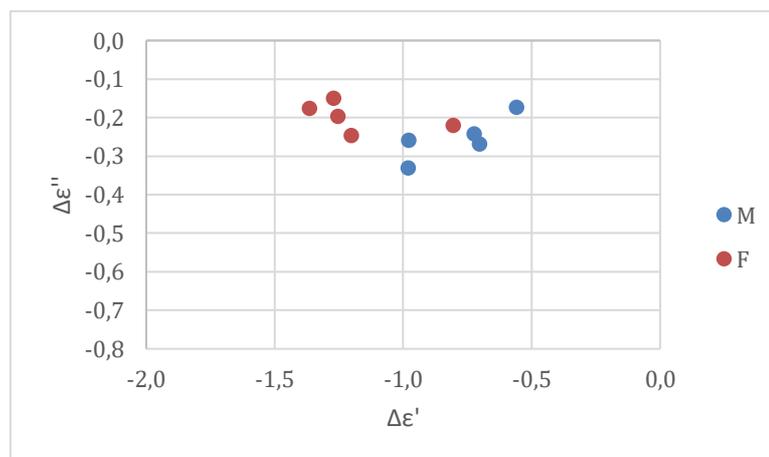


Figure 55 Plan complexe de  $\Delta\epsilon$  à 2GHz du Liquide extra embryonnaire pour 5 échantillons Male (M) et 5 femelles (F) à 2GHz.

Sexe	$\Delta\epsilon'$	$\Delta\epsilon''$
$\sigma$ (M)	0.15	0.04
$\sigma$ (F)	0.15	0.03
$\Delta_{\bar{M}-\bar{F}}$	0.4	0.05

Tableau 14 écart-types liquide extra-embryonnaire J-12

Ce résultat ouvre une nouvelle piste de différenciation sexuelle, dans laquelle l'ensemble des contenus de l'œuf, sauf l'embryon, pourraient présenter des propriétés diélectriques différentes selon le sexe. Effectivement, cette hypothèse repose sur le fait

qu'un œuf contenant un embryon est une entité biologique complexe composée de différentes structures dont les changements, pendant le développement embryonnaire, sont liés les uns aux autres.

En conséquence, nous avons décidé d'étudier le liquide extra-embryonnaire en améliorant les protocoles de conditionnement, ainsi que la fluidique associée en utilisant la version V<sub>2</sub> du dispositif de spectroscopie RF millifluidique.

#### **IV.5.2. Préparation des échantillons du liquide extra-embryonnaire V2**

Le liquide extra-embryonnaire se présente en grandes quantités dans l'œuf (environ 100 ml par échantillon pour les œufs en J-12). Cela nous a permis d'augmenter la taille de canaux fluidiques sur la deuxième version du dispositif de spectroscopie millifluidique (V<sub>2</sub>), décrit précédemment dans le paragraphe III.2.6 ce chapitre. De surcroît, le protocole de conditionnement des échantillons a été optimisé afin d'homogénéiser le liquide, avant les mesures RF.

Le prélèvement ne présente pas de difficultés particulières, comme il s'agit d'enlever l'embryon de l'œuf en gardant tout le liquide présent à l'intérieur, y compris les membranes extra-embryonnaires. Suite au prélèvement, le liquide est stocké à -20°C. Le protocole de conditionnement du liquide extra-embryonnaire que nous avons mis en place est détaillé, pas à pas, ci-dessous.

1. **Décongélation** des échantillons sans dépasser les 4 °C.
2. **Broyage grossier** des échantillons avec un *turrax* : cycles de 10 secondes ON et 10 secondes OFF pendant une minute, tout en conservant l'échantillon dans la glace (à 4 °C).
3. **Broyage fin** par « *sonication* »: Cycle à ultra sons de 10 secondes ON et 10 secondes OFF pendant une durée totale de 2 minutes, avec une puissance de 180 Watts, tout en gardant l'échantillon à 4° (cf. Figure 56).
4. **Dilution** des échantillons dans deux fois leur volume (x2) avec de l'eau DI à 4° C, puis mélange en vortex pendant 1 min.
5. **Centrifugation** pendant 10 min à 3000G à 4°C.

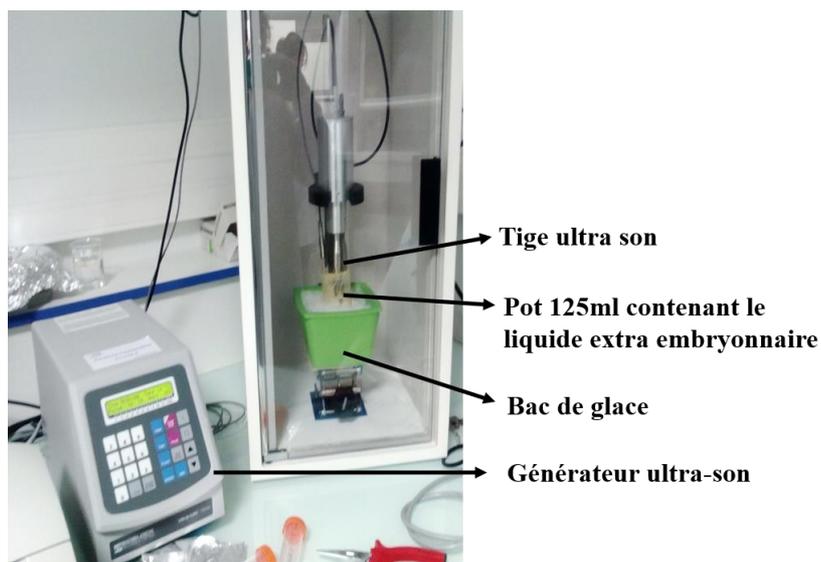


Figure 56 Banc à ultra-son pour le broyage fin des membranes extra-embryonnaires

La « sonication » a pour but de casser les membranes extra-embryonnaires présentes dans le liquide. Cependant, après sonication, des petits morceaux de membranes restent encore en suspension dans le liquide. Pour cette raison, nous appliquons une centrifugation afin de décanter au fond du falcon les morceaux des membranes. Ceci nous permettra d'avoir des mesures plus répétables. Avant de réaliser les mesures RF, les échantillons sont ramenés à température ambiante.

### IV.5.3. Protocole fluidique V<sub>2</sub>

Afin d'optimiser la partie fluidique, nous avons adapté le protocole V<sub>1</sub> à la mesure du liquide extra-embryonnaire. Nous avons notamment amélioré la procédure de rinçage des canaux fluidiques en présence d'un fluide très visqueux et collant. Pour cela, nous avons ajouté du dodécylsulfate de sodium (SDS), qui n'est autre qu'un détergent, concentré à 10% pour pouvoir enlever le matériel gras des canaux fluidiques, puis utilisé de l'éthanol pour enlever toute bulle d'air produite par le SDS. Enfin, l'éthanol est rincé avec de nombreux passages d'eau DI. Le protocole fluidique utilisé pour la mesure du liquide extra-embryonnaire est montré dans le schéma de la Figure 57.

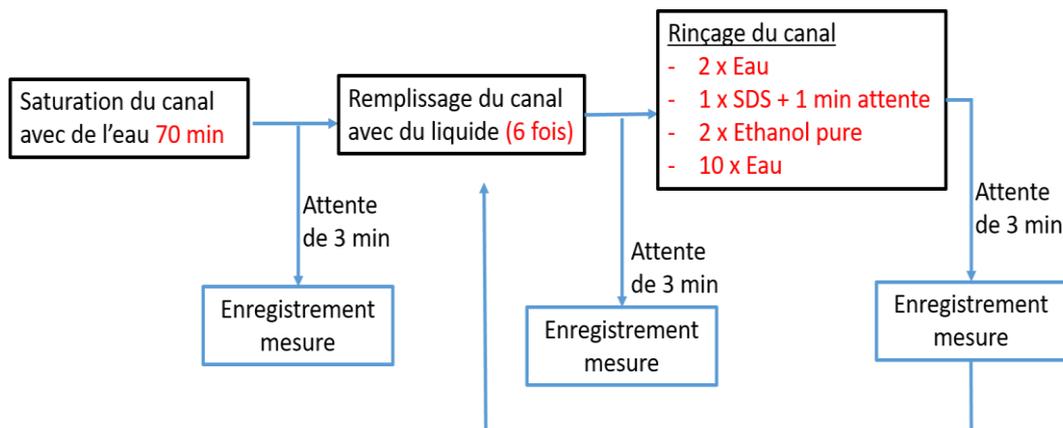


Figure 57 protocole fluidique V2 développé pour la mesure RF de liquide extra-embryonnaire

Le but de ce protocole est d'augmenter la répétabilité du dispositif en diminuant la dispersion due à la fluidique. Les échantillons à mesurer ont un volume suffisant pour pouvoir augmenter le nombre de passages dans les canaux fluidiques. Ceci permet de s'assurer que le contenu des canaux est dans sa totalité composé par le liquide. Toutefois, avec ce nouveau protocole nous avons augmenté considérablement le temps de mesure par liquide.

Des tests ont été faits en mesurant l'eau à la fin du rinçage des canaux contenant précédemment du liquide extra embryonnaire (eau de référence). Nous avons répété cette procédure 10 fois consécutives. La permittivité effective de l'eau de référence mesurée à 2 GHz est montrée dans le plan complexe de la Figure 58. L'écart-type calculé sur les 10 mesures est de 0.03 pour la partie réelle et de 0.02 pour la partie imaginaire de la permittivité effective à 2 GHz. Ceci indique que la procédure de rinçage n'augmente pas la dispersion de la mesure d'un liquide et que les canaux sont alors correctement nettoyés.

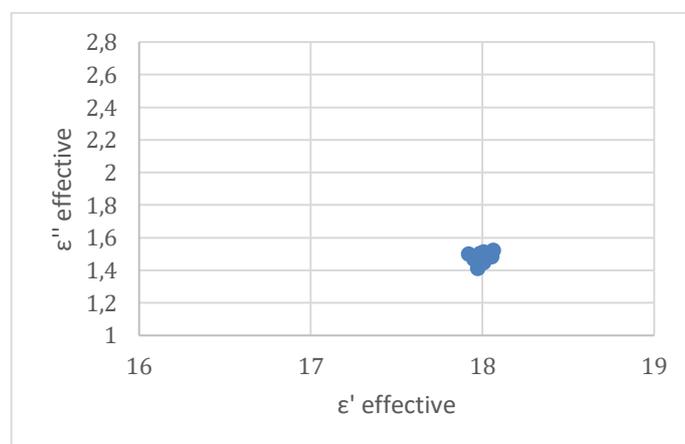


Figure 58 Plan complexe de la permittivité de l'eau de référence après rinçage du liquide extra-embryonnaire à 2 GHz

Des échantillons du liquide extra-embryonnaire conditionnés avec le protocole décrit précédemment, ont été mesurés pour évaluer l'effet de la « sonication » sur la répétabilité de la mesure du liquide. Les écarts-type, obtenus pour la valeur de la permittivité effective référencée à l'eau ( $\Delta\epsilon$ ), calculés pour 5 mesures d'un échantillon de liquide extra-embryonnaire non soniqué et pour 5 mesures d'un échantillon de liquide extra-embryonnaire soniqué pendant 2 minutes, sont montrés dans le Tableau 15

Temps sonication	$\sigma(\Delta\epsilon')$	$\sigma(\Delta\epsilon'')$
0 min.	0.04	0.04
2 min.	0.04	0.03

Tableau 15 écart-types liquide extra-embryonnaire soniqués

La procédure de sonication n'apporte pas une meilleure répétabilité de la mesure de ce liquide. Cependant, l'effet de casser les membranes extra-embryonnaires avec l'ultrason peut apporter de l'information supplémentaire au liquide, ce qui peut être pertinent pour la différenciation sexuelle des œufs. En conclusion, nous avons maintenu le broyage fin à l'ultrason dans le protocole de conditionnement des échantillons du liquide extra-embryonnaire.

#### IV.5.4. Campagne d'analyse RF du liquide extra-embryonnaire des œufs en J-12

En utilisant le protocole fluide et le protocole de conditionnement des échantillons précédemment décrits, on a mesuré 20 échantillons du liquide extra-embryonnaire provenant d'œufs au stade J-12. Pour cette campagne de mesure, 30 œufs ont été ramenés du couvoir au laboratoire LAAS-CNRS en J-0, où ils ont été mis en incubation. Au bout du 12<sup>ème</sup> jour, les œufs ont été sortis de la couveuse et le liquide extra-embryonnaire a été prélevé pour chaque œuf, puis stocké directement à -20°C. Le lendemain, 20 échantillons, dont 10 mâles et 10 femelles ont été conditionnés et mesurés à température ambiante.

La permittivité effective référencée à l'eau ( $\Delta\epsilon$ ) mesurée pour chaque échantillon est montrée dans le plan complexe à 2 GHz dans la Figure 59.

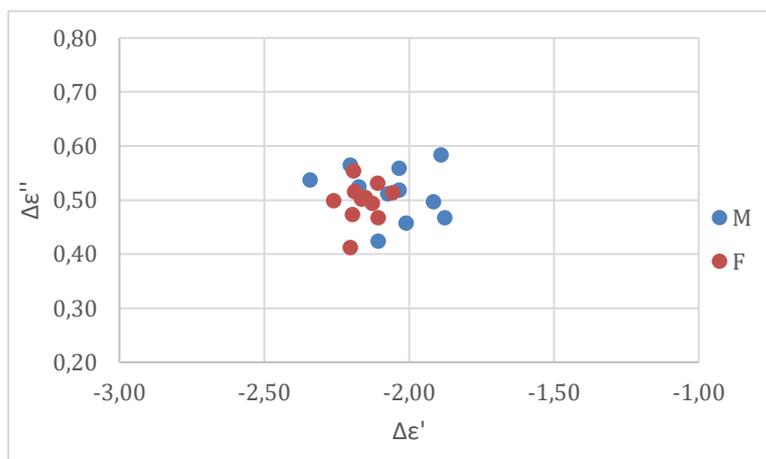


Figure 59 Plan complexe de  $\Delta\varepsilon$  à 2GHz du liquide extra-embryonnaire en ED-12

Les écarts-types calculés pour les échantillons du même sexe, ainsi que la différence entre les moyennes des permittivités effectives de mâles et femelles  $\Delta_{\bar{M}-\bar{F}}$  sont exposés dans le Tableau 16 :

	$\sigma(\Delta\varepsilon')$	$\sigma(\Delta\varepsilon'')$
<b>M</b>	0.1	0.04
<b>F</b>	0.04	0.02
$\Delta_{\bar{M}-\bar{F}}$	0.1	0.02

Tableau 16 Ecarts-type de  $\Delta\varepsilon$  pour les mâles (M) et femelles (F) et contraste male-femelle  $\Delta_{\bar{M}-\bar{F}}$  du liquide extra-embryonnaire en ED-12

La permittivité effective de l'eau de référence, a été mesurée, chaque fois, en fin de rinçage des canaux fluidiques avec un écart type (calculé sur 20 mesures) de, respectivement, 0.03 et 0.04 pour les parties réelle et imaginaire. Nous obtenons ainsi un contraste de moyennes des permittivités référencées à l'eau entre mâles et femelles de 0.1. A contrario, l'écart type est du même ordre pour les échantillons mâles, ce qui ne nous permet pas de confirmer cette différence.

## V. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Dans le deuxième chapitre de ce manuscrit, nous avons abordé les travaux de recherche dédiés à l'étude des liquides constituant les œufs. Dans une première partie, nous avons décrit le processus de conception d'une instrumentation RF nous permettant de mesurer les propriétés diélectriques de ces liquides. Deux versions du dispositif ont été conçues et validées en utilisant des liquides modèles tels que l'eau, l'éthanol, et des solutions de BSA.

Dans une deuxième partie nous avons appliqué cette instrumentation à l'étude de liquides constituant l'œuf en mettant en place des protocoles fluidiques et de conditionnement des échantillons.

Les conclusions et perspectives concernant le dispositif RF milli fluidique et concernant la mesure des liquides des œufs sont décrites ci-dessous.

### V.1. INSTRUMENTATION RF MILLIFLUIDIQUE : DISPOSITIF DE SPECTROSCOPIE RF DE LIQUIDES

Deux versions du dispositif de spectroscopie RF millifluidique ( $V_1$  et  $V_2$ ) ont été conçues, elles sont le résultat d'un processus d'optimisation, afin d'augmenter la sensibilité du dispositif. Les deux versions du dispositif ont montré une bonne répétabilité à la mesure des liquides modèles (eau et BSA), pour le dispositif  $V_2$  nous avons utilisé une gamme des concentrations de BSA plus serrée ( $\Delta=50$  mg/ml pour  $V_2$  versus  $\Delta=100$  mg/ml pour le dispositif  $V_1$ ).

De plus, la permittivité effective mesurée avec le dispositif  $V_2$  pour l'eau est supérieure à celle obtenue avec le dispositif  $V_1$ . Nous attribuons ceci au fait d'avoir augmenté la largeur et hauteur des canaux fluidiques nous permettant d'éloigner les parois du PDMS des fentes des lignes coplanaires, où le champ électromagnétique est concentré, et en diminuant l'effet de ce matériau dans la valeur mesurée. Ainsi, pour cette version du dispositif la valeur de la permittivité effective mesurée est plus sensible au liquide présent dans les canaux fluidiques.

La permittivité effective mesurée avec le dispositif de spectroscopie RF millifluidique, correspond à la moyenne pondérée des permittivités du liquide, présent dans les canaux fluidiques, et des matériaux du dispositif (PDMS, substrat, acrylique,

air) qui interagissent avec l'onde propagée. Cette valeur nous a permis de détecter s'il existe des différences de contenus entre les liquides étudiés.

Postérieurement aux campagnes de mesures faites sur liquides modèles et issus d'œufs, et afin d'aboutir la méthode de spectroscopie RF des liquides, nous avons cherché à obtenir la permittivité d'un liquide ( $\varepsilon$ ) à partir de la permittivité effective ( $\varepsilon_{eff}$ ), mesuré, grâce à l'équation suivante :

$$\varepsilon = a\varepsilon_{eff} + b$$

Nous avons mis en place une procédure de calibrage en utilisant des liquides modèles, dont la permittivité est connue, afin d'obtenir les constantes  $a$  et  $b$  de l'équation précédente. Pour cela, nous avons calculé les permittivités théoriques de l'eau DI (Ellison 2007) et de l'éthanol pure (Buckley 1958) à température ambiante ( $t=20$  °C) à partir de l'équation :

$$\varepsilon = \varepsilon_{\infty}(T) + \frac{\varepsilon_0 - \varepsilon_{\infty}}{1 + j2\pi f\tau(T)}$$

Ici,  $T$  est la température du liquide,  $\varepsilon_{\infty}$  sa permittivité quand la fréquence est  $f=\infty$ ,  $\varepsilon_0$  la permittivité quand la fréquence est  $f = 0$ , ainsi que  $\tau(T)$  est le temps caractéristique de relaxation du liquide à une température  $T$ . Les permittivités théoriques (parties réelle et imaginaire) calculées pour l'eau DI et l'éthanol pure à 20 °C sont montrées dans la *Figure 60*.

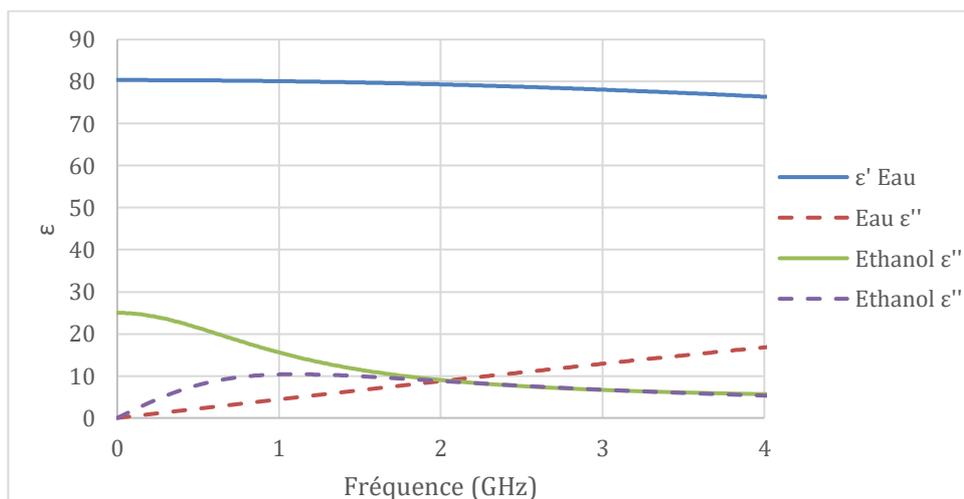


Figure 60 Permittivité théorique de l'eau DI et de l'éthanol à 20°C

A partir de la mesure de la permittivité effective de ces liquides (eau DI et éthanol) avec le dispositif de spectroscopie RF millifluidique, et ses respectives

permittivités théoriquement calculées avec l'équation décrite précédemment, nous pouvons alors déduire les constantes **a** et **b**, dépendantes de la fréquence.

Pour valider cette procédure, nous avons mesuré une solution aqueuse de BSA à une concentration de 50 mg/ml, avec le dispositif V2. Nous avons également mesuré la permittivité de cette même solution avec la sonde *Keysight N1501A* pour les comparer. Les résultats obtenus sont montrés dans la Figure 61 :

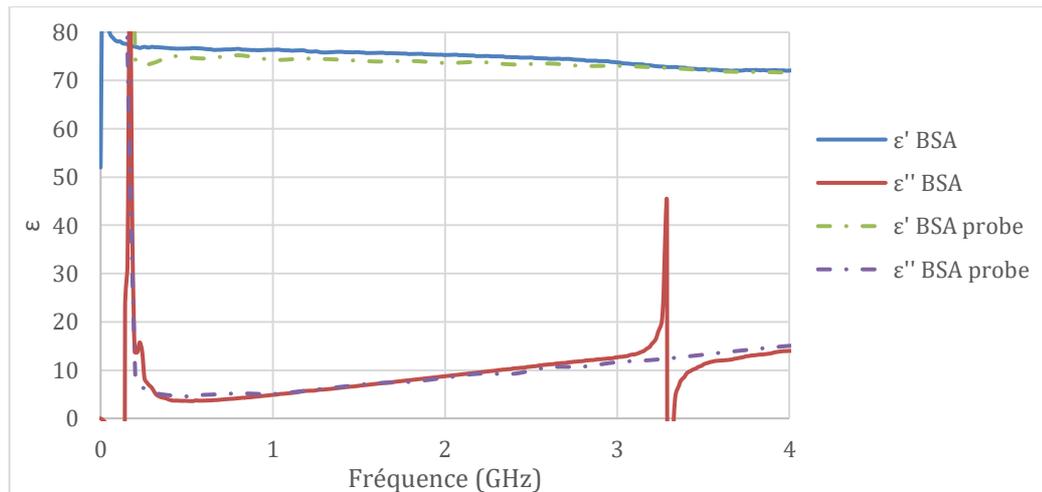


Figure 61 Permittivité de BSA 50 mg/ml mesuré avec le dispositif de spectroscopie RF millifluidique V2 et avec la sonde Keysight N1501A (probe).

On observe un bon raccord entre les courbes obtenues avec le dispositif, et celles mesurées avec la sonde. Les légères variations peuvent être attribués à la qualité de l'eau DI utilisée. D'autre part, concernant la partie imaginaire, on observe à 3.1 GHz une discontinuité ( $\pm\infty$ ) due à une division par 0 dans la méthode de calcul. Ceci est en effet dépendant des permittivités des liquides modèles mesurés. Une solution envisagée serait de changer l'un des liquides utilisés pour le calibrage, ou bien d'ajouter un troisième liquide nous permettant d'éliminer cette discontinuité.

## V.2. APPLICATION DE L'INSTRUMENTATION RF MILLIFLUIDIQUE POUR CARACTERISER DES LIQUIDES ISSUS D'ŒUFS

Différents liquides des œufs ont été analysés en utilisant les deux versions du dispositif de spectroscopie RF millifluidique. Dans un premier temps nous avons fait des mesures des liquides « moyennés » et des liquides individuels sur un nombre réduit d'échantillons. Les résultats obtenus ont relevé de possibles pistes pour le sexage des

œufs tels que le jaune en J-12. Ceci sous l'hypothèse d'une éventuelle différence de croissance entre les embryons mâles et femelles et par conséquent une différence de vitesse de consommation des nutriments de l'embryon depuis le jaune. Les résultats obtenus pour le liquide extra-embryonnaire nous ont permis aussi de considérer ce liquide comme un possible source de sexage. L'hypothèse émise était que l'ensemble des liquides de l'œuf y compris les membranes pourraient présenter une différence selon le sexe de l'embryon. Cependant la forte dispersion intrinsèque des liquides des œufs, sur un nombre important d'œufs mesurés, ne permet pas encore de confirmer ces hypothèses.

En revanche nous avons observé un fort contraste entre les liquides des œufs fécondés et non-fécondés (clairs) pour le jaune et le blanc en J-12. Ce résultat est intéressant car il ouvre une porte sur l'application des techniques RF pour la détection précoce des œufs non-fécondés dans les couvoirs industriels.

Des analyses biochimiques ont été faites, par deux membres de l'entreprise Ovalie Innovation, Juan Martinez et Mylène Da Silva, afin d'analyser différents paramètres liés à la croissance de l'embryon tels que le poids de l'embryon, la taille du réseau sanguin, ainsi que la concentration de lipides et la teneur en eau du jaune et du blanc à différents stades du développement embryonnaire. Les résultats préliminaires de cette étude montrent une tendance dans la vitesse de croissance embryonnaire se présentant plus rapide chez les mâles, notamment dans la taille du réseau sanguin. Cependant, ceci présente aussi une très forte dispersion, entre œufs du même sexe, qui ne permet pas de confirmer cette hypothèse.

Les œufs utilisés dans les campagnes de mesures décrites dans cette thèse, proviennent du même lot (même ferme de ponte), c'est-à-dire, provenant des cannes ayant les mêmes conditions d'élevage. De plus, nous avons incubé les œufs dans des conditions contrôlées, afin de diminuer la dispersion due aux facteurs externes pendant le développement embryonnaire. Nonobstant, nous avons trouvé une forte dispersion dans les résultats obtenus.

Nous avons ainsi rencontré des contraintes fluidiques notamment liées à la viscosité de certains liquides (jaune, blanc, et extra-embryonnaire). Ceci nous a forcé à complexifier les protocoles fluidiques, ainsi que le conditionnement des échantillons avant mesures RF. Cependant, le fait de diluer les échantillons dans l'eau DI pour faciliter la fluidique pourrait aussi diminuer le contraste mâle femelle.

Une piste qui n'a pas été étudiée dans cette phase du projet de thèse, est l'embryon lui-même, puisqu'il ne s'agit pas d'un liquide. L'embryon peut ainsi présenter une différence biochimique selon le sexe, détectable par le biais des techniques de radiofréquences. Ceci constitue donc l'hypothèse de départ de la phase

suivante de ce projet ; analyse RF non-invasive des œufs, décrite dans le chapitre 3 de cette thèse, avec le ciblage de l'embryon par les ondes RF.



**CHAPITRE 3 : ANALYSE RF  
NON-INVASIVE DES ŒUFS  
(IN-OVO)**

# I. INTRODUCTION ET MOTIVATION

Pour être efficaces les techniques de sexage in-ovo doivent avoir un caractère non invasif. Jusqu'à présent une telle solution n'existe pas. Les techniques existantes pour le sexage des œufs présentés dans le chapitre I de cette thèse impliquent l'ouverture de l'œuf (Galli et al. 2016c) ou bien le prélèvement du liquide de l'œuf (Weissmann et al. 2013). Nous avons en conséquence proposé la spectroscopie RF comme technique non invasive de sexage des œufs.

De ce fait nous avons dédié une partie importante de notre travail de thèse à la conception d'un système d'illumination RF nous permettant de sonder l'œuf par des ondes électromagnétiques. Ce système est constitué de 2 capteurs conçus spécialement pour envoyer des ondes RF dans l'œuf et de mesurer les ondes réfléchies et transmises par et à travers l'œuf.

Des méthodes de conception et caractérisation des capteurs ont été mises en place en combinant simulations électrique, électromagnétique ainsi que la fabrication et caractérisation en laboratoire, nous permettant de valider le processus de conception. De même des méthodes expérimentales ont été mises en place pour évaluer la sensibilité des capteurs face à la mesure d'un œuf. Par ailleurs, nous avons aussi validé cette méthode avec des simulations électromagnétiques. Dans ce chapitre, nous décrivons les différentes versions des capteurs issues des itérations, conception, simulation, fabrication et caractérisation expérimentale.

Ensuite nous avons réalisé différentes campagnes de mesures non invasives des œufs, nous permettant d'identifier des pistes de discrimination du genre de l'œuf, ainsi que d'identifier les principales contraintes du banc de spectroscopie RF des œufs. Dans un premier temps, nous avons ciblé l'embryon comme source de différenciation sexuelle de l'œuf d'après les résultats obtenues dans la phase d'analyse des liquides des œufs. Les méthodes implémentés pour la mesure de l'embryon dans l'œuf sont aussi décrites.

## II. CONCEPTION DES CAPTEURS RF

Un système d'illumination RF nous permettra d'envoyer des ondes électromagnétiques dans l'œuf et de mesurer les ondes réfléchies et transmises par et à travers l'œuf. Pour cela nous avons conçu des capteurs RF à partir d'une solution déjà existante, utilisée dans des tests de sexage des œufs précédents à ce travail thèse. Nous avons utilisé cette première conception pour comprendre leur fonctionnement et nous l'avons optimisée. Ce premier travail nous a permis de mettre en place des méthodes de conception basées sur la simulation électromagnétique et la simulation électrique du circuit équivalent du capteur ainsi que de méthodes de caractérisation expérimental.

Les différentes versions des capteurs conçus et les méthodes de conception et caractérisation des capteurs sont décrites ci-après.

### II.1. CONCEPTION DU CAPTEUR C1

#### II.1.1. Géométrie du capteur

Le capteur RF, utilisé pour la mesure des œufs, est constitué d'un circuit imprimé sur un substrat (PCB), en utilisant la technologie de guides d'onde coplanaires adaptés à la géométrie de l'œuf (cf. Figure 62). Il est composé d'un disque conducteur de rayon  $R_c$  entouré par le plan de masse (de rayon  $R_m$ ) avec séparation (gap) entre le conducteur et le plan de masse de valeur  $gap = R_m - R_c$ . Une ligne coplanaire de longueur  $l$  et d'impédance caractéristique  $Z_c = 50$  ohms, permet de propager l'onde électromagnétique jusqu'à la partie sensible au sein de laquelle l'énergie électromagnétique se concentre. Le schéma du capteur ainsi que ses dimensions sont montrés dans la Figure 62.

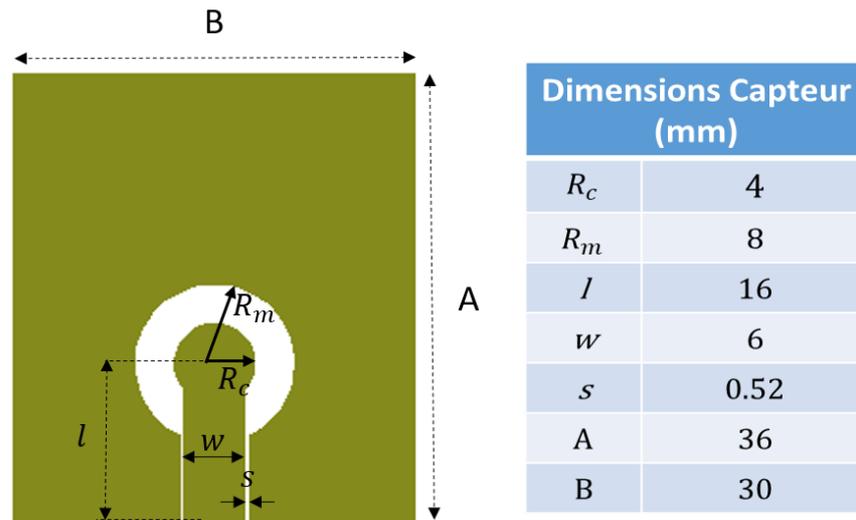


Figure 62 Schéma et dimensions du capteur C1

Le substrat utilisé est du FR4 ayant une permittivité relative de 4.2 et une tangente de pertes de 0.018. Pour cette version du capteur on a utilisé une épaisseur de substrat de 0.8 (mm).

### II.1.2. Simulations sur HFSS

Le capteur a été simulé sur le logiciel de simulations électromagnétiques haute fréquence HFSS. Ceci nous a permis de connaître la distribution du champ électromagnétique dans le capteur. Pour la simulation le capteur est à l'intérieur d'une boîte remplie d'air et l'excitation électromagnétique est placée au bout de la ligne coplanaire d'accès (Figure 63.a) où on placera, après fabrication, le connecteur SMA pour alimenter le capteur avec le signal électromagnétique.

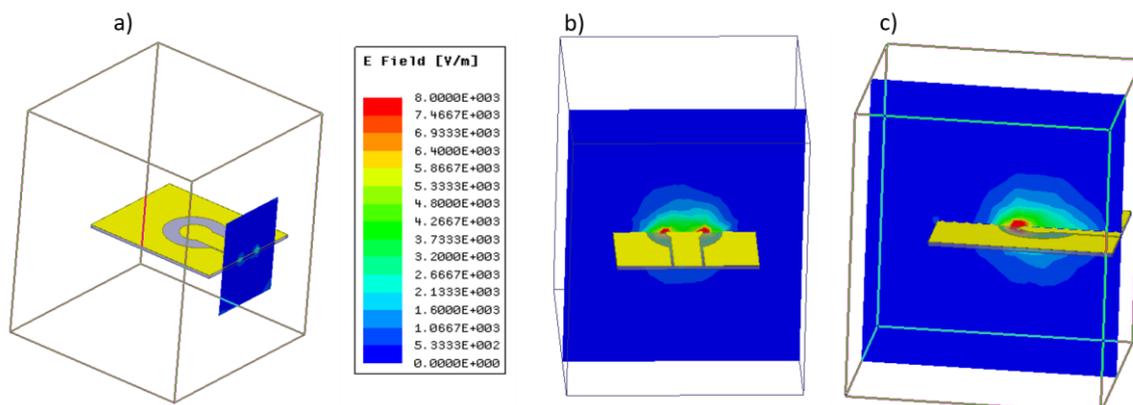


Figure 63 Simulation du capteur C1 sur HFSS à 3GHz

On a placé un plan transversal au centre du capteur (Figure 63.b) et un autre plan tout au long du capteur (Figure 63.c). Ces plans nous permettent de visualiser le champ rayonné en proximité du capteur. Nous observons qu'effectivement le champ électromagnétique est concentré dans le gap entre le disque conducteur et la masse dans la zone centrale du capteur. Cependant, nous observons aussi du champ électromagnétique au long de la ligne d'accès.

Nous avons également simulé sur HFSS la courbe du coefficient de réflexion ( $S_{11}$ ) du capteur en fonction de la fréquence entre 0.1 et 6 GHz (cf. Figure 64). Nous observons un pic dénotant une éventuelle résonance autour de 4.4 GHz. La fréquence du pic dépend de la géométrie du capteur en rapport avec la longueur d'onde. Cela dénote un fonctionnement résonnant du capteur se mettant en place à partir de 3.5 GHz correspondant au critère  $S_{11} = -3\text{dB}$ .

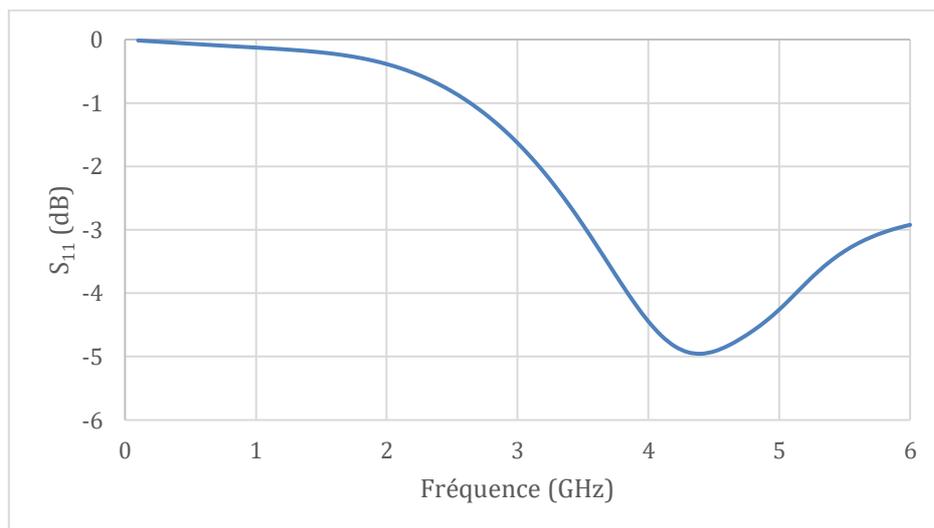


Figure 64 Module du coefficient de réflexion  $|S_{11}|$  du capteur C1

La longueur de l'onde propagée par le capteur est donnée par sa vitesse de propagation  $v$  dépendante de la permittivité effective  $\epsilon_{eff}$  du capteur selon l'équation suivante :

$$\lambda = \frac{v}{f} = \frac{c}{f\sqrt{\epsilon_{eff}}}$$

La permittivité effective  $\epsilon_{eff}$  a été calculée en considérant que la moitié de l'énergie est rayonnée vers la face avant du capteur ayant l'air comme milieu de propagation. L'autre moitié de l'énergie est rayonnée vers la face arrière du capteur dont le signal est propagé dans le substrat et dans l'air. La permittivité effective du capteur est alors calculée comme suit :

$$\varepsilon_{eff} = 0.5\varepsilon_{air} + 0.5\left(\frac{\varepsilon_{substrat} + \varepsilon_{air}}{2}\right)$$

Nous savons que la permittivité de l'air et du substrat ont une valeur de  $\varepsilon_{air} = 1$  et  $\varepsilon_{substrat} = 4.2$ . Ceci nous donne une permittivité effective de  $\varepsilon_{eff} = 1.8$  cohérente avec la permittivité calculé par HFSS ( $\varepsilon_{eff} = 1.89$ ).

La fréquence de résonance, comme précédemment dit, dépend des dimensions du capteur en rapport avec la longueur d'onde à cette fréquence. Plus précisément, nous nous attendons à ce que les diamètres du capteur  $2R_m$  et  $2R_c$  correspondent respectivement à  $\lambda/4$  et  $\lambda/8$  (Angelopoulos et al. 2006). Pour une fréquence de 3.5 GHz (-3 dB), nous trouvons que les rapports entre les diamètres du cercle central du capteur et la longueur d'onde sont de  $\frac{2R_m}{\lambda} = 0.25$  et  $\frac{2R_c}{\lambda} = 0.125$ .

En tenant compte de ce paramètre géométrique du capteur, nous pourrions dans une future version redimensionner le disque central afin de décaler la fréquence de résonance, selon les besoins de leur utilisation.

Pour approfondir la caractérisation des capteurs nous avons travaillé sur le circuit équivalent du capteur nous permettant de l'optimiser comme décrit ci-après.

### II.1.3. Circuit équivalent

Un circuit équivalent du capteur a été fait, dans un premier temps, en considérant le gap entre le disque conducteur et le plan de masse comme un condensateur. En conséquence nous avons représenté le capteur comme une ligne d'impédance caractéristique  $Z_c=50\Omega$  et de longueur  $l$ , finie par un condensateur (cf. Figure 65).

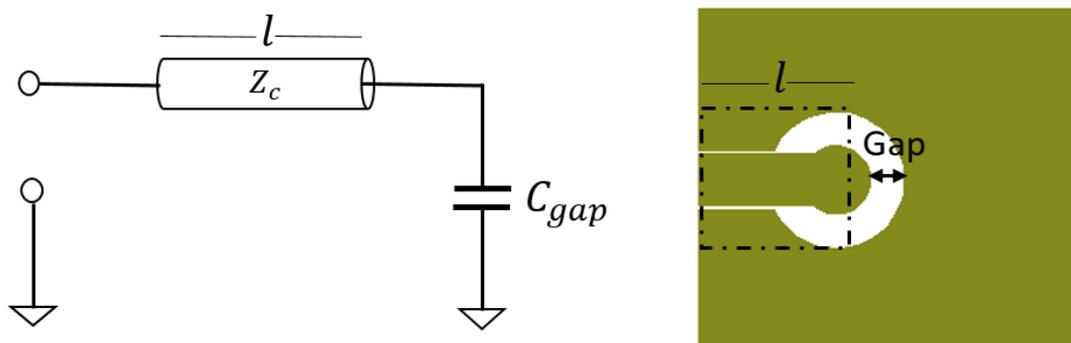


Figure 65 Circuit équivalente simplifié du capteur C1

Cette première approche constitue d'un modèle très simplifié qui d'une part ne représente pas la résonance à 3.5 GHz et d'autre part, considère que toute la ligne d'accès présente une impédance de 50 ohms. Une version plus complexe du circuit équivalent du capteur C1 a été développée sur le logiciel de simulations électronique ADS (cf. Figure 66).

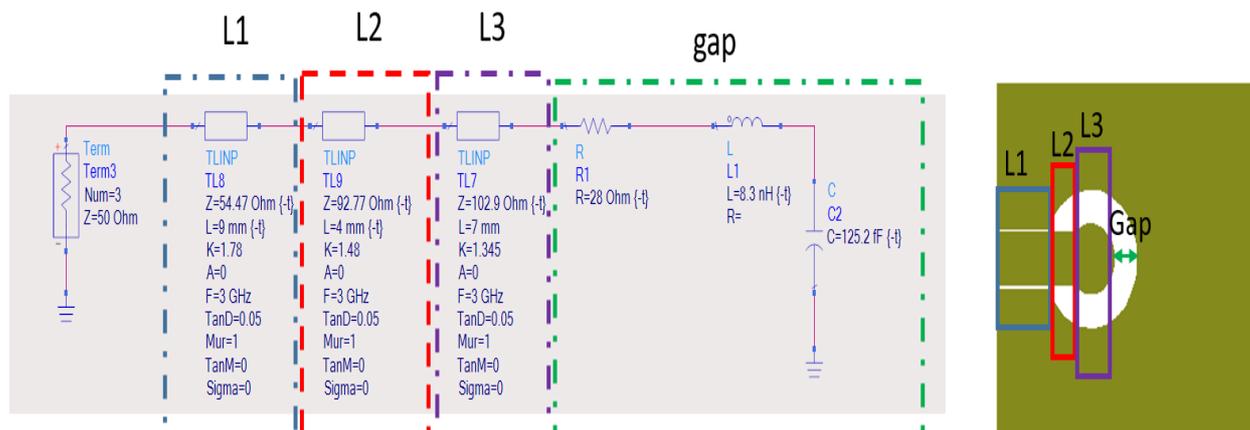


Figure 66 Circuit équivalente du capteur C1 sur ADS

Dans le nouveau circuit équivalent, nous avons divisé la ligne d'accès (guide d'onde coplanaire) en trois lignes avec des impédances différentes (L1, L2, et L3). Ce changement d'impédance est dû aux différentes valeurs de la fente coplanaire entre la partie conductrice et le plan de masse ( $s$ ). Le gap est modélisé par un condensateur et une résistance représentant l'énergie électromagnétique rayonnée aux alentours de 4.4 GHz. En plus nous avons aussi ajouté une inductance afin de mieux représenter l'effet inductif des lignes, notamment de la ligne L2 qui n'est pas pris en compte par l'élément « ligne de transmission » du logiciel ADS.

Nous avons comparé les modules du coefficient de réflexion  $|S_{11}|$  du circuit équivalent, obtenus par simulation électronique sur ADS, et par simulation électromagnétique sur HFSS (voir Figure 67).

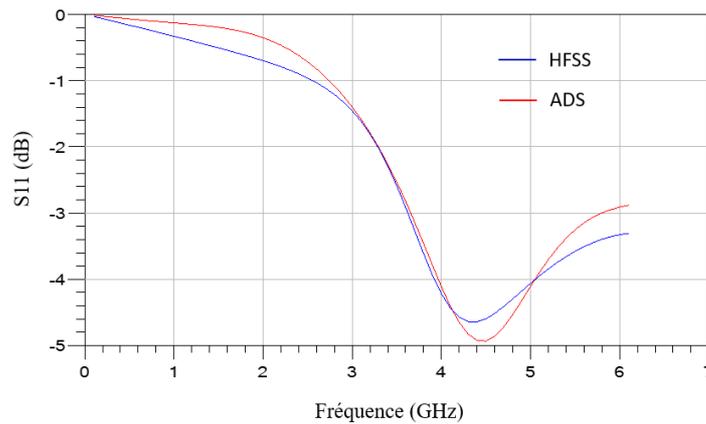


Figure 67 Coefficient de réflexion  $|S_{11}|$  du capteur C1 simulations HFSS vs ADS

Nous avons ajusté les valeurs R, L et C du circuit équivalent afin d'obtenir un bon accord entre les courbes. Avec ce résultat nous validons le circuit équivalent du capteur et il pourra être utilisé pour optimiser le capteur comme décrit ci-après.

#### II.1.4. Capteur C1b

Nous avons optimisé ce capteur à partir d'une modification dans le schéma électrique équivalent. L'hypothèse que nous avons posée est que la tension au niveau du condensateur ( $v_c$ ) est proportionnelle à l'intensité du champ électrique concentré dans le gap du capteur  $|E_{gap}|$ .

Nous avons ajouté une inductance L entre la ligne coplanaire d'accès et le condensateur, afin d'adapter le capteur (à 50 ohms) et d'augmenter alors, la tension ( $v_c$ ) dans le condensateur (cf. Figure 68). La valeur de cette inductance a été fixée à 4.1 nH, afin d'avoir une tension maximale  $v_c$  à 2GHz.

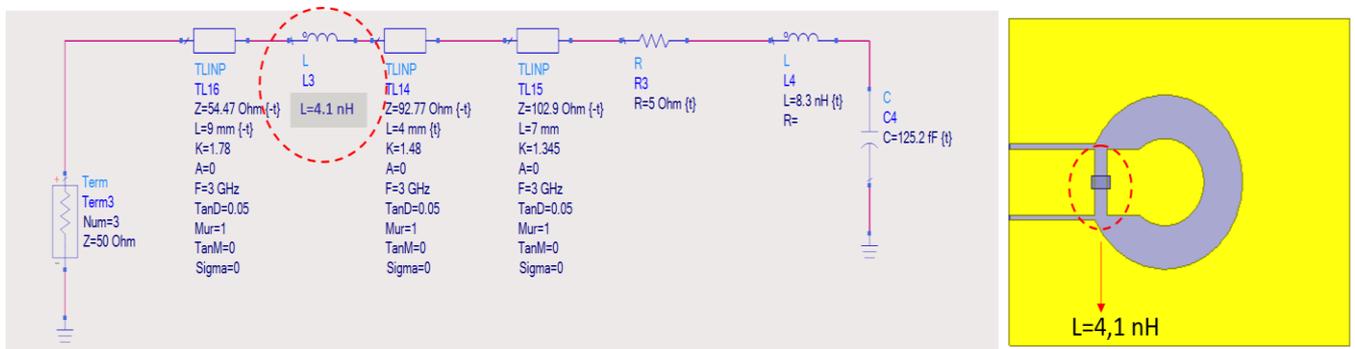


Figure 68 Circuit équivalente du capteur C1b

La Figure 69 montre la tension dans le condensateur en fonction de la fréquence simulée sur le logiciel ADS pour les capteurs C1 (en rouge) et C1b (en bleu). En ajoutant une inductance dans la ligne d'accès du capteur, nous avons augmenté la tension maximale d'un facteur 1.6. La fréquence de la tension maximale a été décalée à 2 GHz. De plus, la largeur de bande a été divisée d'un facteur 2.

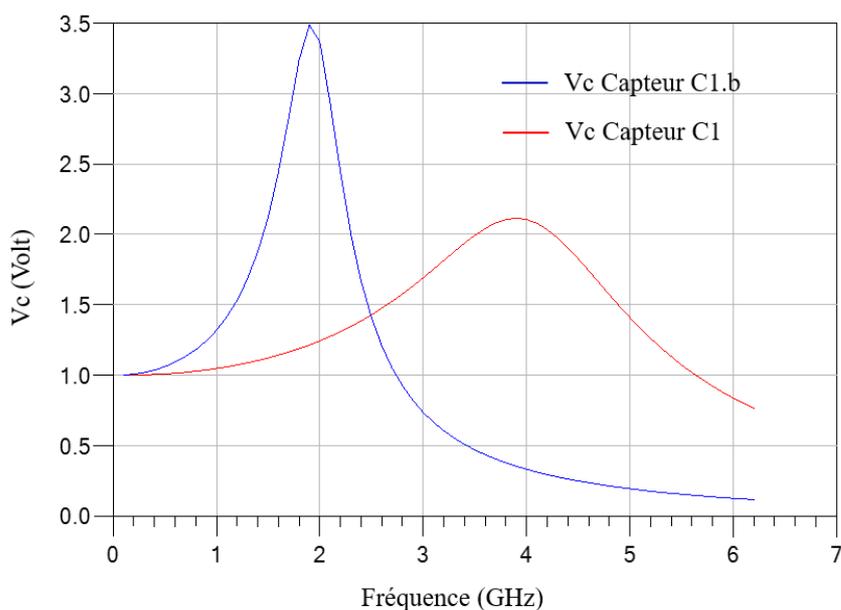


Figure 69 Tension dans le condensateur ( $V_c$ ) pour les capteurs C1 et C1b simulé sur ADS

Afin de vérifier l'hypothèse de proportionnalité entre la tension dans le condensateur et l'intensité du champ électrique  $|E|$ , nous avons utilisé logiciel HFSS afin de calculer  $|E|$  dans la gap du capteur, à une distance de 7 millimètres du capteur. L'intensité du champ ainsi que la tension dans le condensateur pour les capteurs C1 et C1b sont montrés dans la Figure 70.

Nous pouvons observer un bon accord entre la tension dans le condensateur du circuit équivalent et l'intensité du champ  $|E|$  dans le gap des capteurs. Avec ce résultat nous validons alors l'hypothèse posée nous permettant d'optimiser le capteur.

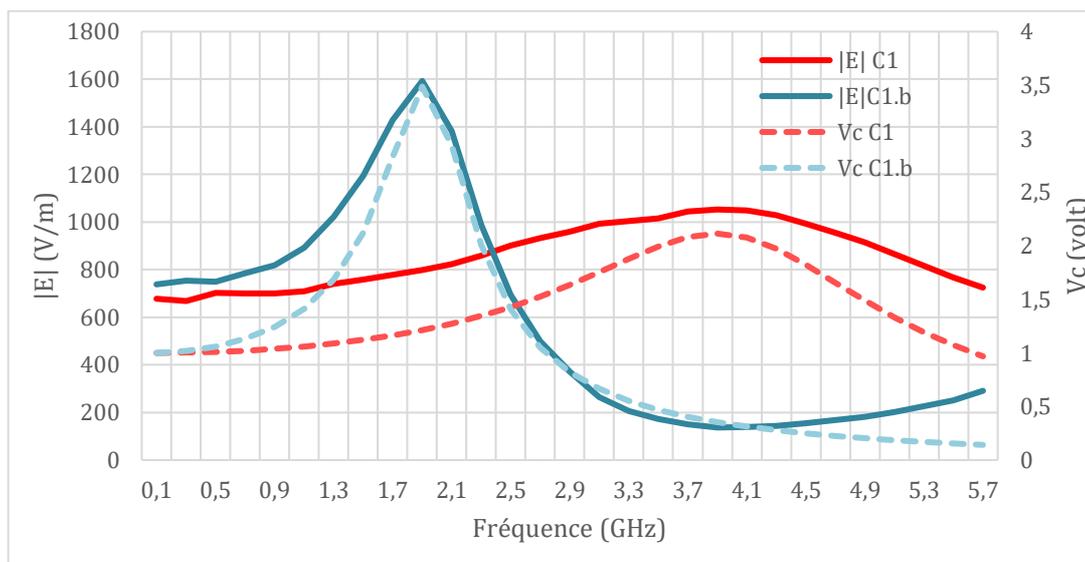


Figure 70 Intensité du champ électrique dans la gap  $|E|$  (trait continu) et tension dans le condensateur  $V_c$  (trait segmenté) des capteurs C1 et C1b

Le capteur C1b a été simulé sur le logiciel HFSS afin d'observer la distribution du champ dans le capteur (cf Figure 71). Nous observons dans le plan longitudinal du capteur (cf Figure 71.c) une forte intensité du champ électrique au niveau de l'inductance, rajoutée entre la ligne d'accès et le disque central, à une fréquence de 2 GHz.

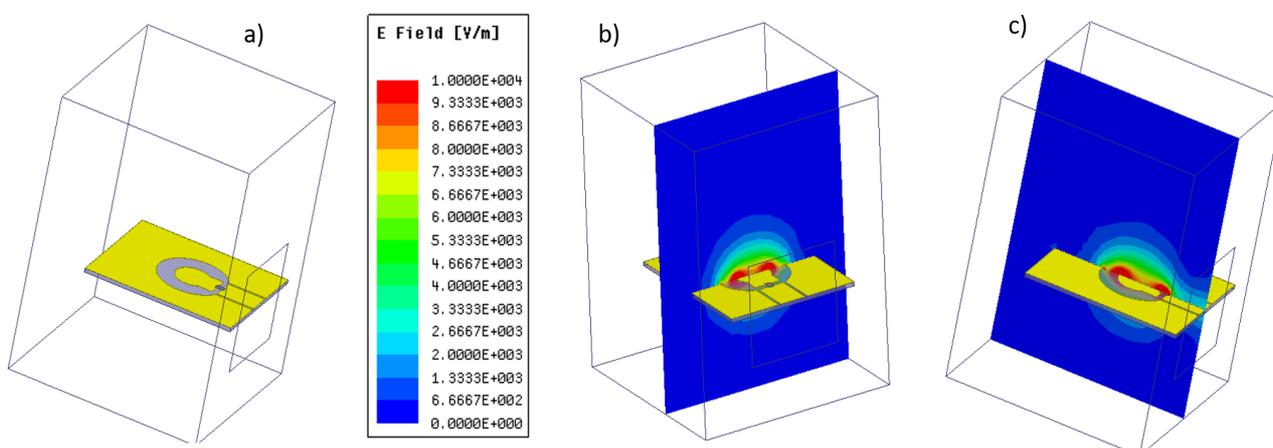


Figure 71 Simulation HFSS de l'intensité du champ  $|E|$  pour le capteur C1.b à 2GHz

Le module du coefficient de réflexion du capteur  $|S_{11}|$  en fonction de la fréquence issue de la simulation électromagnétiques (sur HFSS) et de la simulation électrique (sur ADS) est présenté dans la Figure 72.

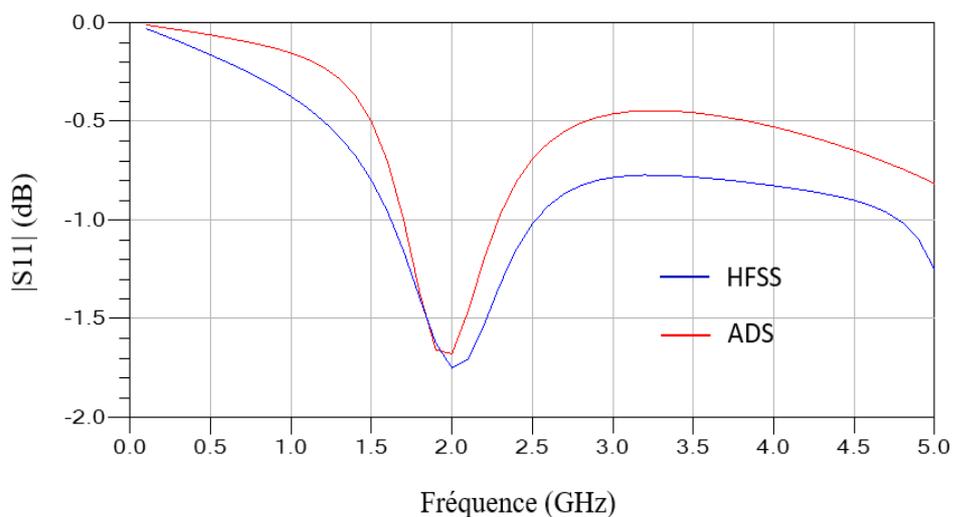


Figure 72 Paramètre  $|S_{11}|$  du capteur C1b en fonction de la fréquence, obtenue par simulation électromagnétique (sur HFSS) et électrique (sur ADS)

Le bon accord entre les courbes valide la correspondance entre les simulations électromagnétiques basées sur la géométrie et les matériaux réels du capteur et les simulations électriques basées sur le circuit équivalent que nous avons proposés pour les capteurs.

Finalement, ces deux capteurs ont été fabriqués et nous avons mesuré le coefficient de réflexion  $S_{11}$  des capteurs en espace libre (dans l'air) avec un analyseur de réseau vectoriel (ARV). Les courbes obtenues (module et phase) ont été comparées à celles issues des simulations électromagnétiques sur HFSS (cf Figure 73 et Figure 74).

Dans les simulations, l'effet du connecteur n'est pas pris en compte, nous avons alors corrigé la phase mesurée de  $-70^\circ$  correspondant au déphasage ajouté par le connecteur. Ceci permettant d'obtenir un bon accord entre la phase du coefficient de réflexion simulé et mesuré.

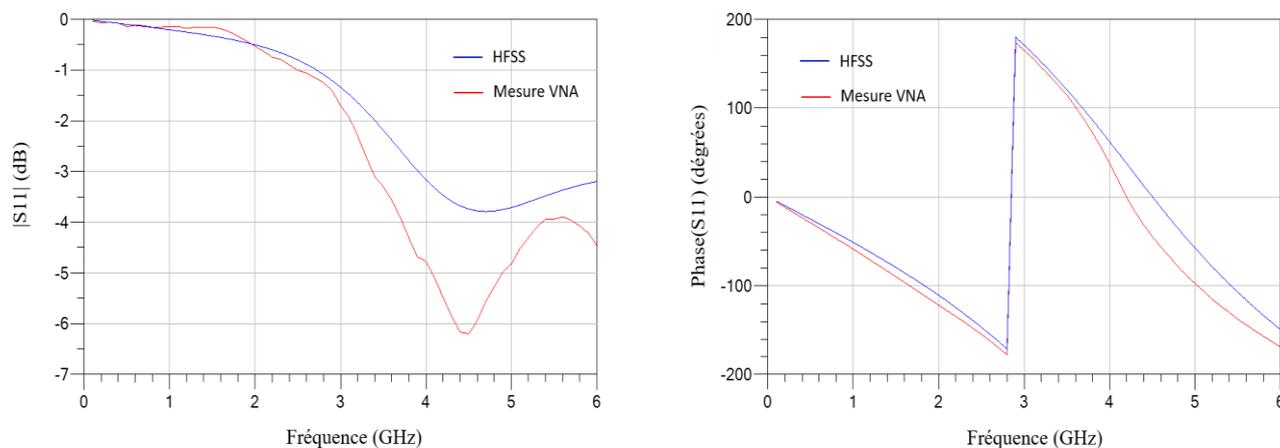


Figure 73  $S_{11}$  module et phase, du capteur C1 mesuré avec un VNA et simulé sur HFSS

Le capteur C1 (Figure 73) présente une différence entre le module du coefficient de réflexion  $|S_{11}|$  mesuré et simulé notamment à partir de 3 GHz. Nous pouvons attribuer cette différence au connecteur qui n'est pas pris en compte dans la simulation, notamment aux soudures du connecteur qui augmentent les pertes en réflexion. De plus, il peut avoir aussi une différence entre la métallisation du capteur fabriqué, et la métallisation du modèle simulé sur HFSS dont le métal est considéré parfait et composé d'un seul matériaux (cuivre). Contrairement à la métallisation du capteur fabriqué qui est non parfaite et composé principalement d'une couche de cuivre ainsi que de deux fines couches d'argent et d'or.

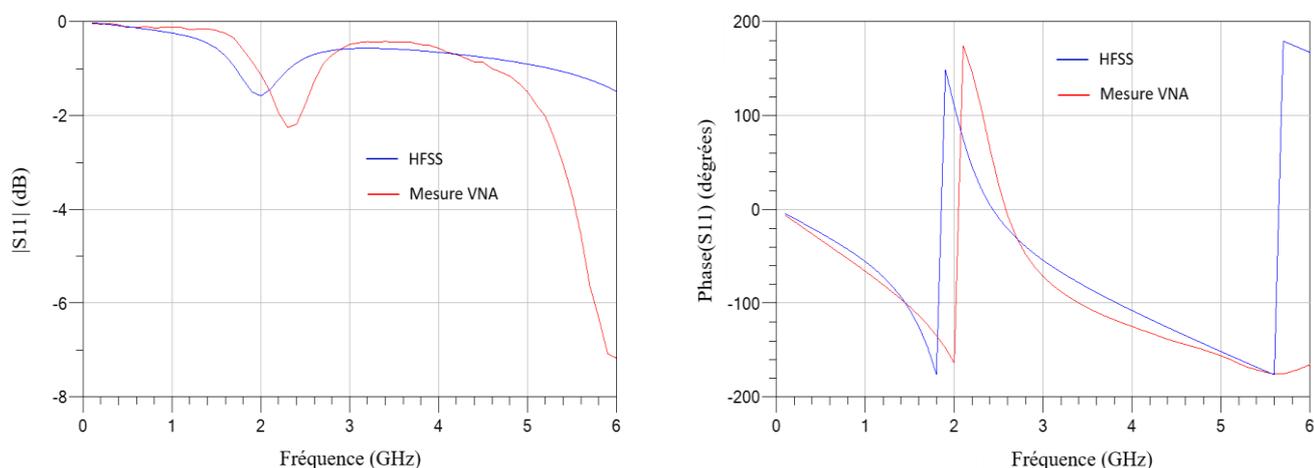


Figure 74  $S_{11}$  en module et phase du capteur C1b mesuré avec un VNA et simulé sur HFSS

Le module du coefficient de réflexion du capteur C1b mesuré est quant à lui décalé en fréquence par rapport au  $S_{11}$  simulé (Figure 74). Ceci est due à une différence dans la valeur de l'inductance simulé (4.1nH) et la valeur d'inductance finalement utilisé dans le capteur mesuré (4.7 nH), valeur disponible dans le catalogue du fournisseur. De plus, nous constatons une différence de la valeur mesurée et simulée

du module de coefficient de réflexion, due aux effets de soudures du connecteur, aux effets de la métallisation du capteur et aux effets de l'inductance soudée dans le capteur.

En conclusion, nous avons conçu deux capteurs en utilisant des simulations électromagnétiques basées sur la géométrie du capteur et les matériaux utilisés, et simulations électriques basées sur un circuit équivalent du capteur. Cette méthode a été finalement validée en fabriquant les capteurs et en les mesurant en laboratoire. Nous avons développé deux versions de capteurs : un capteur (sans inductance série) large bande et un capteur plus bande étroite mais optimisé vis-à-vis de l'intensité du champ rayonné et donc de sa sensibilité de détection.

## II.2. CAPTEUR C2

Nous avons ensuite optimisé ces capteurs C1 et C1b, en passant à une version double face. Ceci nous permet de placer la ligne d'accès sur la face arrière (*bottom*), et laisser seulement le disque (et *gap*) de détection dont le champ électrique est concentré dans la face avant (*top*) au centre du capteur (cf. Figure 75). Les deux couches du capteur (face avant et arrière) sont reliées avec des trous métallisés nommés par son acronyme en anglais VIA (*Vertical Interconnect Access*).

L'utilisation d'un capteur double face nous permet d'une part, cibler le champ électrique, concentré dans le *gap*, sur la face avant du capteur laquelle sera en contact avec l'œuf. D'autre part, nous permet un meilleur assemblage du connecteur (face arrière) en utilisant aussi des VIAs pour relier la masse du connecteur au plan de masse du capteur placé sur la face avant. Notons que la ligne d'accès de la version précédente du capteur était une ligne coplanaire dont le plan de masse se trouve de part et d'autre du conducteur (dans le même plan). Dans cette version, due au caractère double face du capteur, la ligne d'accès correspond à une ligne micro ruban dont le plan de masse se trouve de l'autre côté du substrat.

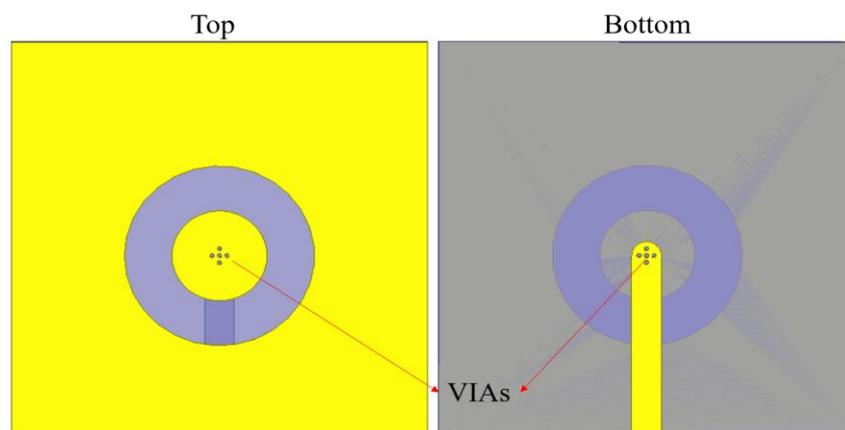


Figure 75 Capteur C2 double face

La Figure 76 montre la distribution du champ électrique du capteur (sans œuf) simulé sur HFSS à 3GHz. Nous pouvons observer que le champ électrique est rayonné vers l'avant et l'arrière du capteur comme pour le capteur précédent. Cependant, nous avons éliminé le rayonnement vers l'avant de la ligne d'accès, ce qui permet de cibler le champ dans le centre du capteur, zone de contact avec l'œuf.

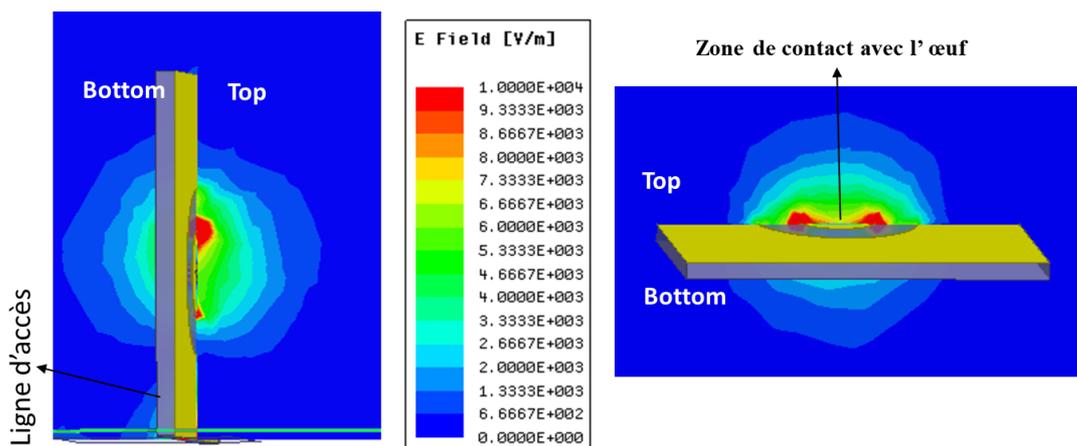


Figure 76 Simulation sur HFSS du Capteur C2

Nous avons aussi conçu la version bande étroite du capteur (C2b) avec une inductance de 4.7 nH localisée en série avec la ligne d'accès du capteur (face arrière). De plus, deux versions de chaque capteur ont été conçues avec différentes tailles du gap : 4mm (capteur à grand gap) et 2 mm (capteur à petit gap). Les dimensions des capteurs conçus sont montrées dans le schéma de la Figure 77. Le substrat utilisé est du FR4 avec une permittivité de 4.2, une tangente de pertes de 0.018 et une épaisseur de 1.6 mm.

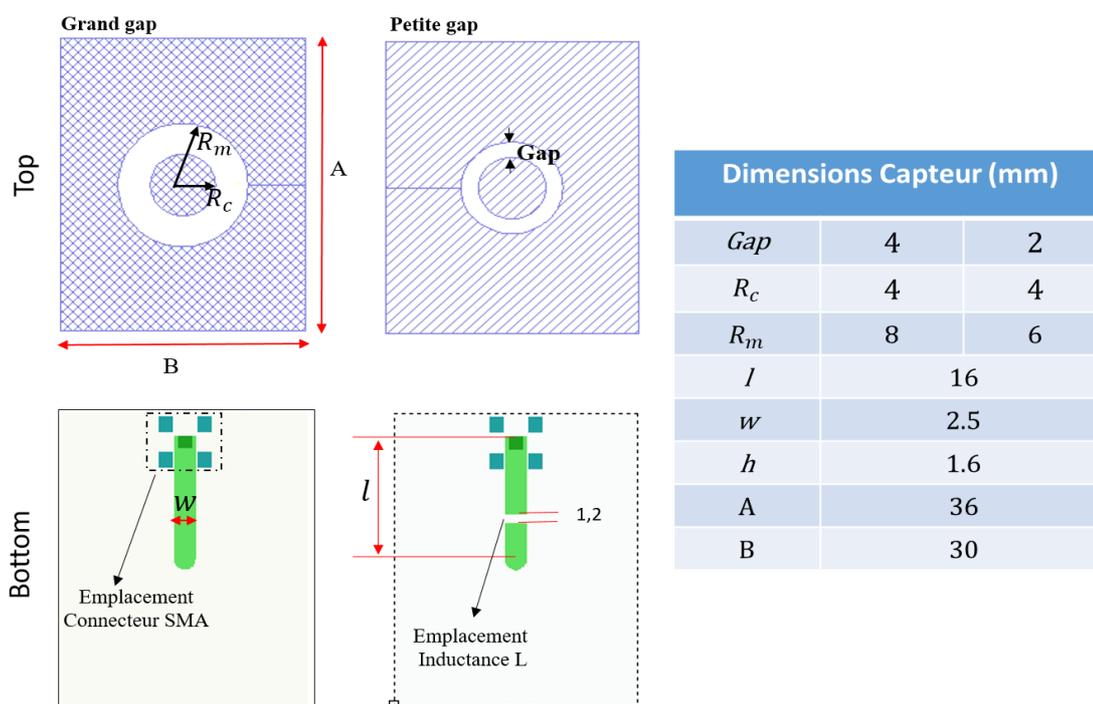


Figure 77 Schéma et dimensions des capteurs C2

En résumé, nous avons conçu 4 capteurs en configuration « double face » différents ; dont deux capteurs à grand gap C2 et C2b (avec inductance localisée), et deux capteurs à petit gap C2.1 et C2.1b (avec inductance localisée). Les modules des coefficients de réflexion  $|S_{11}|$  du capteur C2 (à grand gap) simulés et mesurés sont montrés dans la Figure 78.

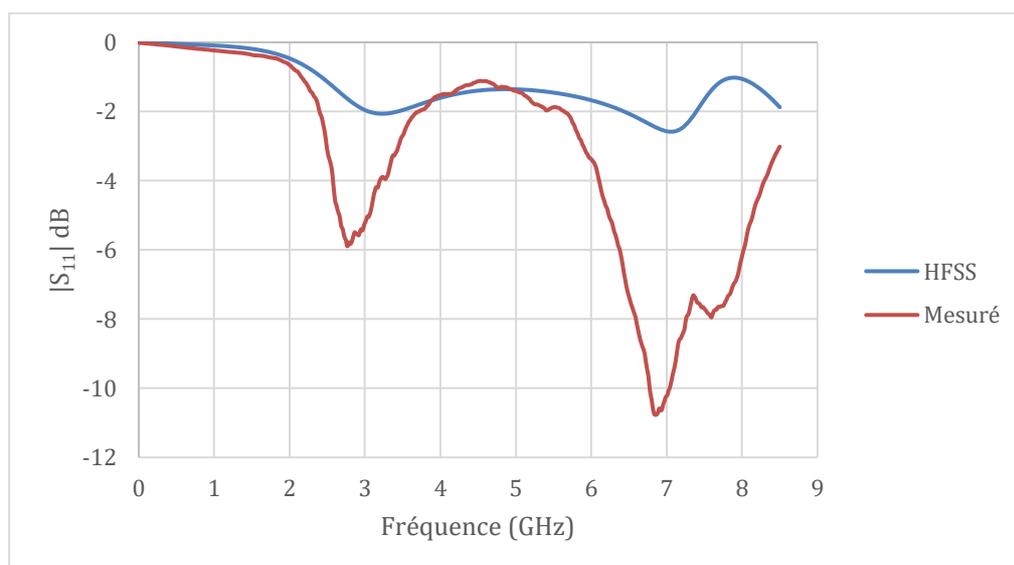


Figure 78 coefficient de réflexion  $|S_{11}|$  du capteur C2 à grand gap

Nous observons, un bon accord entre les courbes simulé et mesuré, malgré une différence d'environ 4dB dans les pics du  $|S_{11}|$  à 2.8GHz et à 6.9GHz. Ceci peut être attribué aux effets des éléments de fabrications des capteurs tels que métallisation, VIAs, ainsi que l'assemblage des capteurs, qui n'ont pas été simulés identiquement sur HFSS.

En comparaison avec la version précédente du capteur (C1), nous observons une augmentation de l'amplitude de la résonance sur le coefficient de réflexion à 2.8GHz ainsi qu'une diminution de la fréquence dans laquelle cette résonance apparaît.

Si nous considérons, approximativement, que la moitié de l'énergie est propagée dans le substrat et l'autre moitié dans l'air, la permittivité effective du capteur est calculé comme suit :

$$\varepsilon_{eff} = \frac{\varepsilon_{air} + \varepsilon_{substrat}}{2} = 3.2$$

Ensuite la longueur d'onde effective pour  $f=2.8$  GHz est calculée à partir de la vitesse de propagation de l'onde et la fréquence comme suit :

$$\lambda_{eff} = \frac{v}{f} = \frac{C}{f\sqrt{\varepsilon_{eff}}} = 60 \text{ (mm)}$$

Le rapport entre le diamètre du cercle central du capteur et la longueur d'onde effective est de  $\frac{2R_m}{\lambda_{eff}} = 0.26$  pour la masse et de  $\frac{2R_m}{\lambda_{eff}} = 0.13$  pour la partie conductrice. Ceci correspond donc environ au quart et au huitième de longueur d'onde. En effet ce résultat indique qu'à la fréquence de 2.8 GHz il se produit un phénomène de résonance dans le capteur et en conséquence un rayonnement du champ électromagnétique. Ceci a été confirmé, comme décrit ci-après, avec la mesure du diagramme de rayonnement du capteur dans une chambre anéchoïque.

Le coefficient de réflexion du capteur C2b mesuré et simulé sur HFSS est montré dans la Figure 79. Nous observons en général un bon raccord entre la courbe simulée et la courbe mesurée avec une différence dans la valeur  $|S_{11}|$  d'environ 1 dB et un décalage fréquentiel de 0.3GHz. Les causes de ces différences ont été déjà évoquées précédemment, et dénotent les limites de la simulation électromagnétique. Cependant cet outil nous a permis de concevoir et d'optimiser nos capteurs.

Le but de ce capteur, bande étroite, est de nous permettre de focaliser le champ électromagnétique, à une fréquence déterminée (associé à la valeur de l'inductance), afin de maximiser un éventuel contraste mâle/femelle.

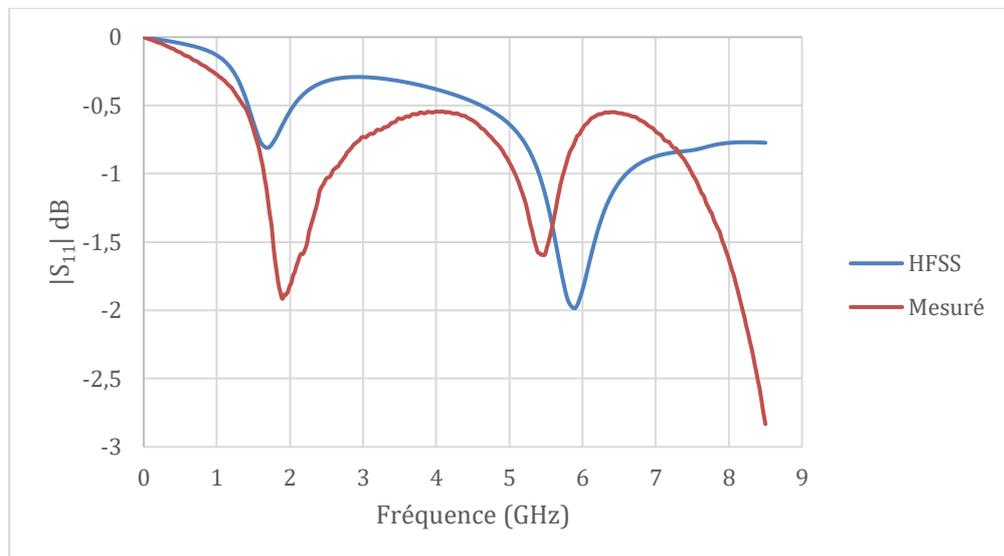


Figure 79 coefficient de réflexion  $|S_{11}|$  du capteur C3b

### II.2.1. Diagramme de rayonnement du capteur

Afin de vérifier le comportement des capteurs aux fréquences dont le coefficient de réflexion présente une résonance, nous avons mesuré les capteurs dans une chambre anéchoïque disponible au LAAS-CNRS, destinée à la caractérisation d'antennes. Il s'agit d'une chambre isolée des ondes électromagnétiques, équipée d'une antenne réceptrice large-bande aux caractéristiques connues, connectée à un analyseur de réseau vectoriel (ARV). Le capteur est placé en face de l'antenne réceptrice à une distance de 2 (m) sur un support permettant de tourner le capteur dans l'axe horizontal et vertical. Les diagrammes de rayonnement mesurés pour le capteur C3 face avant et face arrière sont montrés dans la Figure 80 pour une plage de fréquences de 1 à 4.07 GHz, et à la Figure 81 pour une plage de fréquences de 5.2 à 8.1 GHz, dans l'axe horizontal entre -120 et 120°.

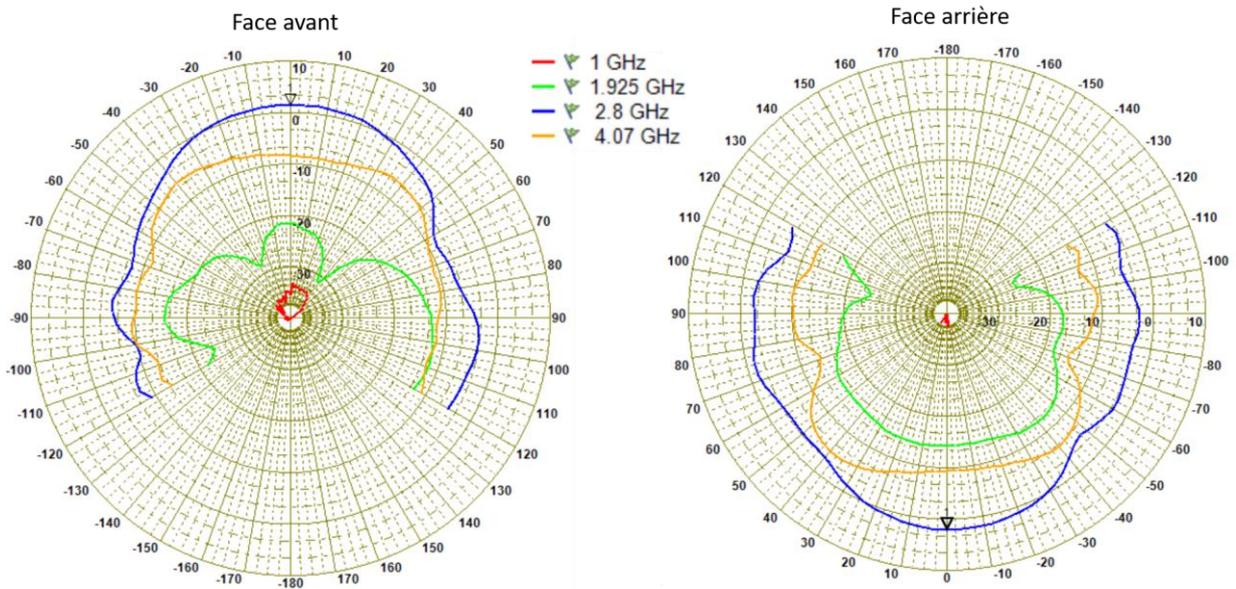


Figure 80 Diagramme de rayonnement du capteur C3 entre 1et 4.1 GHz

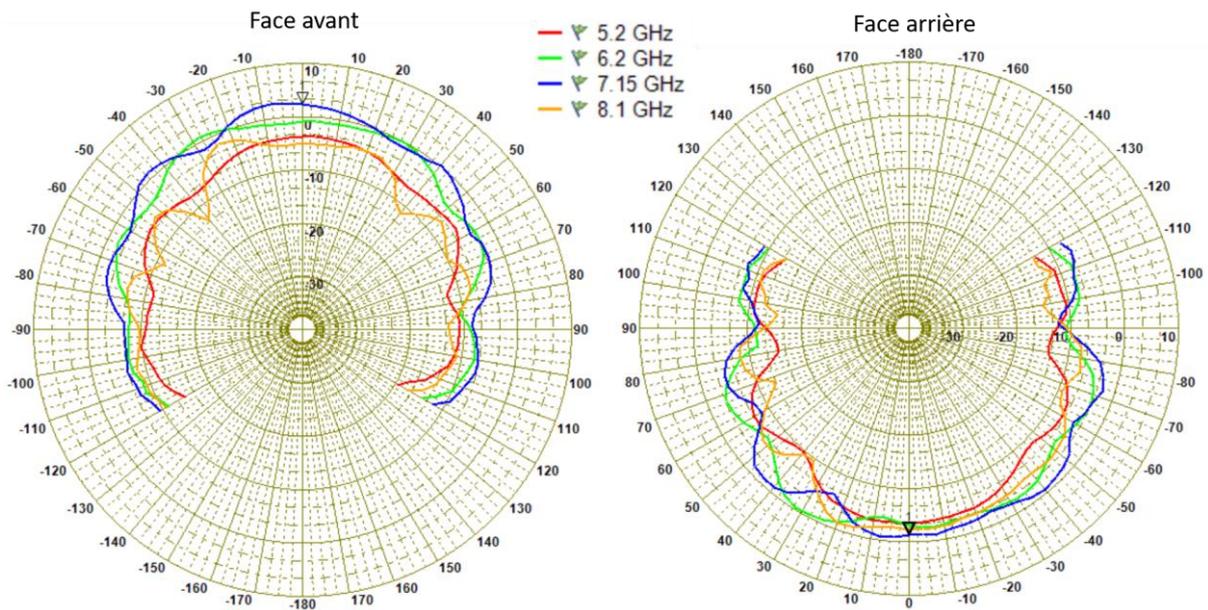


Figure 81 Diagramme de rayonnement du capteur C3 entre 5.2 et 8.1 GHz

Avec ce résultat nous confirmons, d'une part que l'énergie est irradiée face avant et face arrière du capteur. D'autre part nous observons un gain d'antenne (par rapport à l'antenne isotrope) de 1.5 dBi à la fréquence de 2.8 GHz (face avant du capteur) et un gain de 2.5i dB à la fréquence de 7.15 GHz. Les maximums du gain correspondent aux fréquences de résonances vues sur le coefficient de réflexion.

En conclusion, le capteur conçu fonctionne comme une antenne, aux fréquences de 2.8 et 7.15GHz pour lesquelles l'énergie électromagnétique est

rayonnée. Cependant ce rayonnement reste faible (comparé à une antenne conventionnelle) avec le gain inférieur à 2 dBi.

### II.2.2. Capteurs à grand et petit Gap

En diminuant le gap, le champ électrique irradié reste plus proche de la surface du capteur. Ceci nous permettra de cibler dans l'œuf une zone plus proche de la coquille (moins en profondeur), tandis que le capteur à grand gap nous permettra d'avoir plus de profondeur d'analyse dans l'œuf. La Figure 82 montre les coefficients de réflexion mesurés du capteur à grand gap (courbe bleu) et du capteur à petit gap (courbe rouge).

Nous observons une différence d'environ 4 dB pour le pic du coefficient de réflexion à 2.9 GHz. Ceci nous permet de conclure que le capteur à petit gap est moins rayonnant. De plus, nous observons que la fréquence du premier pic pour le capteur à petit gap a augmentée de 0.3 GHz due à la diminution de 2 mm du rayon de la masse ( $R_m$ ) dans le cercle central du capteur.

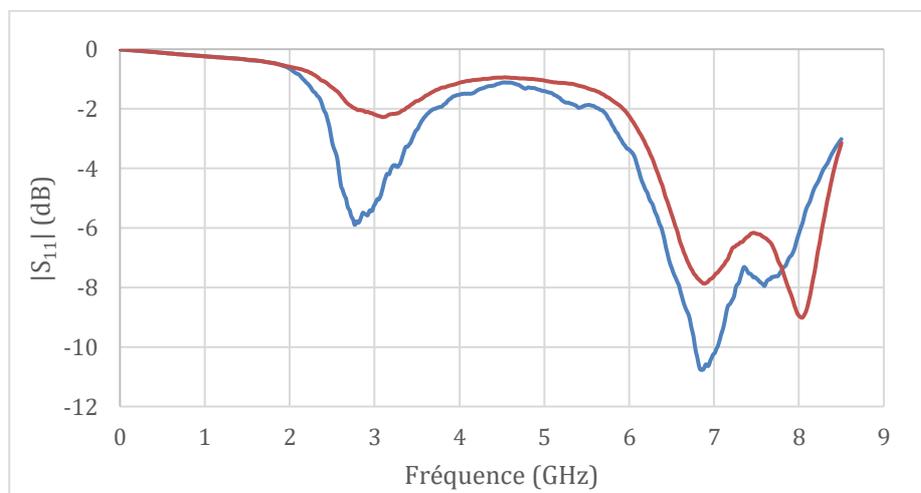


Figure 82 Coefficient de réflexion  $|S_{11}|$  des capteurs C3 grand gap (bleu) et petit gap (rouge)

En plaçant 2 capteurs face à face avec une séparation  $R$  de 6 cm, nous avons mesuré le coefficient de transmission  $|S_{21}|$  avec un ARV comme est montré dans le schéma de la Figure 83.

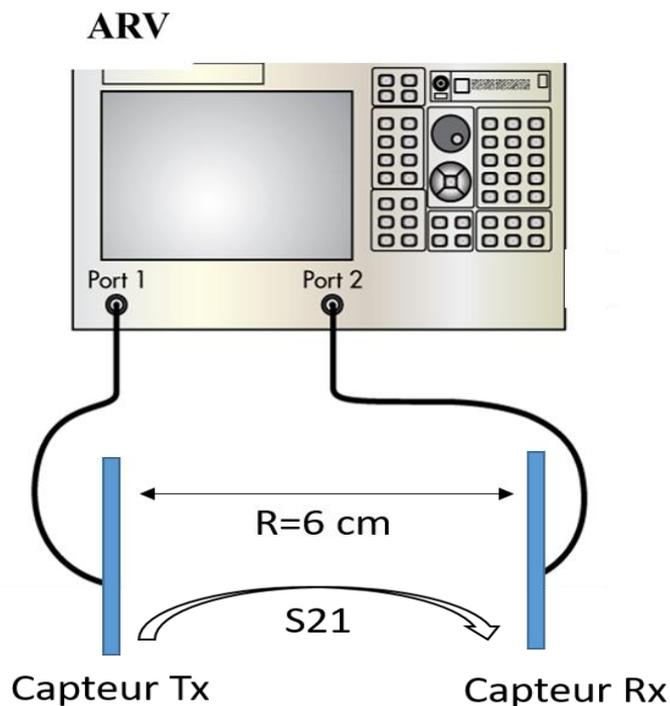


Figure 83 Schéma mesure des capteurs face à face

Les modules des coefficients de transmission  $|S_{21}|$  mesurés pour les capteurs C2 à grand et petit gap, sont montrés dans la Figure 84. Nous observons une différence d'environ 10 dB à 3GHz entre les courbes mesurées pour les capteurs ayant différentes tailles de gap. Ceci confirme que le capteur à petit gap est moins rayonnant, et donc le signal reçu est plus faible. Nous observons aussi un fort bruit aux fréquences inférieures à 1GHz dû aux niveaux faibles du signal très proche du plancher de bruit de l'ARV induisant un couplage extrêmement faible ( $< -80$ dB).

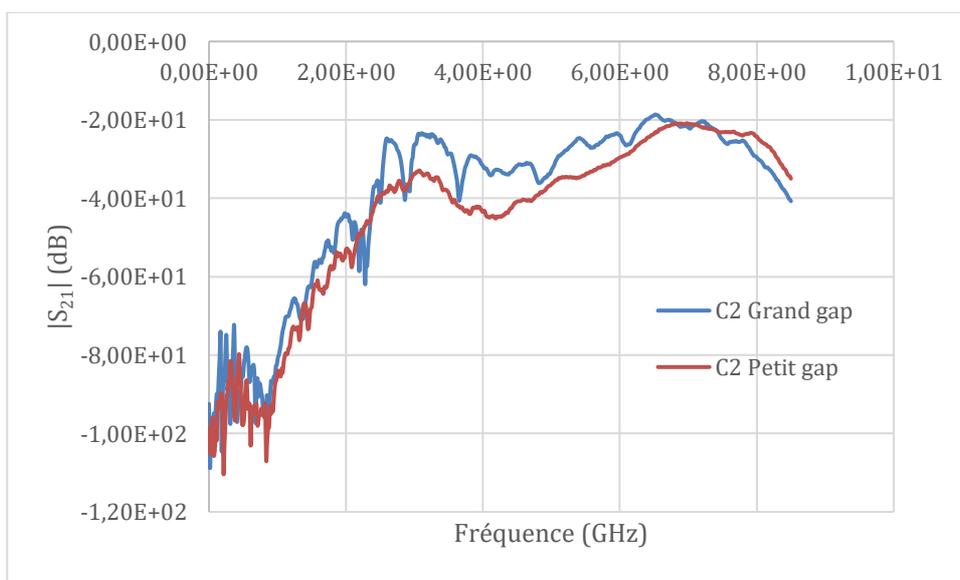


Figure 84 coefficient de transmission  $|S_{21}|$  capteur C3 grand et petit gap

Nous avons également mesuré le coefficient de transmission pour le capteur C2b (avec inductance localisée) avec grand et petit gap (cf. Figure 85). Nous observons aussi une différence d'environ 10 dB à la fréquence de 1.9 GHz.

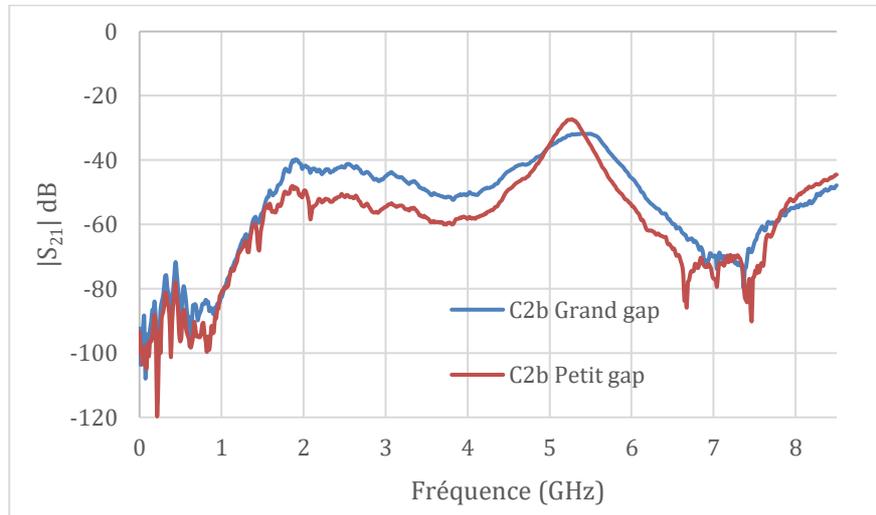


Figure 85 coefficient de transmission  $|S_{21}|$  capteur C2b grand et petit gap

En conclusion nous avons conçu 4 types de capteurs pour l'analyse non invasive des œufs, ayant différentes caractéristiques tels que large bande (C2), bande étroite (C2b), et pour chacun d'eux nous avons conçu une version grand gap et une version petit gap, dont les caractéristiques de rayonnement du champ sont différentes.

Le capteur C2 a été utilisé dans la phase de mesures non invasives des œufs décrite ci-après dans ce chapitre de thèse.

Ensuite nous avons étudié les capteurs afin de connaître leurs performances dans le contexte de la mesure des œufs. Pour ceci, un « setup » de simulation sur HFSS a été mis en place ainsi qu'un « setup » expérimental en laboratoire afin d'évaluer la sensibilité des capteurs pour la mesure d'un œuf. Pour cela nous avons utilisé le banc de spectroscopie non invasive des œufs présenté ci-après.

### III. BANC NON INVASIF DE SPECTROSCOPIE DES ŒUFS

Le banc de spectroscopie RF non invasif des œufs est composé d'abord d'un support mécanique permettant de placer l'œuf en contact avec deux capteurs (cf Figure 86). Il est composé d'un support permettant de placer l'œuf au centre en position verticale entre les deux capteurs placés de chaque côté de l'œuf. Des ressorts métalliques permettent de maintenir par pression les capteurs en contact avec l'œuf. Pour faciliter le contact œuf-capteur un joint torique fabriqué en caoutchouc a été placé dans le cercle central du capteur (zone de concentration du champ électromagnétique dans le capteur).

Les capteurs sont connectés à un ARV de deux ports, dont le capteur placé à gauche de l'œuf est connecté au port 1 et le capteur à droite est connecté au port 2. La méthode d'analyse des œufs consiste à mesurer la réflexion de deux côtés de l'œuf ( $S_{11}$  et  $S_{22}$ ) ainsi que la transmission du port 1 au port 2 ( $S_{21}$ ). Chaque coefficient est composé d'un module et d'une phase, et il est mesuré sur 601 points en fréquence, entre 0.1 et 8.5 GHz.

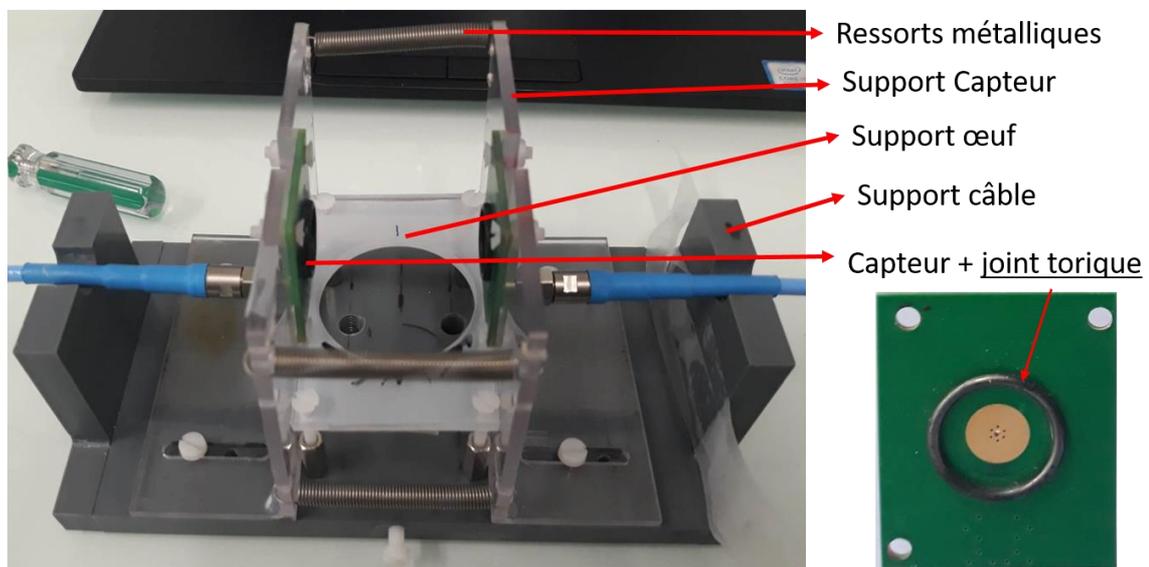


Figure 86 Support mécanique pour la spectroscopie RF des œufs

Le support mécanique décrit ci-dessus a été conçu précédemment à mon travail de thèse et destiné à la mesure d'un œuf en position verticale. Cependant lors de campagnes de mesures des œufs, nous avons utilisé ce support dans une configuration différente permettant de mesurer les œufs en position horizontale comme décrit plus tard dans ce chapitre. Néanmoins nous avons utilisé cette configuration (œuf vertical) pour étudier la sensibilité des capteurs lors de la mesure d'un œuf en mettant en place

un banc expérimental ainsi que de simulations sur HFSS afin de valider la méthode et les résultats obtenus.

### III.1. ETUDE DE SENSIBILITE DES CAPTEURS

Nous avons étudié la sensibilité des capteurs définie comme la capacité de détecter un objet (perturbateur métallique) dans un milieu aqueux (eau DI) contenu dans une coquille d'œuf comme illustré dans le schéma de la Figure 87. Le perturbateur est placé dans l'œuf rempli d'eau à environ 3 mm de distance du capteur 1 suivant l'axe  $x$  ( $x_0$ ) et au centre du système capteurs suivant les axes  $y$  et  $z$  ( $y_0, z_0$ ). La coquille d'œuf utilisé a un diamètre de 4.5 cm et une épaisseur de 0.4 mm.

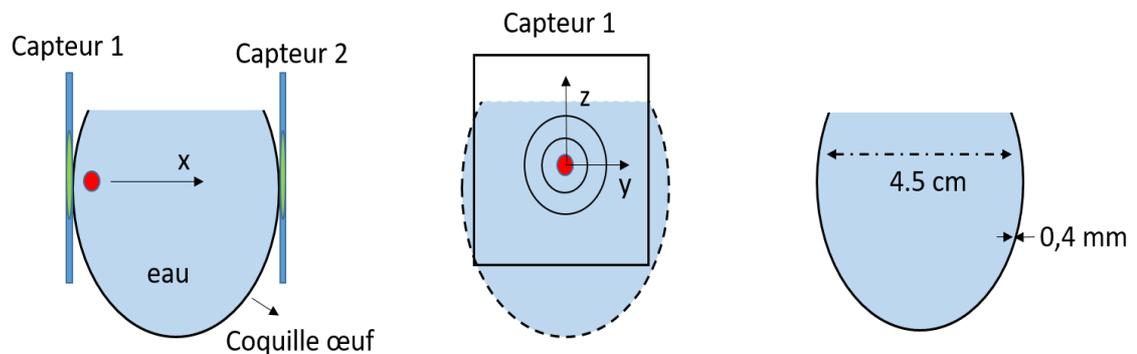


Figure 87 schéma du banc de mesure de la sensibilité des capteurs

Le perturbateur est composé d'un cylindre métallique d'environ 4 mm de diamètre et 4 mm de hauteur, dont sa position est contrôlée avec un bras manipulateur 3 axes ( $x, y, z$ ) comme présenté dans la photo de la Figure 88. Les capteurs 1 et 2, sont connectés respectivement aux ports 1 et 2 du ARV afin de mesurer les paramètres  $S$  de l'ensemble capteur-œuf.

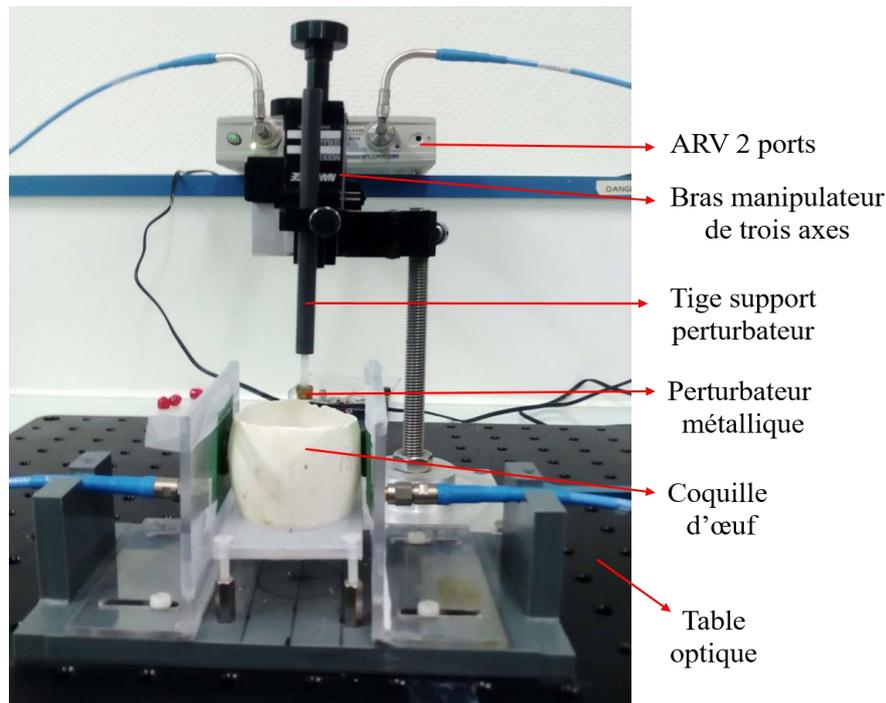


Figure 88 Banc expérimental pour l'étude de sensibilité des capteurs

La sensibilité des capteurs est calculée à partir des variations des paramètres  $S$  entre la mesure avec le perturbateur et la mesure du banc sans le perturbateur. Il s'agit alors d'une analyse différentielle en prenant la coquille remplie avec de l'eau DI comme milieu de référence.

$$\Delta S = S_{avec\ perturbateur} - S_{sans\ perturbateur}$$

Nous avons alors mesuré la sensibilité des capteurs en déplaçant le perturbateur le long des différents axes  $(x,y,z)$  et les résultats obtenus sont présentés dans les paragraphes suivants.

### III.1.1. Perturbateur dans l'axe x

Les variations du coefficient de réflexion ( $\Delta S_{11}$ ) en fonction de la position du perturbateur dans l'axe  $x$  est montré dans la Figure 89 pour le module, et Figure 90 pour la phase à différentes fréquences. Les déplacements du perturbateur dans l'axe  $x$  ont été faits par pas de 3 mm, en commençant à partir du point  $x_0$  placé à environ 3 mm du capteur 1 et centré sur les axes  $y$  et  $z$  ( $y_0, z_0$ ).

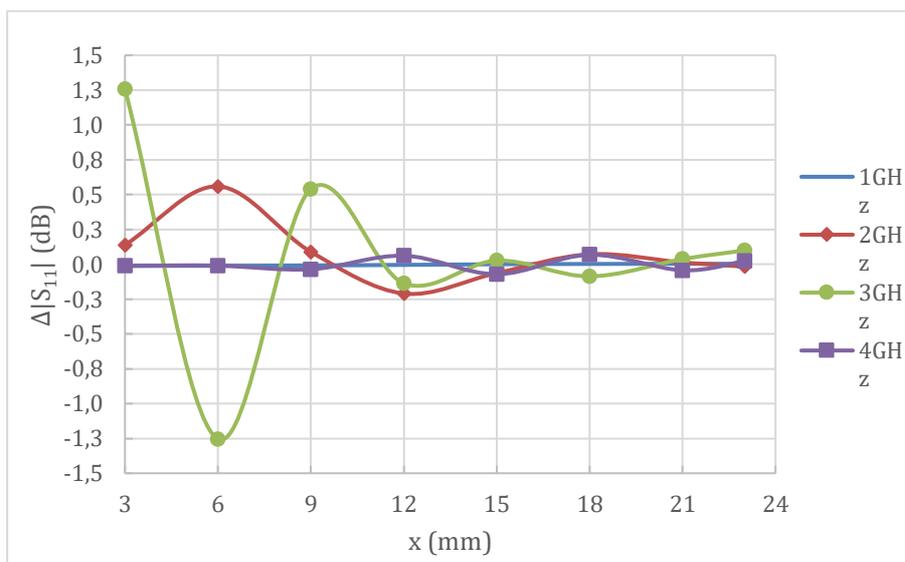


Figure 89 variations du module du coefficient de réflexion  $|\Delta S_{11}|$  en fonction de la position du perturbateur dans l'axe  $x$ .

Nous observons un fort affaiblissement du signal ( $\Delta S_{11} < 0.1$ ) à partir de  $x=15$  mm, nous considèrerons cette valeur comme la **profondeur de détection** du capteur définie comme la distance maximale, suivant l'axe  $x$ , dans laquelle le perturbateur est détecté.

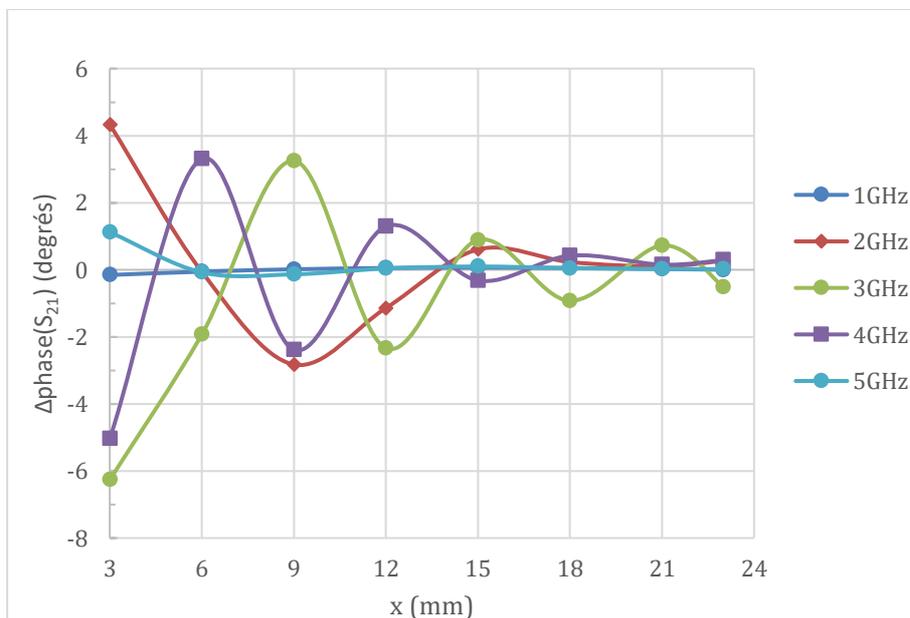


Figure 90 variations de la phase du coefficient de réflexion  $|\Delta S_{11}|$  en fonction de la position du perturbateur dans l'axe  $x$

Nous observons une forte sensibilité à 2 et 3 GHz pour le module et à 2, 3 et 4 GHz pour la phase. Cette sensibilité diminue fortement à partir de  $x=15$  mm (profondeur de détection). Nous observons aussi un effet d'ondes stationnaires qui se produit à l'intérieur de l'œuf qui expliquerait les variations de la valeur mesurée. Pour

les fréquences inférieures à 2 GHz et supérieures à 4 GHz la sensibilité au perturbateur en réflexion est faible.

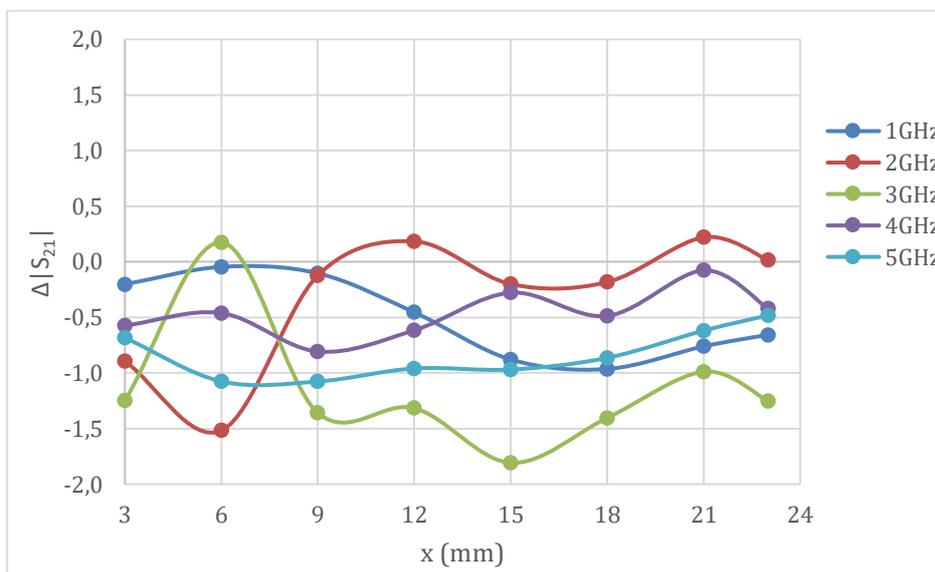


Figure 91 variations du module du coefficient de transmission  $|\Delta S_{21}|$  en fonction de la position du perturbateur dans l'axe  $x$

Concernant les variations en transmission  $\Delta S_{21}$  (cf. Figure 91), nous observons aussi une sensibilité plus marquée aux fréquences de 2 et 3 GHz. Nous remarquons également des variations aux fréquences de 2 et 3 GHz dues à l'effet « ondes stationnaires » précédemment évoqué.

### III.1.2. Perturbateur l'axe $y$

De la même façon nous avons déplacé le perturbateur dans l'axe  $y$ , à partir du centre du capteur ( $y_0, z_0$ ) et à une distance d'environ 3 mm du capteur 1 dans l'axe  $x$  ( $x_0$ ). Les déplacements ont été faits par pas de 2 mm. Les variations du coefficient de réflexion, en fonction de la position du perturbateur dans l'axe  $y$ , sont montrées dans la Figure 92 pour le module et Figure 93 pour la phase à différents fréquences.

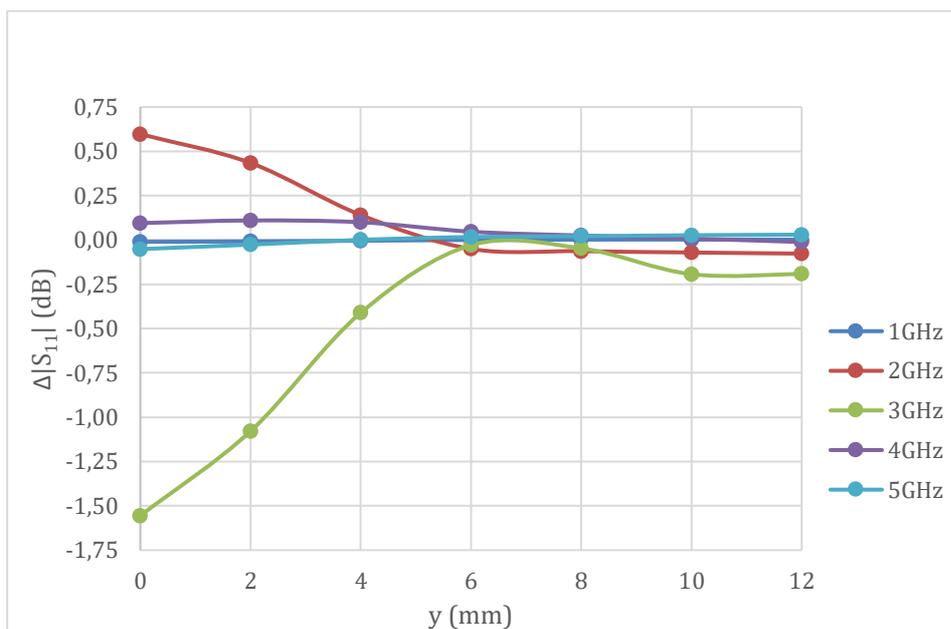


Figure 92 variations du module du coefficient de réflexion  $|\Delta S_{11}|$  en fonction de la position du perturbateur dans l'axe  $y$

Nous observons, comme pour les résultats précédents, une forte sensibilité en réflexion aux fréquences de 2 et 3 GHz. La sensibilité diminue lorsque le perturbateur se déplace dans l'axe  $y$ . Quand le perturbateur est à  $y=6$  mm il se trouve au niveau de la fin du disque métallique central du capteur (zone de concentration du champ électrique dans le capteur). Quand le perturbateur est dehors cette zone ( $y > 6$  mm) la sensibilité du capteur devient très faible. Concernant la phase du coefficient de réflexion le capteur présente une sensibilité plus marquée à 4 GHz pour  $y < 6$  mm (cf. Figure 93).

En considérant que le capteur a été déplacé depuis le centre du capteur vers la droite, suivant l'axe  $y$ , et en considérant la symétrie du capteur, nous obtenons une **fenêtre de détection horizontale** de 12mm (équivalent à  $2 \times 6$  mm). La fenêtre de détection horizontale est définie comme la largeur totale, suivant l'axe  $y$ , dont le perturbateur est détecté.

Ce résultat confirme donc, que l'énergie électromagnétique est concentrée dans le disque central du capteur et par conséquent dans cette zone le capteur présente une sensibilité plus élevée.

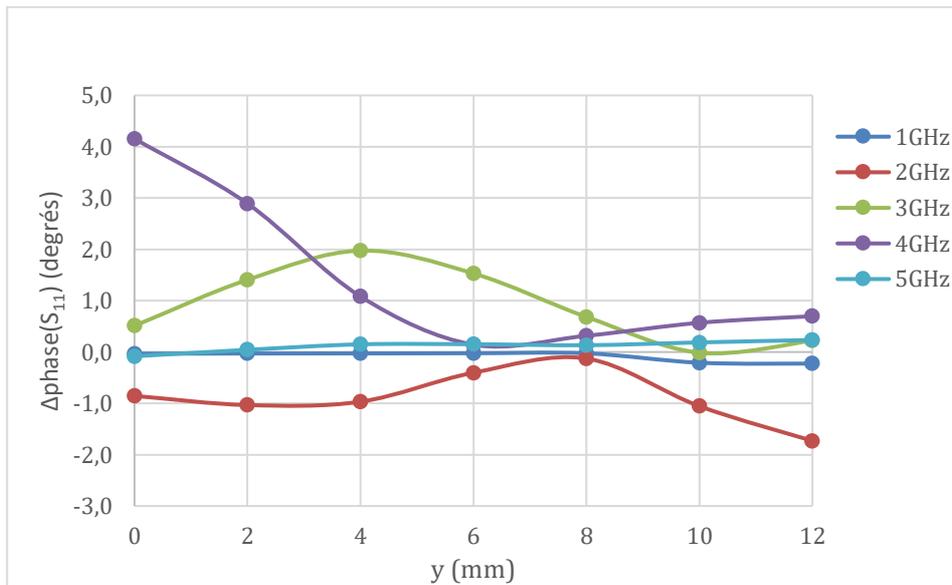


Figure 93 variations de la phase du coefficient de réflexion  $|\Delta S_{11}|$  en fonction de la position du perturbateur dans l'axe y

Concernant la transmission (cf. Figure 94), nous observons une sensibilité en transmission non nulle pour des valeurs de  $y > 6\text{mm}$ , pour lesquelles le perturbateur est hors du disque central du capteur. Nous attribuons ce phénomène au fait que le couplage et donc le champ électromagnétique entre les capteurs occupe la totalité de l'intérieur de l'œuf.

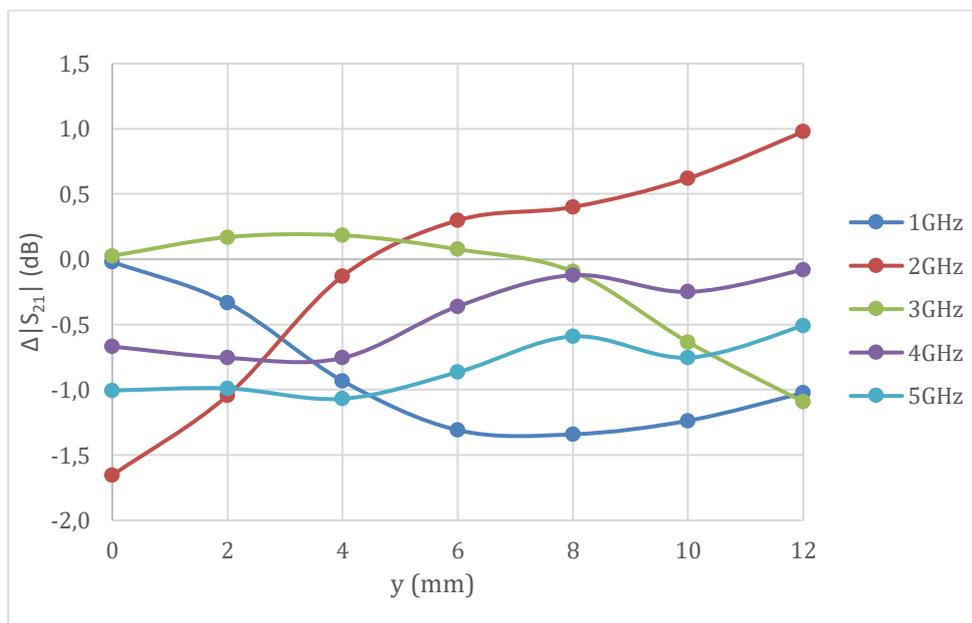


Figure 94 variations du module du coefficient de transmission  $|\Delta S_{21}|$  en fonction de la position du perturbateur dans l'axe y

### III.1.3. Perturbateur dans l'axe Z

Pour évaluer la sensibilité du capteur dans l'axe z, nous avons déplacé le perturbateur depuis le centre du capteur ( $x_0, y_0, z_0$ ) vers le haut par pas de 2 mm. Nous observons des variations en réflexion marquées à 3 GHz (Figure 95). On observe aussi une forte diminution de la sensibilité pour des valeurs de z supérieures à 12 mm. De même que pour les variations suivant l'axe y, nous avons défini la **fenêtre de détection verticale** comme la longueur totale, suivant l'axe z, dont le perturbateur est détecté ( $2 \times 14 \text{ mm} = 28 \text{ mm}$ ).

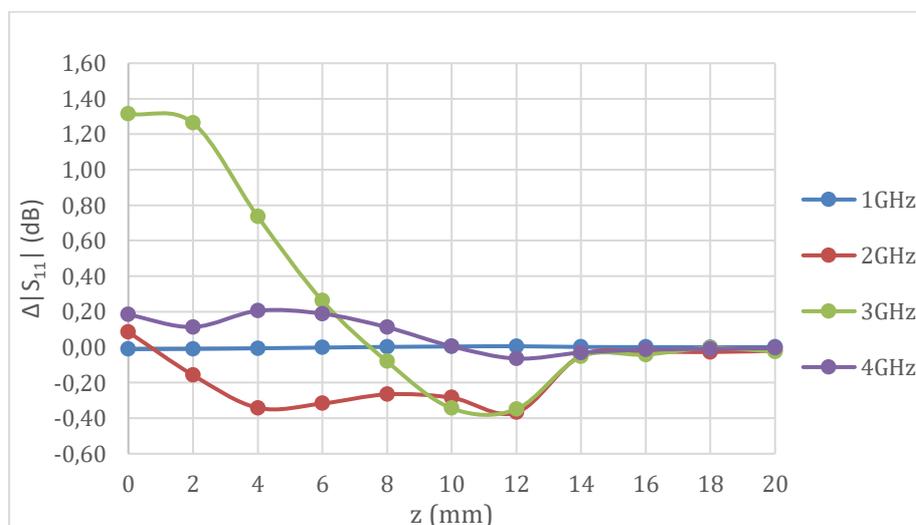


Figure 95 variations du module du coefficient de réflexion  $|\Delta S_{11}|$  en fonction de la position du perturbateur dans l'axe z

Pour la phase nous observons une plus forte sensibilité à 4 GHz pour des valeurs de  $z < 14 \text{ mm}$  (Figure 96).

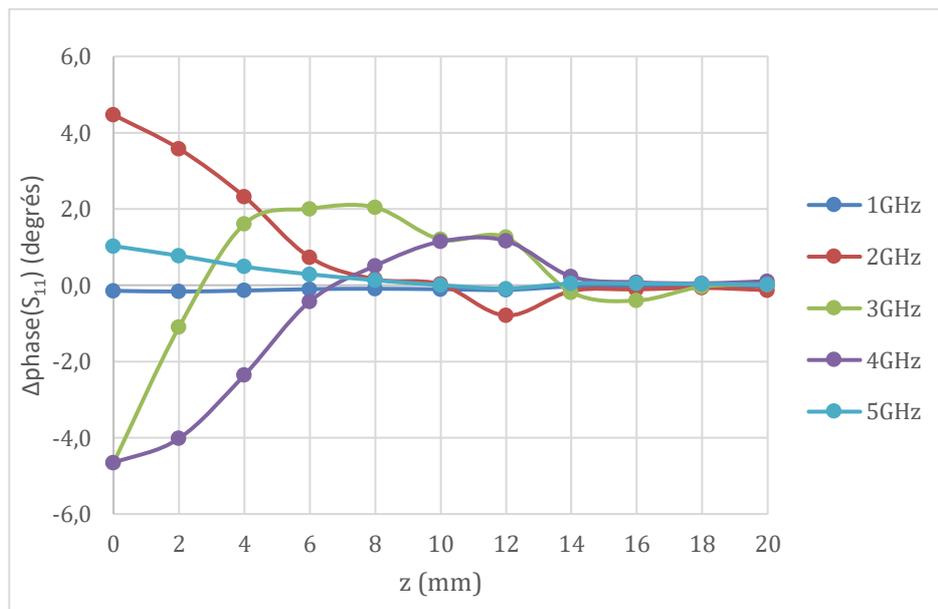


Figure 96 variations de la phase du coefficient de réflexion  $\Delta\text{phase}(S_{11})$  en fonction de la position du perturbateur dans l'axe  $z$

De même que pour les résultats obtenus pour des variations du perturbateur suivant l'axe  $y$ , nous observons une sensibilité en transmission non nulle pour des valeurs de  $z > 14$  (cf. Figure 97). Nous attribuons ce phénomène au fait que le couplage et donc le champ électromagnétique entre les capteurs occupe la totalité de l'intérieur de l'œuf.

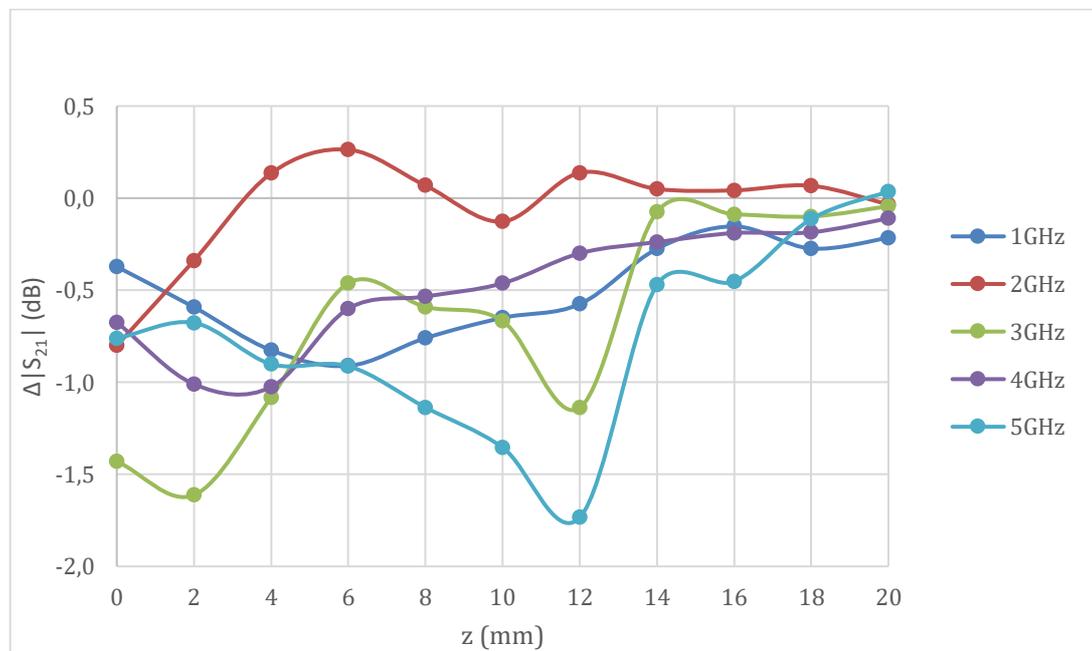


Figure 97 variations du module du coefficient de transmission  $|\Delta S_{21}|$  en fonction de la position du perturbateur dans l'axe  $z$

### III.1.4. Sensibilité des Capteur C2.1 (petit gap) et C2b

Nous avons constaté précédemment que le capteur à petit gap présente un rayonnement moins intense que celui du capteur à grand gap. Ceci implique une réduction de la sensibilité du capteur par un facteur d'environ 2, en comparaison au capteur grand gap. Nous observons de plus que les fréquences pour lesquelles le capteur est plus sensible (en réflexion) sont 3 et 4 GHz (Figure 98) à la différence du capteur à grand gap où les fréquences de forte sensibilité sont 2 et 3 GHz. Cependant la profondeur de détection (suivant l'axe x) reste similaire (15 mm) à celle obtenue pour le capteur C2.

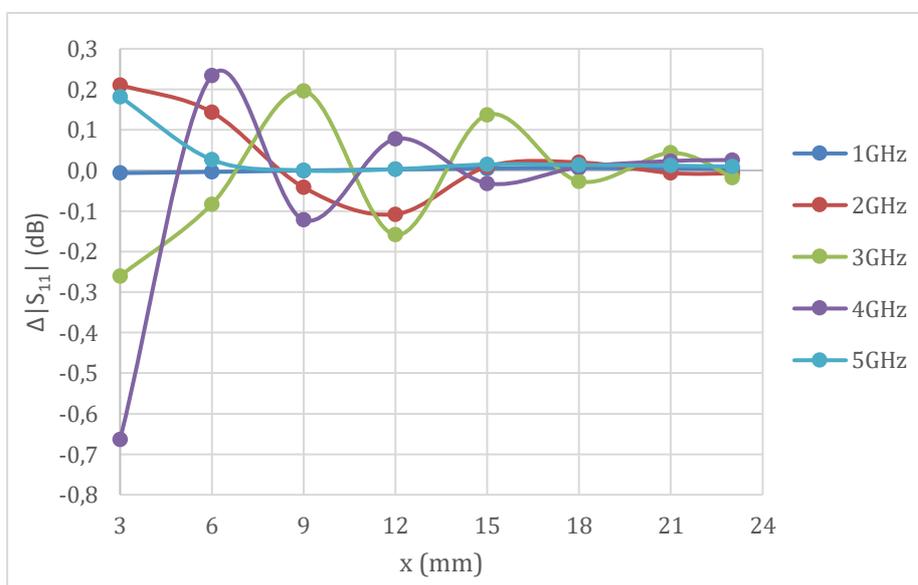


Figure 98 variations du module du coefficient de réflexion  $|\Delta S_{11}|$  du capteur C2.1 en fonction de la position du perturbateur dans l'axe x

Les variations du coefficient de réflexion dans l'axe y sont montrées à la Figure 99. Nous observons une fenêtre de détection horizontale plus faible sachant que  $y=4\text{mm}$  correspond à la fin du disque central du capteur. En considérant que le perturbateur est placé initialement au centre du capteur puis déplacé dans l'axe y vers la droite, nous pouvons donc assumer que la fenêtre de détection horizontale (suivant l'axe y) correspond au double de la valeur obtenue avec cette mesure. Donc pour le capteur à petit gap nous avons une fenêtre de détection horizontale de 8mm, tandis que pour le capteur à grand gap nous avons une fenêtre de détection horizontale de 12 mm.

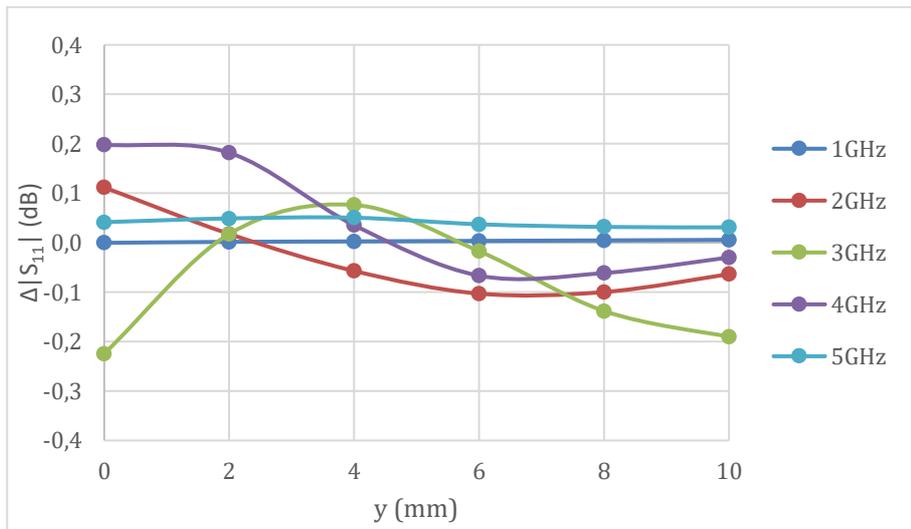


Figure 99 variations du module du coefficient de réflexion  $|\Delta S_{11}|$  du capteur C2.1 en fonction de la position du perturbateur dans l'axe  $y$

Finalement le capteur bande étroite C2b (à grand gap) présente plus de sensibilité à la fréquence de 2 GHz, pour les autres fréquences la sensibilité est très faible. De plus nous observons une augmentation de 6 mm de la profondeur de détection ( $x=21$  mm).

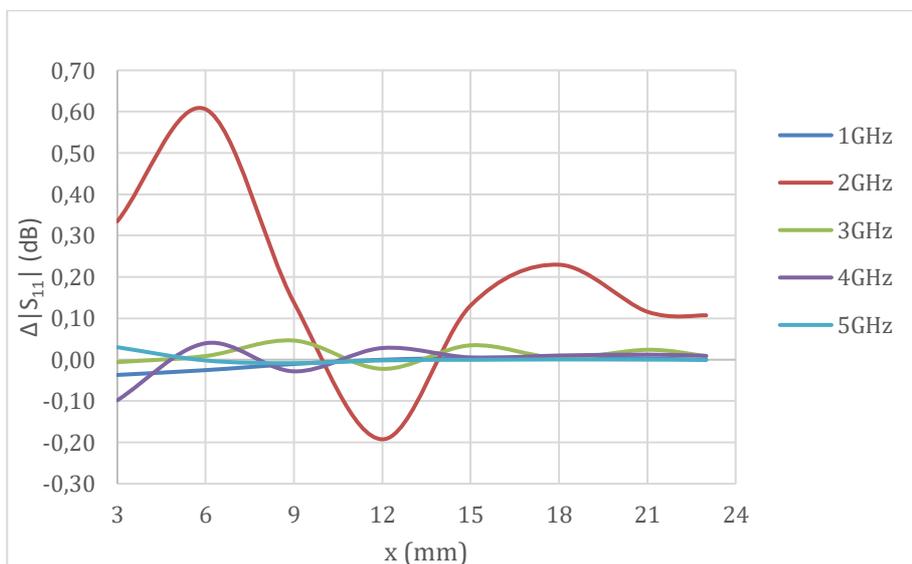


Figure 100 variations du module du coefficient de réflexion  $|\Delta S_{11}|$  du capteur C2b en fonction de la position du perturbateur dans l'axe  $x$

### III.1.5. Conclusions et perspectives

Cette étude nous a permis d'évaluer expérimentalement la sensibilité des différents capteurs. Nous avons défini la sensibilité du capteur comme la capacité de

détecter un élément perturbateur (petit volume et métallique) dans un milieu aqueux (eau DI) à l'intérieur d'une coquille d'œuf. Ceci nous a permis de caractériser les capteurs en fonction de la profondeur de détection suivant l'axe x, et en fonction de la fenêtre de détection suivant les axes horizontal (y) et vertical (z). Les résultats nous ont de plus permis de connaître les fréquences auxquelles le capteur est plus sensible.

Le Tableau 17 résume les différents paramètres de sensibilité en réflexion des capteurs (valeurs approximées).

Capteur	C2	C2.1	C2b
Sensibilité $\text{Max}(\Delta S_{11} )$ dB	1.5 (à 3 GHz)	0.7 (à 4 GHz)	0.6 (à 2 GHz)
Profondeur de détection (x) (mm)	15	15	21
Fenêtre de détection horizontal (y) (mm)	12	8	12
Fenêtre de détection verticale (z) (mm)	28	8	12
Fréquence GHz	2-3	3-4	2

Tableau 17 Résumé sensibilité capteurs aux fréquences 2, 3 et 4 GHz.

Pour cette étude, nous avons choisi un perturbateur métallique afin de maximiser le contraste, en revanche nous avons minimisé sa taille pour simuler une situation de détectabilité difficile.

### III.1.6. Sensibilité des capteurs sur HFSS

Nous avons utilisé le logiciel de simulation électromagnétique, afin de prédire les caractéristiques de détection du capteur, en analysant l'intensité du champ électrique  $|E|$  suivant les axes x,y,z à l'intérieur de l'œuf. Ceci nous permet, d'une part

de valider les mesures précédemment faites et d'autre part, compléter les résultats obtenus.

Pour ce faire, nous avons créé une sphère de 4.5 cm de diamètre remplie d'eau (Figure 101). La sphère d'eau est entourée par une couche de 0.4 mm d'épaisseur pour simuler la coquille. La permittivité diélectrique de la coquille est estimée à une valeur de  $\epsilon_r = 2.7$  avec un tangente de pertes de 0.02 à 10GHz (Hussain 2009). Nous avons tracé trois axes à l'intérieur de l'œuf et nous avons simulé l'intensité du champ électrique  $|E|$  suivant chaque axe à différentes fréquences. La simulation a été faite en utilisant le capteur C2 (grand gap).

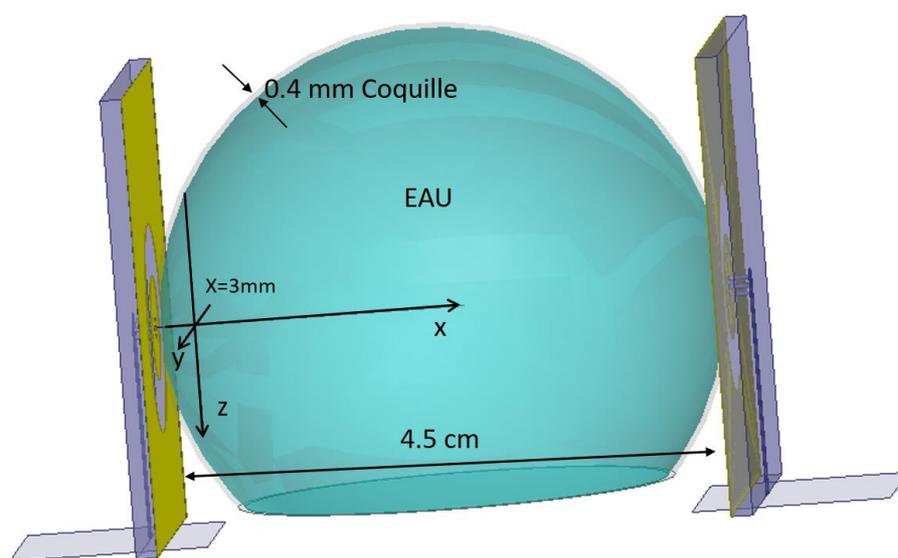


Figure 101 Simulation HFSS – schéma de la structure.

L'intensité du champ électrique simulée le long des axes x,y et z est montrée aux Figure 102, Figure 103 et Figure 104 respectivement. Les axes y et z sont placés à 3 mm du capteur 1. Si nous considérons la valeur de 300 V/m comme une intensité de champ faible (qui correspond à la moitié des champs maximum observés aux Figure 102, Figure 103, et Figure 104 ), nous observons une profondeur des ondes suivant l'axe x entre 12 et 15 mm à 2 GHz. De plus, nous retrouvons une intensité du champ plus importante aux fréquences de 2 et 3 GHz.

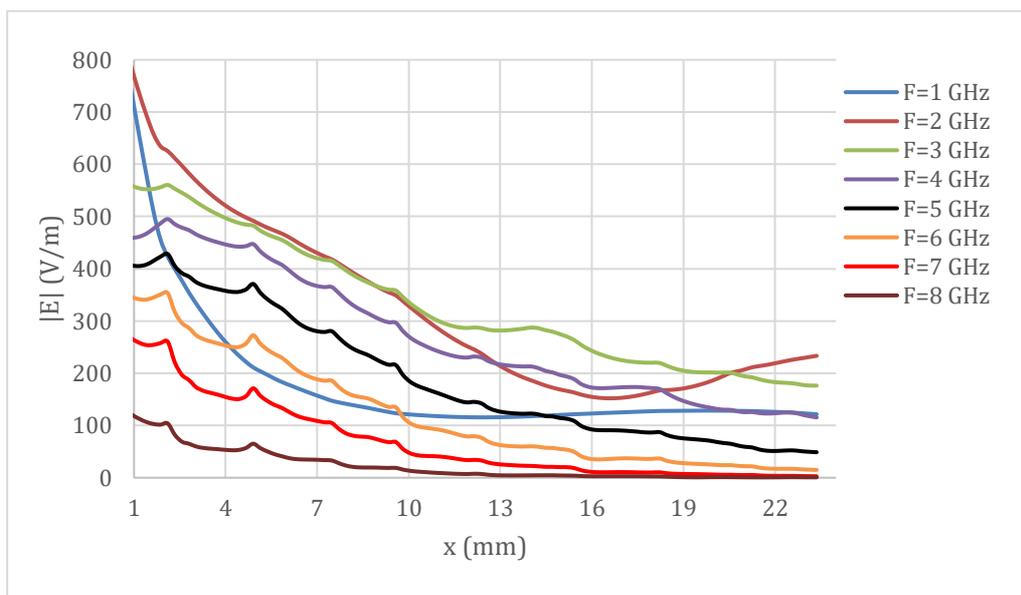


Figure 102 Intensité du champ dans l'axe x

En considérant toujours 300 V/m comme la limite inférieure de l'intensité du champ électrique, nous observons une fenêtre de détection horizontale (suivant l'axe y) de 8 mm à 2 GHz (voir Figure 103). Si nous considérons la limite inférieure de  $|E|=200$  V/m nous retrouvons la fenêtre de détection horizontal de 12 mm obtenue dans les mesures expérimentales.

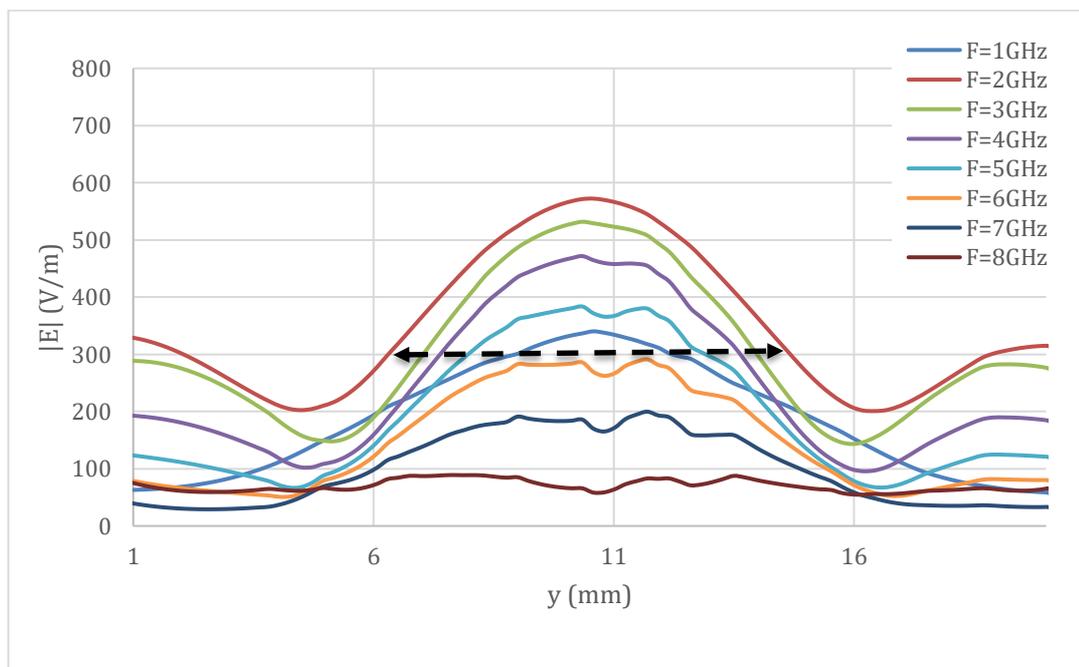


Figure 103 intensité du champ E dans l'axe y

Suivant l'axe  $z$  nous obtenons une fenêtre verticale d'environ 12 mm pour 3 GHz. A noter que  $z=1$  mm correspond à la partie plus haute de l'axe. Pour des contraintes liées au logiciel nous avons coupé la sphère dans sa partie basse, ce qui altère les intensités de champ à proximité du bas de la sphère. La fenêtre a été extrapolée par symétrie (voir Figure 104).

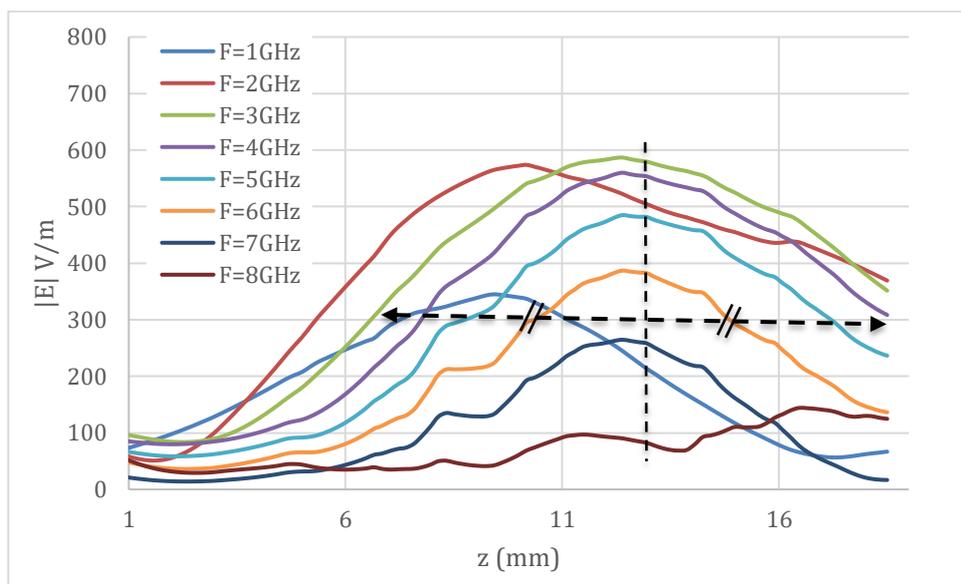


Figure 104 Intensité du champ  $E$  dans l'axe  $z$

Ce setup réalisé sur HFSS nous a permis de calculer l'intensité du champ électrique à l'intérieur d'un œuf, modélisé par une coquille (sphérique) remplis d'eau. Nous avons obtenu des résultats similaires à ceux obtenus avec le banc expérimental nous permettant de valider les méthodes expérimentales et par simulation de caractérisation de la sensibilité des capteurs. Pour les prochaines versions des capteurs, la méthodologie de prédiction des performances des capteurs développés sur HFSS ainsi validée peut rentrer dans le processus de conception et d'optimisation de nouveaux capteurs.

Nous pouvons désormais développer (perspective de ce travail) une approche plus proche du scénario réel de mesure d'un œuf en améliorant le modèle de l'œuf utilisé, avec différentes structures contenant différents liquides de propriétés diélectriques mimant les liquides de l'œuf. De la même façon pour le banc expérimental, nous pourrions nous approcher encore plus de la mesure d'un œuf en concevant un modèle d'œuf plus réaliste dont le perturbateur serait composé par une des structures de l'œuf que nous souhaitons cibler.

Nous avons réalisé différentes campagnes de mesures non-invasives d'œufs, en utilisant le capteur C2 dans la plupart des campagnes de par sa forte sensibilité. Les

méthodes utilisées ainsi que résultats obtenues sont décrits dans le prochain paragraphe.

## IV. MESURES NON INVASIVE DES ŒUFS

La partie finale de mon travail de thèse, a été dédié à la spectroscopie RF non-invasive des œufs, ayant pour but de déterminer le genre de l'embryon. Cette partie décrit les méthodes utilisées : de la méthode de préparation des œufs incluant le processus d'incubation, à la méthode de mesure de l'œuf afin de cibler une zone particulière de ce dernier, ainsi que l'analyse des résultats obtenus.

### IV.1. CONDITIONS D'INCUBATION ET DE MESURE

A partir des résultats obtenus lors de l'analyse de liquides de l'œuf décrits dans le chapitre 2 de cette thèse, la question sur l'embryon comme une source de différenciation sexuel de l'œuf est clairement posée. En conséquence, pour les campagnes des mesures non invasives des œufs nous avons ciblé premièrement l'embryon.

Le support mécanique nous permettant la mesure non invasive des œufs a été conçu pour mesurer un œuf en position verticale, avec les capteurs collés à la partie centrale de l'œuf (la partie plus large). Un œuf incubé en position verticale a la chambre à air dans la partie haute, les structures de l'œuf sont potentiellement configurées comme montré par la Figure 105.

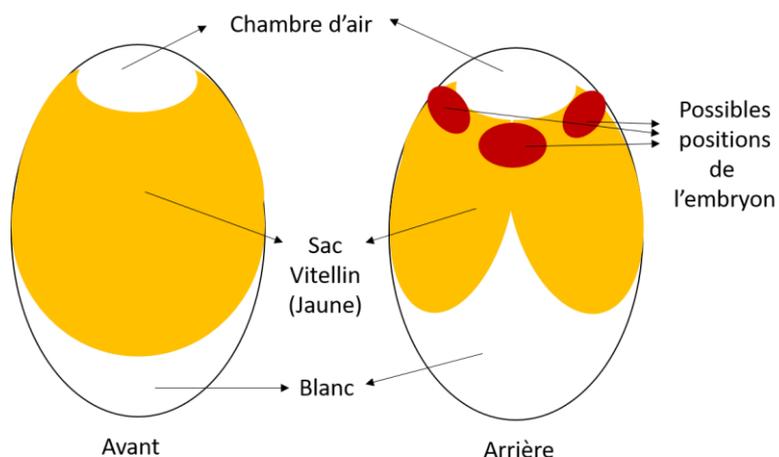


Figure 105 schéma d'un œuf incubé en position verticale

Nous pouvons identifier deux faces (avant et arrière) grâce à la forme que prend le sac vitellin (jaune de l'œuf) collé à la coquille. Celui-ci est visible physiquement avec un éclairage puissant de l'œuf. L'embryon va se positionner de préférence dans la face arrière, en haut et au centre. Cependant, il peut aussi se placer en haut mais décalé vers un des côtés de l'œuf. Dans tous les cas, il est hors de la fenêtre de détectabilité du capteur, laquelle est positionnée dans la partie centrale de l'œuf.

Pour positionner l'embryon au centre de l'œuf et proche à la coquille nous avons incubé les œufs en position horizontale comme montré à la Figure 106. Ensuite, pour la mesure des œufs nous avons placé les capteurs de chaque côté de l'œuf (Figure 106 à droite) en gardant l'œuf horizontal. De cette manière, le capteur 1 se trouve au niveau de l'embryon et par conséquent, les signaux réfléchis ( $S_{11}$ ) et transmis ( $S_{21}$ ) sera affecté par l'embryon.

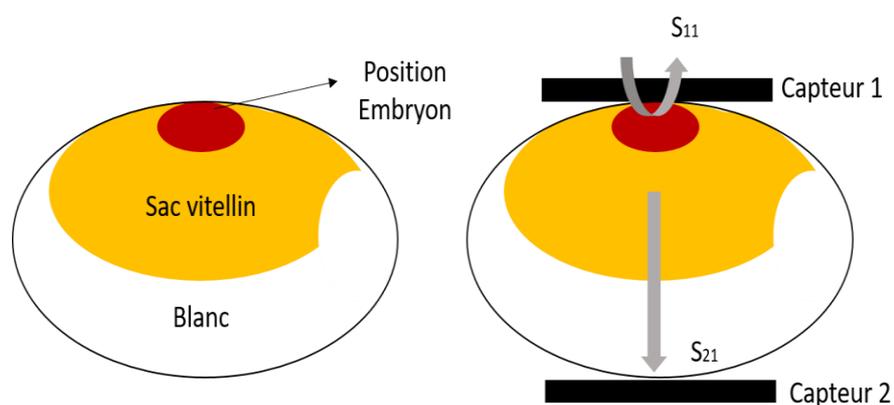


Figure 106 incubation et mesure d'un œuf en position horizontale

Pour les premières campagnes de mesures, les œufs ont été incubés au LAAS-CNRS en position horizontale (Figure 107.a). Les œufs ont été ramenés directement du couvoir en J-0 au laboratoire et ont été mis en incubation à une température 37.7 °C et avec un taux d'humidité de 57%.

Avant d'être mesurés, les œufs ont été éclairés avec une lampe pour déterminer la position de l'embryon (cf. Figure 107.b). Ensuite, ils ont été marqués avec un cercle de même diamètre que la partie métallique centrale du capteur nous permettant de positionner le capteur 1 dans la zone où l'embryon se trouve (cf. Figure 107.c).

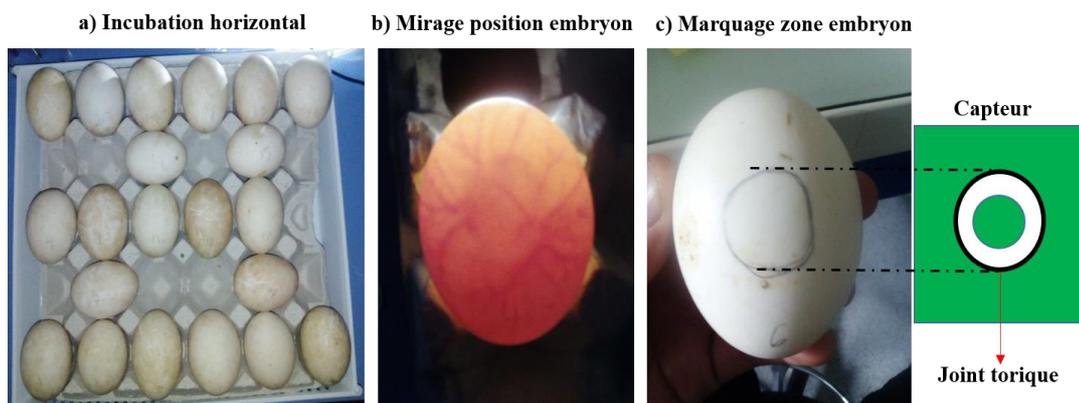


Figure 107 a) incubation horizontale des œufs, b) mirage de la position embryon, c) marquage des œufs.

Les mesures ont été faites dans une couveuse, dans laquelle nous avons placé le banc de spectroscopie RF des œufs, à une température d'environ 34 °C et à un taux d'humidité d'environ 30% (voir Figure 108). L'ouverture successive de la couveuse pour placer les œufs dans les capteurs ne permet pas de monter la température et l'humidité aux valeurs utilisés pour l'incubation. Cependant, l'utilisation de cette couveuse diminue la différence entre les conditions de l'œuf incubé et l'œuf mesuré. Par ailleurs, la mesure d'un œuf est suffisamment rapide (temps de mesure estimé à 20 secondes par œuf) pour ne pas altérer la température de l'œuf.

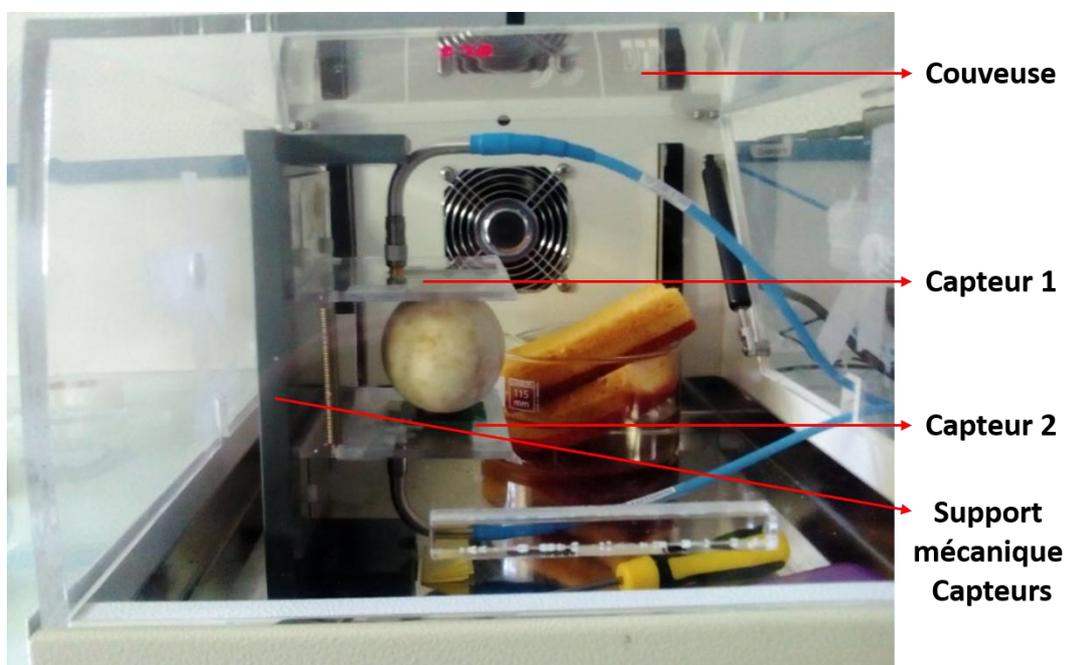


Figure 108 Mesure d'un œuf en position horizontale

Le capteur 2 (en bas) reste fixe et sert ainsi de support à l'œuf tandis que le capteur 1 (en haut) est mobile dans l'axe vertical. Deux ressorts métalliques reliant les deux capteurs permettent de serrer l'œuf et d'assurer le contact capteurs-œuf.

## IV.2. ANALYSE DE DONNEES

La mesure d'un œuf comporte l'enregistrement des coefficients de réflexion ( $S_{11}$  et  $S_{22}$ ) et de transmission ( $S_{21}$  et  $S_{12}$ ) de l'ensemble capteurs-œuf (Figure 109). Ces coefficients sont mesurés avec un ARV deux ports dans une plage large de fréquences de 0.1 à 8.5 GHz. Les données (paramètres S) sont analysées sur ordinateur en utilisant le logiciel Matlab nous permettant d'identifier dans le spectre un contraste male-femelle.

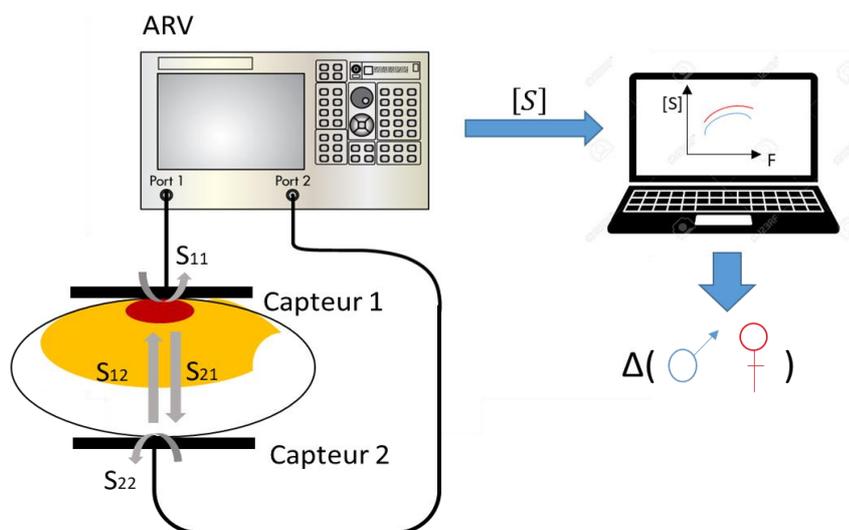


Figure 109 Schéma mesure d'un œuf

Pour chaque œuf mesuré nous mesurons 4 paramètres S dont chacun est composé d'un module et d'une phase mesurés pour 601 points en fréquence. Ceci nous amène à un total de 4800 données pour chaque œuf mesuré.

Pour simplifier l'analyse de données nous avons considéré le système de la Figure 109 réciproque ( $S_{21}=S_{12}$ ). En plaçant l'œuf horizontalement, l'embryon est du côté du capteur 1 dont  $S_{11}$  est le coefficient de réflexion. Le capteur 2 est placé du côté du blanc dont, pour le moment, nous n'avons pas l'intérêt d'analyser. En définitive, dans un premier temps nous allons analyser uniquement les paramètres  $S_{11}$  et  $S_{21}$ .

En utilisant ces procédures, nous avons réalisé 3 campagnes majeures de sexage non invasif des œufs décrites ci-dessous.

## **IV.3. CAMPAGNE N° 1**

### **IV.3.1. Matériaux et Méthodes**

Nous avons incubé 60 œufs dont 40 ont été mesurés aux jours d'incubation 7, 8, 9 et 10. Parmi ces 40 œufs, dont 21 femelles et 19 males, deux œufs ont été sélectionnés chaque jour pour des mesures de répétabilité. Par la suite, chaque œuf a été mesuré une fois et remis de suite en incubation. Le temps de mesure d'un œuf est approximativement de 20 secondes. Au jour 11 d'incubation les œufs ont été ouverts pour prélever certains constituants permettant la détermination du genre de chaque embryon.

### **IV.3.2. Reproductibilité**

Pour chaque journée de mesures, deux œufs du groupe ont été sélectionnés pour évaluer la répétabilité de la mesure d'un œuf. Les erreurs de répétabilité peuvent être attribuées, d'une part au mouvement de l'embryon dans l'œuf et, d'autre part, au positionnement manuel (et donc non répétable) de l'œuf dans les capteurs (contact œuf-capteur).

#### **Analyse en réflexion**

Pour évaluer la répétabilité due au mouvement de l'embryon dans l'œuf, nous avons positionné l'œuf entre les capteurs et nous avons enregistré 5 mesures consécutives (avec des intervalles de temps aléatoires) sans changer ni la position de l'œuf ni celle du capteur.

Les écart-types du module du coefficient de réflexion ( $\sigma(|S_{11}|)$ ) en fonction de la fréquence, calculés sur 5 mesures consécutives des œufs en jour 8 d'incubation (œuf 36 et œuf 38) sont montrés à la Figure 110.

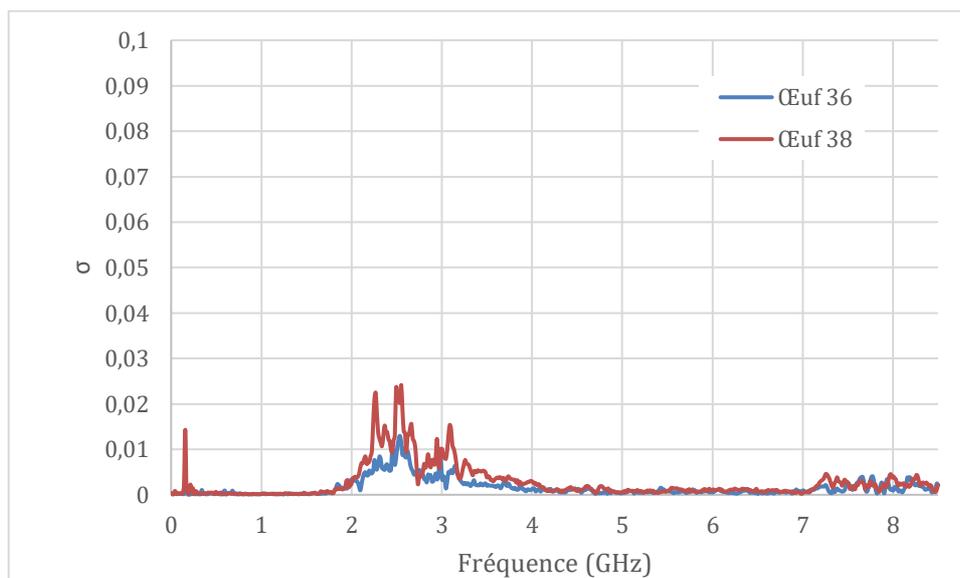


Figure 110 écart type du  $|S_{11}|$  (dB) dû au mouvement de l'embryon des œufs en J8

Pour évaluer la répétabilité due au positionnement de l'œuf entre les capteurs, nous avons répétitivement placé et enlevé l'œuf entre les capteurs en enregistrant à chaque fois  $S_{11}$ . Les écart-types du module du coefficient de réflexion  $\sigma(|S_{11}|)$  calculés sur 5 mesures des œufs 36 et 38 (en J8) sont montrés dans la Figure 111.

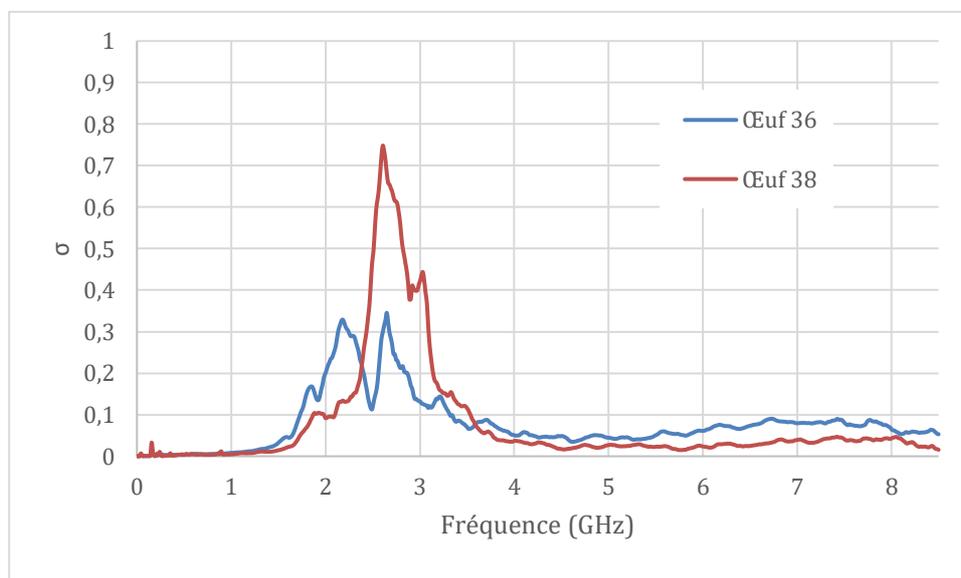


Figure 111 Ecart-types du  $|S_{11}|$  (dB) dû au positionnement des œufs en J8

Le mouvement de l'embryon n'est pas un fort contributeur (et de loin) sur l'erreur de la mesure d'un œuf, nous avons obtenus des écart types très faibles  $\sigma < 0.025$  que nous prendrons comme le « bruit » de base de la mesure d'un œuf. En revanche, le positionnement de l'œuf présente des écarts types plus élevés notamment à la fréquence de 2,58 GHz. Nous observons de plus que l'écart type pour l'œuf 38 est

plus élevé que l'écart type pour l'œuf 36. Ceci est dû possiblement au diamètre plus élevé de l'œuf 38 (par rapport au diamètre moyen des œufs) et par conséquence plus difficile à le placer correctement entre les deux capteurs.

Nous avons répété cette mesure chaque jour de cette campagne de mesures. Les écart types calculés du module ( $|S_{11}|$ ) et de la phase ( $\phi(S_{11})$ ) du coefficient de réflexion dû au positionnement de l'œuf dans les capteurs, sont résumé dans le Tableau 18 pour les fréquences de 2 et 3 GHz (fréquences de forte dispersion).

Jour	N° œuf	2 GHz		3GHz	
		$ S_{11} $ dB	$\phi(S_{11})^\circ$	$ S_{11} $ dB	$\phi(S_{11})^\circ$
<b>J-7</b>	36	0.3	4.2	0.2	2.3
	38	0.3	4.6	0.2	1.6
<b>J-8</b>	36	0.2	3.2	0.1	0.4
	38	0.1	2.3	0.4	1.6
<b>J-9</b>	36	0.1	1.8	0.08	2.3
	38	0.1	2.8	0.2	1.7
<b>J-10</b>	09	0.4	4.8	0.1	1.4
	38	0.4	5.6	0.26	2.4
<b>Moyenne</b>		<b>0.2</b>	<b>3.7</b>	<b>0.2</b>	<b>1.7</b>

Tableau 18 Ecart types du module et phase du coefficient de réflexion ( $S_{11}$ ) dû au repositionnement de l'œuf dans le capteur

En moyenne, l'écart type dû au positionnement manuel de l'œuf dans les capteurs est de 0.2 dB pour le module du coefficient de réflexion aux fréquences de 2 et 3 GHz. Nous allons considérer pour cette campagne de mesures que tous les œufs mesurés présentent cet écart type.

### Analyse en transmission

Le mouvement de l'embryon présente toujours un faible impact sur la répétabilité de la mesure du coefficient de transmission des œufs en J8 (Figure 112). On observe des forts pics aux fréquences inférieures à 1 GHz et supérieures à 7 GHz qui correspondent à des zéros de transmission observable à la Figure 115 du paragraphe IV.3.3 de ce chapitre.

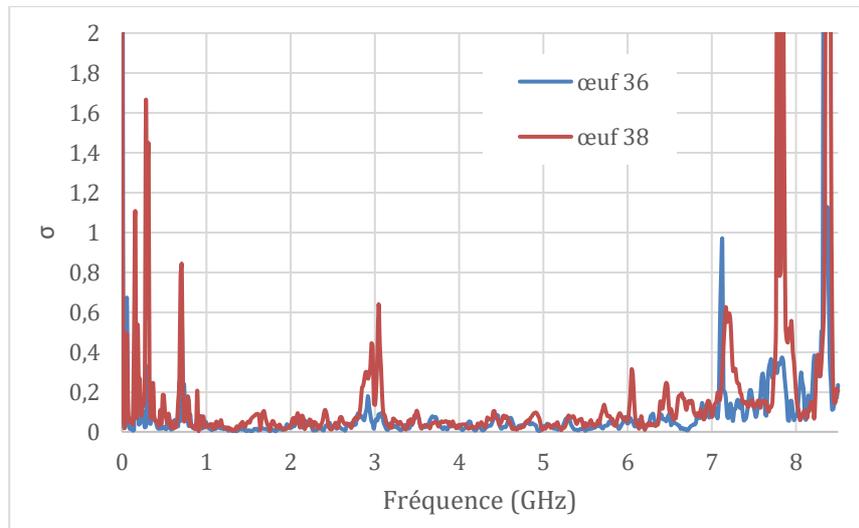


Figure 112 écart type du  $|S_{21}|$  dB dû au mouvement de l'embryon des œufs en J8

Les écarts types liés au positionnement de l'œuf dans le capteur pour le module du coefficient de transmission en fonction de la fréquence sont montrés à la Figure 113. En moyenne les écarts types du  $|S_{21}|$  sont plus élevés que ceux obtenus pour le coefficient de réflexion. Ceci s'explique par le fort niveau de bruit en transmission, conséquence d'une transmission faible ( $< -20$ dB).

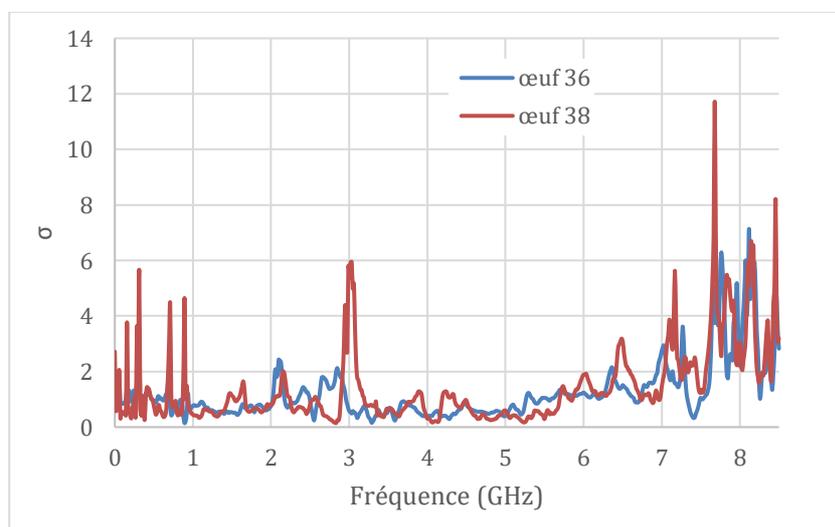


Figure 113 écart type du  $|S_{21}|$  (dB) due au positionnement des œufs en J8

### IV.3.3. Spectre de l'œuf

Les spectres en réflexion et en transmission quand les capteurs sont en contact avec un œuf en J8 sont montrés aux Figure 114 et Figure 115 respectivement. Les spectres des capteurs sans œuf (système vide) et avec un œuf vide (juste la coquille) sont aussi montrés nous permettant d'observer l'effet de la coquille sur les paramètres S.

Quand les capteurs sont en contact avec un œuf en J-8 il se produit un fort pic de -13 dB sur le coefficient de réflexion autour de 2.5 GHz et un deuxième moins intense de -6 dB autour de 6.5 GHz. Ceci se traduit par un coefficient de transmission qui atteint un maximum à -25 dB entre 2 et 3GHz.

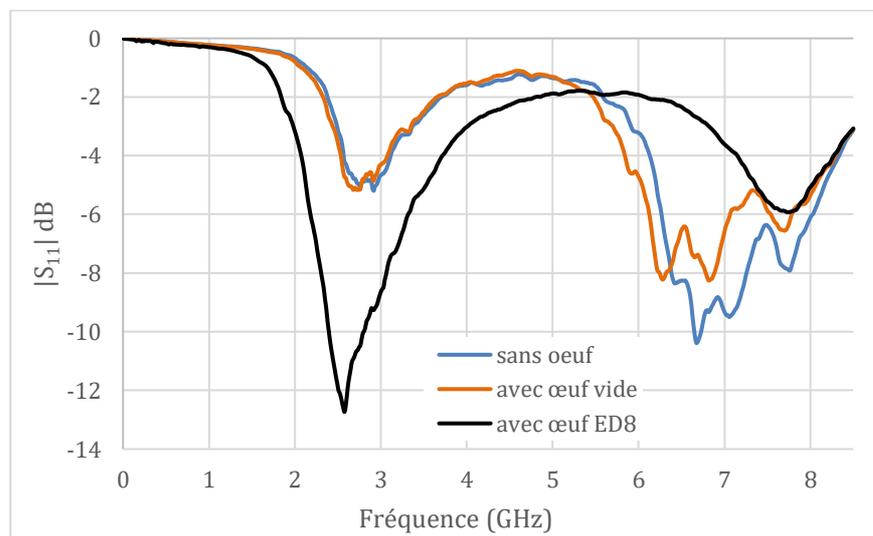


Figure 114 Module du coefficient de réflexion  $|S_{11}|$  d'un œuf en J-8

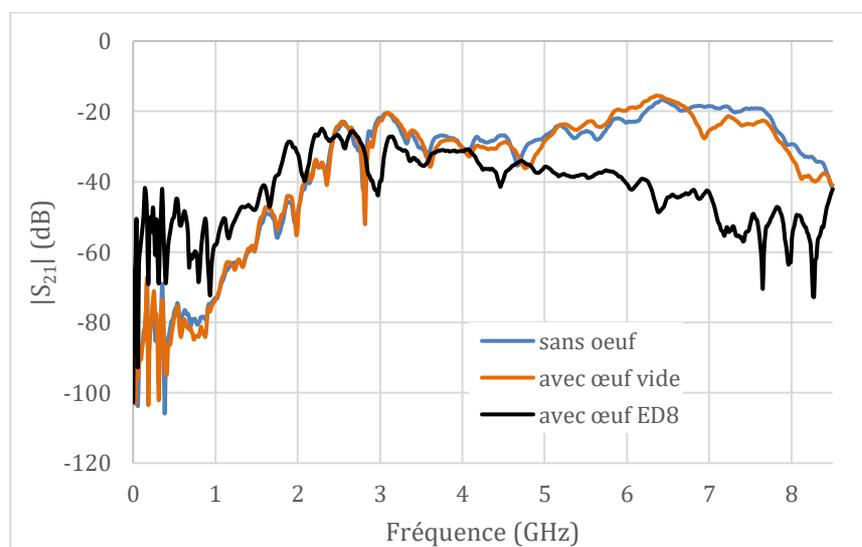


Figure 115 Module du coefficient de transmission  $|S_{21}|$  d'un œuf en J-8

### IV.3.4. Mesure des œufs et analyse de donnés

Nous avons également mesuré 40 œufs, dont chaque œuf a été mesuré une fois. Nous avons caractérisé le même lot d'œuf à différents jours d'incubation de J-7 jusqu'à J-10. Pour chaque jour nous avons analysé le coefficient de réflexion et transmission à différentes fréquences.

#### Analyse en réflexion

Afin d'identifier une différence mâle-femelle révélée par le coefficient de réflexion, nous avons analysé les plans  $\phi(S_{11})$  vs  $|S_{11}|$  dB à différentes fréquences. Nous avons observé un contraste mâle-femelle visible pour les œufs en J8 à 3 GHz (cf. Figure 116). En traçant une droite « seuil »  $y=mx+b$  dont  $m=-9$ , nous pouvons discriminer les œufs femelles des mâles avec une erreur d'environ 27% pour les mâles et de 14% pour les femelles.

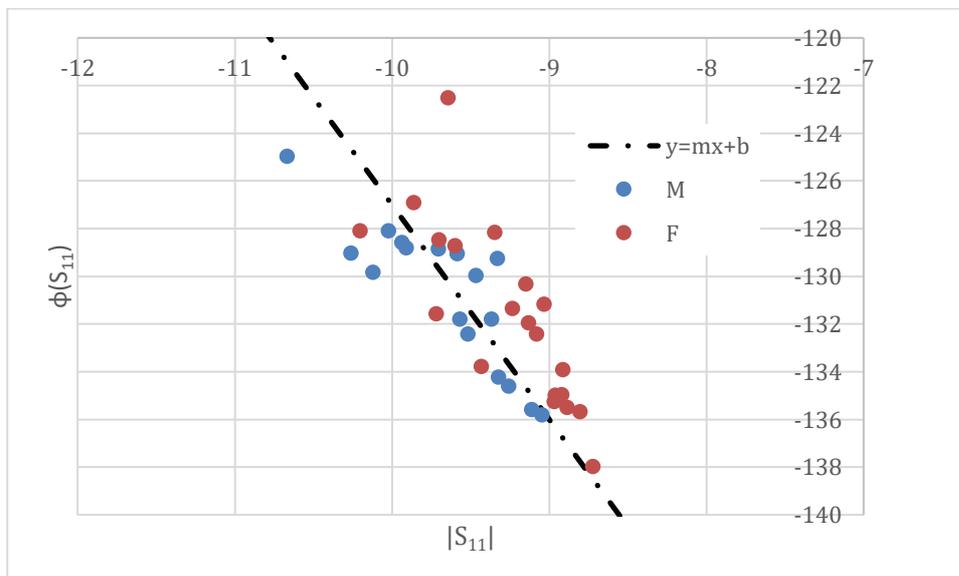


Figure 116 Coefficient de réflexion des œufs en J8 à 3 GHz

Le contraste mâle-femelle défini comme la différence entre les moyennes du module du coefficient de réflexion des mâles et des femelles ( $\Delta_{MF}|S_{11}| = \overline{|S_{11}|}_M - \overline{|S_{11}|}_F$ ) en fonction de la fréquence, est montré à la Figure 117 pour des œufs à différents jours d'incubation.

Nous pouvons observer, qu'en général, entre 2 et 4 GHz un contraste plus marqué. Pour des œufs en J8 ce contraste se présente spécialement plus fort.

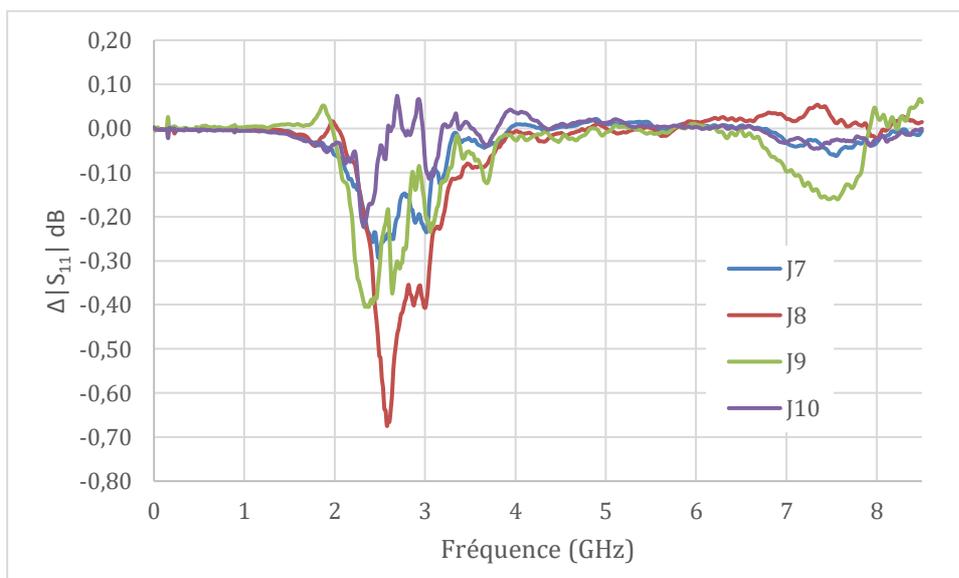


Figure 117 Contraste male femelle du module du coefficient de réflexion ( $\Delta|S_{11}|$ )

En effet, nous obtenons un maximum de contraste à la fréquence de 2.58 GHz. Cependant, nous trouvons à la même fréquence une dispersion entre œufs de même sexe supérieure au contraste (Figure 118). En conséquence, une discrimination male femelle dans le plan  $\phi(S_{11})$  vs  $|S_{11}|$  à cette fréquence n'est pas significatif. Il en est de même façon pour le fort contraste obtenu pour des œufs en J7 à 2.3 GHz dont les écart-types entre œufs de même sexe sont également supérieurs au contraste.

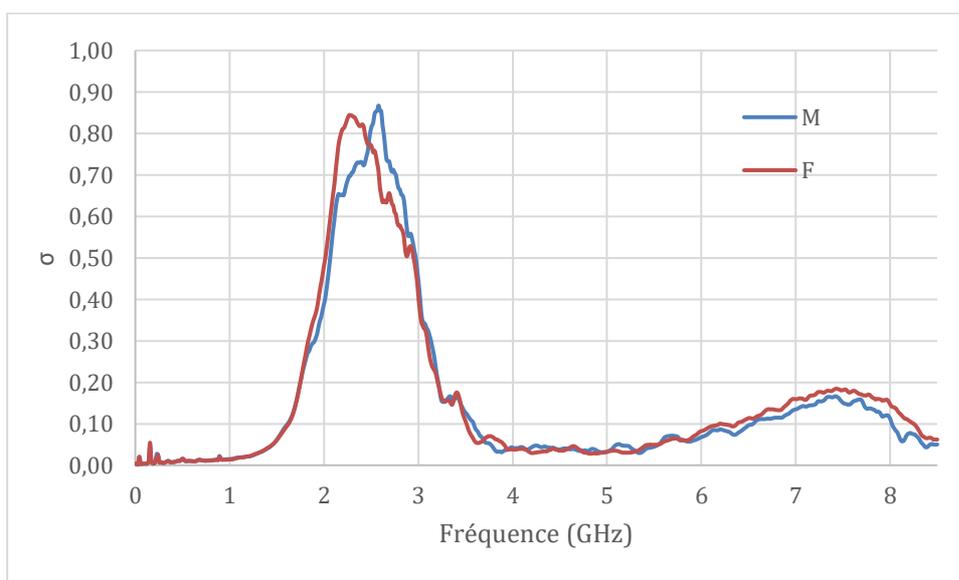


Figure 118 écart-type  $|S_{11}|$  (dB) œufs mâle (M) et femelles (F)

Enfin, à 3 GHz nous obtenons un contraste mâle femelle de  $\Delta_{M-F}$  de 0.4 dB et un écart type de répétitivité également d'environ 0.4 dB. L'écart type de la mesure d'un œuf (due au positionnement de l'œuf dans le capteur) est estimé à 0.2 dB en

moyenne, pouvant arriver à une valeur de 0.4 dB pour des œufs de grand taille ou difficiles à bien placer entre les capteurs. En conclusion, la différence visible dans le plan  $\phi(S_{11})$  vs  $|S_{11}|$  à 3 GHz, ne peut pas encore être confirmée.

Nous avons montré précédemment que ce capteur présente une forte sensibilité entre 2 et 4GHz. En conséquence, à cette fréquence le contraste mâle-femelle se présente plus fort mais également avec une forte dispersion dû à la répétabilité de mesure. Celle-ci due d'une part, au positionnement de l'œuf entre les capteurs ayant un effet direct sur le contact capteur-œuf. D'autre part s'ajoute la dispersion intrinsèque entre œufs provenant du même lot (même canne pondeuse) et incubés dans la même condition, ayant un embryon du même sexe.

### Analyse en transmission

Le contraste male-femelle en transmission aux différents jours d'incubation est montré dans la Figure 119. Les courbes obtenues sont très bruitées et donc il est difficile de distinguer des zones dans le spectre de plus fort contraste. De plus, il est difficile d'identifier un jour d'incubation qui présente particulièrement un plus fort contraste.

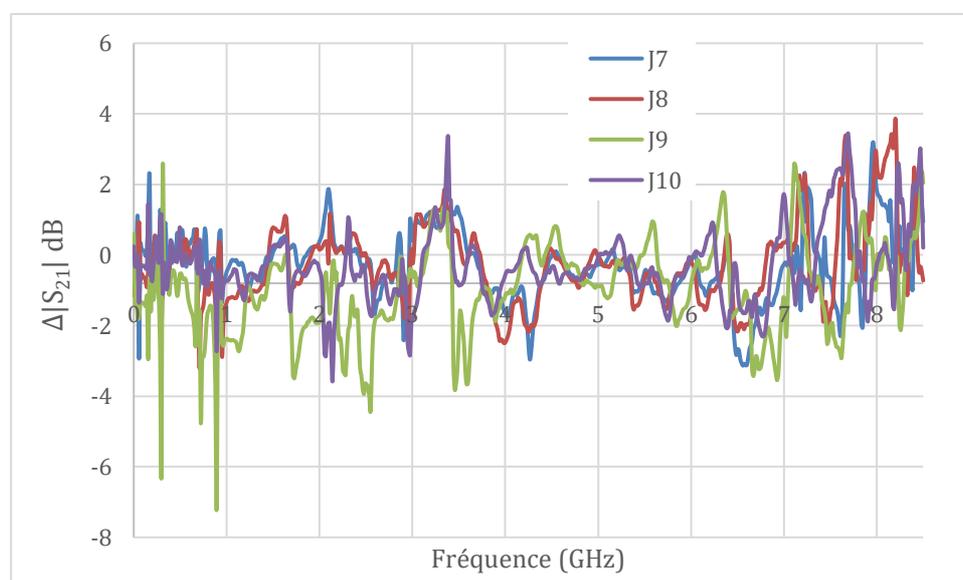


Figure 119 Contraste mâle-femelle du module du coefficient de transmission ( $\Delta|S_{21}|$ )

L'écart type du  $|S_{21}|$  mesuré pour œufs en J8 du même sexe (cf. Figure 120) présentent une valeur moyenne autour de 2 dB entre les fréquences de 1 et 6 GHz (supérieure aux valeurs du contraste).

Ces résultats ne permettent pas de repérer une fréquence pour laquelle il serait possible de discriminer les œufs males des femelles. De plus, nous avons analysé les

plans  $\phi(S_{21})$  vs  $|S_{21}|$  aux différents fréquences et pour différents jours d'incubation sans détecter visiblement un différence mâle femelle.

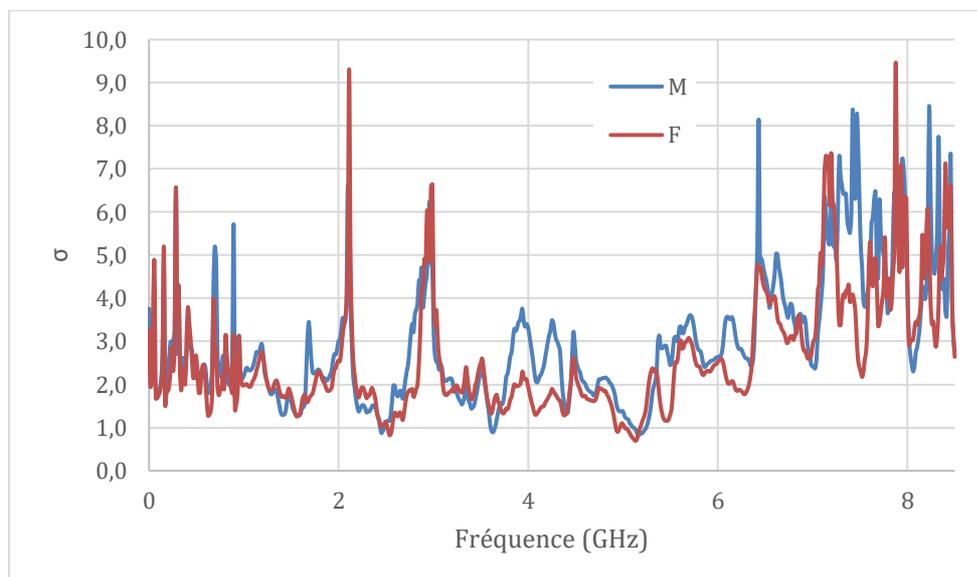


Figure 120 écarts types  $|S_{21}|$  (dB) des œufs mâles (M) et femelles (F) en J8

Pour la suite nous nous sommes concentrés sur l'analyse en réflexion à 3GHz pour des œufs aux alentours de J8. Pour cela nous avons mesuré un nombre inférieur des œufs mais en réalisant plusieurs mesures par œuf afin de mieux évaluer les erreurs de mesure pour chaque œuf.

## IV.4. CAMPAGNE N°2

### IV.4.1. Matériaux et Méthodes

Nous avons incubé 30 œufs et suivi seulement 20 œufs, dont 9 mâles et 11 femelles. Chaque œuf a été mesuré 5 fois consécutives en repositionnant à chaque fois l'œuf dans les capteurs. De cette façon, nous pouvons alors calculer les erreurs de mesure pour chaque œuf. Les œufs ont été incubé à l'horizontal pour favoriser le positionnement de l'embryon. Ensuite les œufs ont été mesurés dans les jours d'incubation 7, 8 et 9.

Pour avoir une idée générale de la répétabilité de la mesure pour chaque jour d'incubation, nous avons moyenné les écarts types des œufs comme montré dans la Figure 121. Nous observons des écarts types très élevés entre 2 et 3 GHz notamment pour les œufs en J7. Cependant pour des fréquences supérieures à 3.4 GHz nous obtenons des écarts types faibles  $\sigma < 0.1$  dB.

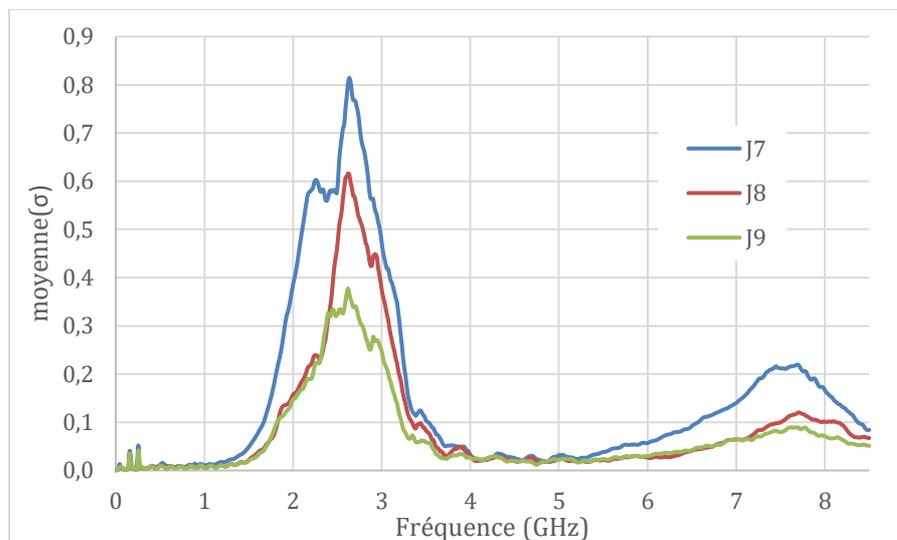


Figure 121 moyenne des écarts types du  $|S_{11}|$  (en dB) des œufs pour différents jours d'incubation

Nous avons alors analysé les plans  $\phi(S_{11})$  vs  $|S_{11}|$  aux différents fréquences entre 1 et 8.5 GHz. A la fréquence de 3.5 GHz une différence mâle femelle est visiblement discernable (Figure 122). Nous avons tracé les écart-types pour chaque œuf ( $\pm\sigma$  pour le module et la phase) et nous avons ainsi tracé une droite ( $y=mx+b$ ) en divisant les deux groupes identifiés (mâle-femelle). En effet, les écart types sur le module du coefficient de réflexion (abscisse dans le graph de la Figure 122) représentant l'incertitude de la valeur mesurée montrent que certains œufs proches à la frontière pourraient être mal classifiés.

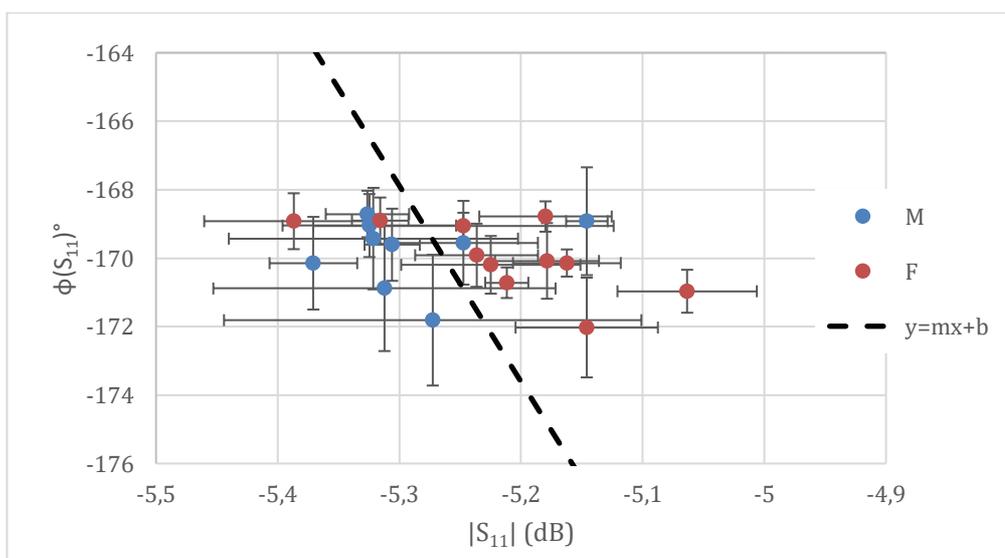


Figure 122 Plan  $|S_{11}|$  vs  $\phi(S_{11})$  à 3.5 GHz et écart types par œuf (J-8)

Plus précisément, les œufs mâles ont un écart type en moyenne de 0.05 dB et les œufs femelles de 0.02 dB sur le module du coefficient de réflexion à 3.5 GHz. En effet cet écart type est faible, cependant, le contraste des moyennes mâle-femelle se présente aussi faible  $\Delta_{M-F}(|S_{11}|) = 0.07$  dB à cette fréquence (cf Figure 123). De même façon pour l'écart type entre œufs de même sexe (cf. Figure 124) étant aussi du même ordre du contraste (environ  $\sigma=0.07$  dB).

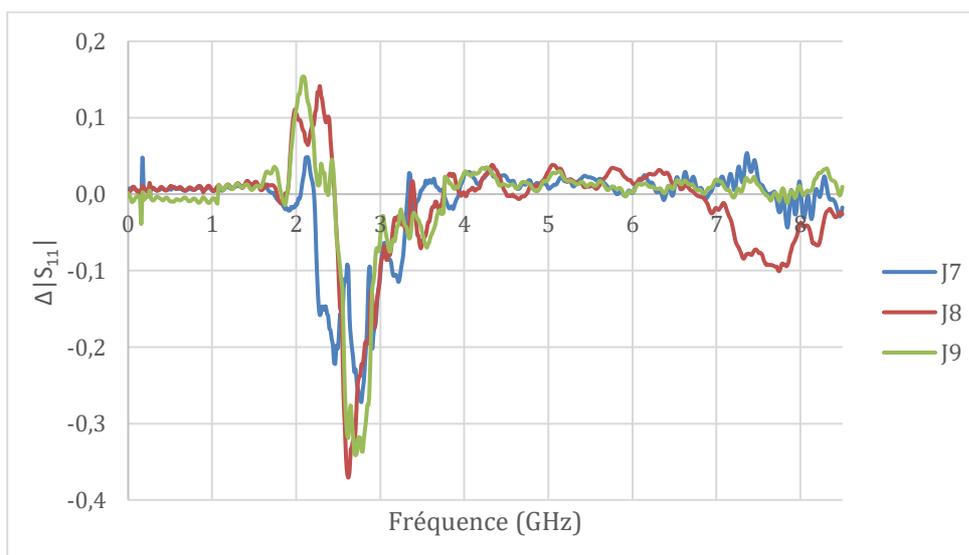


Figure 123 Contraste mâle-femelle  $\Delta|S_{11}|$  dB en fonction de la fréquence aux différents jours d'incubation.

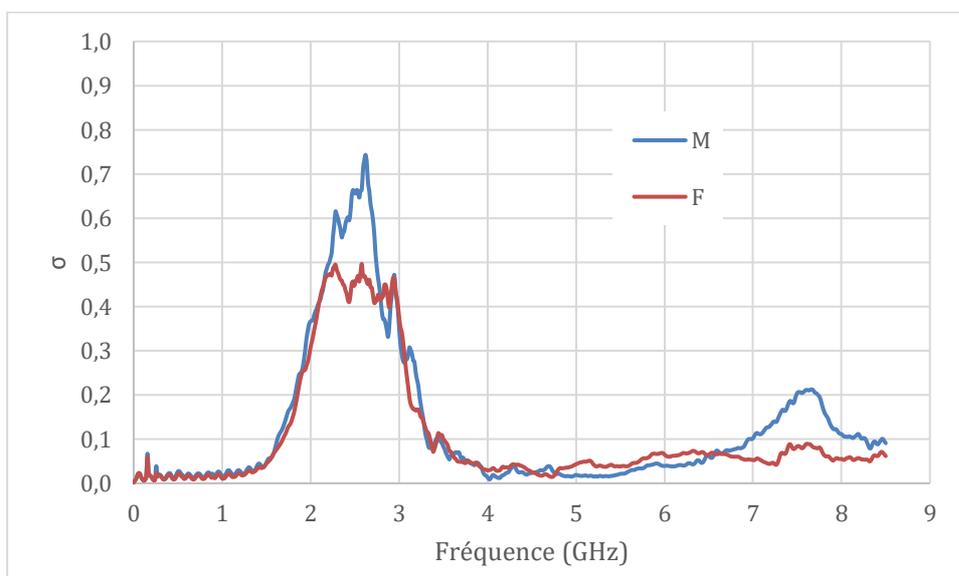


Figure 124 écart types du coefficient de réflexion (en dB) des œufs mâles (M) et femelles (F) en J8

En résumé, nous avons analysé trois valeurs caractéristiques issues des mesures des œufs. La première étant la répétabilité évaluée sur l'incertitude de la valeur

mesurée par œuf due au positionnement de l'œuf dans les capteurs. Le deuxième paramètre que nous avons analysé est le contraste des moyennes entre les œufs mâles et femelles en fonction de la fréquence afin d'identifier les zones, dans le spectre, de plus fort contraste. Le troisième paramètre que nous avons considéré dans cette analyse, est la dispersion intrinsèque lié aux différences entre œufs de même sexe. En effet nous cherchons avoir un contraste mâle-femelle supérieur à l'incertitude de la mesure d'un œuf et notamment supérieur à la dispersion intrinsèque des œufs ayant le même sexe. Jusqu'à ici, les résultats obtenus ne nous permettent pas d'être concluants sur une différenciation mâle-femelle. Cependant, dans les deux campagnes de mesures réalisés nous avons trouvé des résultats similaires pour des œufs en J8 ce qui est encourageant car cela démontre la robustesse des mesures (des préparations et conditionnements des œufs aux traitements des mesures) pour cette condition J8. Ceci nous suggère de garder alors cette piste de sexage basé sur la mesure des embryons (in-ovo) en J8, tout en développant plus avant notre technique.

### **Positionnement des œufs dans les capteurs**

Le positionnement de l'œuf entre les capteurs ajoute de l'incertitude dans la mesure d'un œuf notamment entre 2 et 3 GHz avec un fort pic autour de 2.5 GHz. A cette fréquence le module du coefficient de réflexion présente également un pic quand le capteur est en contact avec un œuf. Nous avons constaté pendant les campagnes de mesures réalisés que le contact capteur-œuf affecte fortement la valeur mesurée. En conséquence, pour avoir une bonne répétabilité nous devons assurer un bon contact capteur-œuf.

Deux facteurs vont influencer le bon contact capteur-œuf. D'une part, la position de l'embryon dans l'œuf. L'incubation horizontale des œufs faite pour ces deux campagnes de mesures n'a pas assuré le placement précis de l'embryon dans le centre de l'œuf (partie plus large). Dans ce cas, afin de cibler l'embryon avec le capteur 1, nous avons été obligés d'incliner l'œuf et par conséquent perturber le contact du capteur 2 avec l'œuf en ajoutant de l'incertitude dans la mesure du coefficient de transmission (S21) comme est montré dans la photo de la Figure 125.

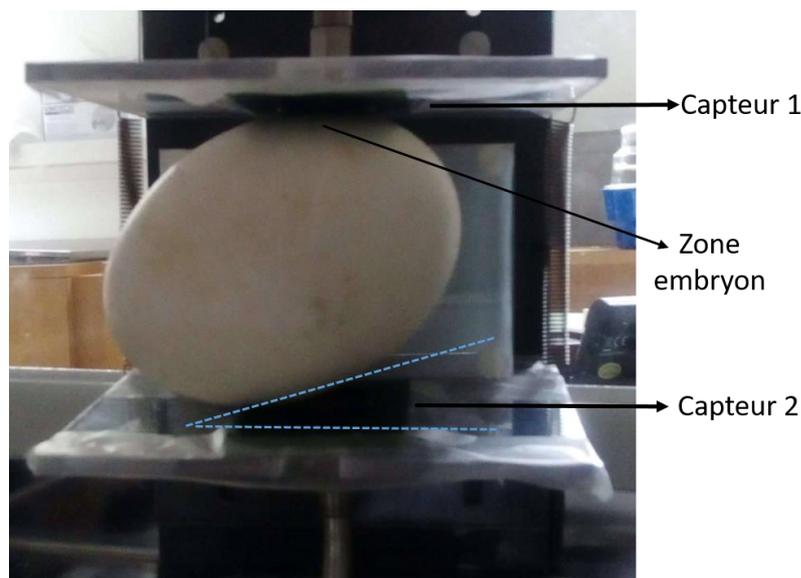


Figure 125 photo contact capteur1-œuf optimal mais capteur2-œuf non optimal

D'autre part, l'utilisation des ressorts améliorent le contact entre les capteurs et les œufs. Pour les campagnes de mesures réalisées nous avons utilisé seulement deux ressorts dans la partie basse des capteurs. Pour la suite nous allons utiliser 4 ressorts (un dans chaque coin du capteur) afin d'optimiser le contact capteur-œuf.

Nous allons laisser le capteur 1 mobile pour mieux s'adapter à la position de l'embryon et le capteur 2 fixe servant d'une part comme support de l'œuf et d'autre part, pour permettre la mesure en transmission.

### **Incubation des œufs**

Pour placer l'embryon au centre de l'œuf (dans la partie plus large) et proche à la coquille nous avons incubé les œufs en position horizontale. Nous avons rencontré deux contraintes avec cette méthode. Tout d'abord ceci nécessite un support pour que la position des œufs soit parfaitement à l'horizontale pendant l'incubation. Ensuite pour les œufs dont l'embryon n'est pas initialement placé au centre il est très difficile de « corriger » la position de l'embryon.

Nous avons alors mis en place une nouvelle méthode reposant sur une incubation normale, avec les œufs verticaux et, 30 minutes avant les mesures, cette démarche consiste à placer les œufs en position horizontale. Avec cette technique l'embryon se placera au milieu de l'œuf et en même temps il sera facile de corriger cette position en basculant l'œuf du bon côté quelques minutes avant mesure. Par ailleurs, avec cette méthode nous n'altérons pas le processus normal d'incubation des œufs.

## IV.5. CAMPAGNE N°3

Nous avons mesuré 120 œufs aux différents jours d'incubation (J7, J8, J9). Comme pour la campagne 2, chaque œuf a été mesuré 5 fois consécutives en repositionnant à chaque mesure l'œuf dans les capteurs. La répétabilité générale de la mesure, donnée par la moyenne des écart-types par œuf, est montrée dans la Figure 126 aux différents jours d'incubation.

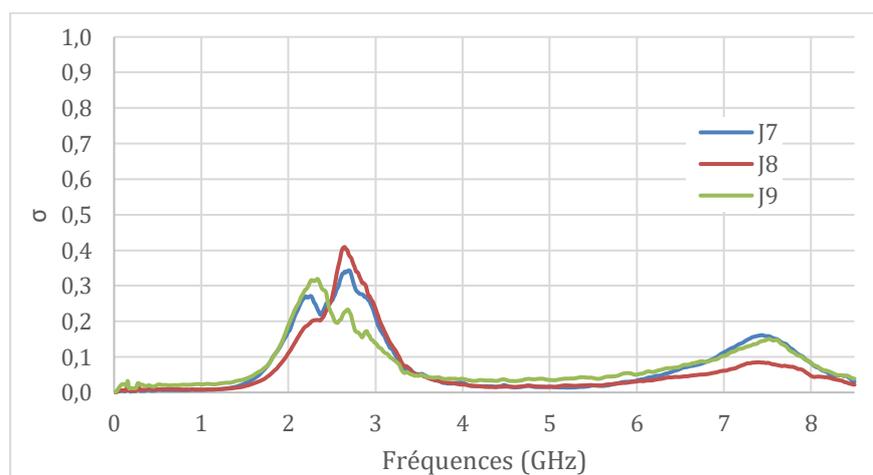


Figure 126 moyenne des écart types du coefficient de réflexion (dB) des œufs aux différents jours d'incubation.

Nous observons une amélioration de la répétabilité de la mesure due au positionnement de l'œuf, en comparaison avec les campagnes de mesures précédentes, cette amélioration est visible sur tout le spectre et notamment entre 2 et 3 GHz.

En comparant l'écart type obtenu à la valeur du coefficient  $|S_{11}|$  d'un œuf (en prenant le spectre de la Figure 114), nous obtenons un erreur de 2,5% à la fréquence de 3GHz. Pour une fréquence de 2,5GHz, correspondant au pic du  $|S_{11}|$ , l'erreur de la valeur mesurée atteint seulement 3%. Ces valeurs d'erreur semblent acceptables, cependant, si nous les comparons aux contrastes des moyennes mâle-femelle (cf. Figure 127) nous observons que l'erreur de mesure due au positionnement de l'œuf reste significatif. De plus ce contraste doit être aussi comparé à la dispersion entre œufs de même sexe.

Pour les œufs en jour 7 d'incubation nous obtenons un fort contraste d'environ 0,4 dB à 2,6 GHz. Par contre, pour la même fréquence nous obtenons un écart type d'environ 0,85 dB entre œufs de même sexe en J7 (cf. Figure 128).

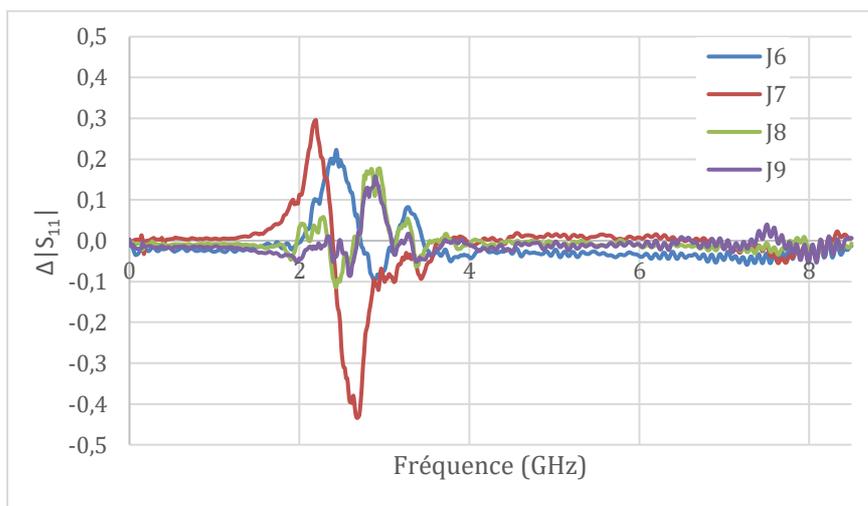


Figure 127 *Contraste des moyennes des mâles et femelles du coefficient de réflexion  $\Delta_{M-F}(S_{11})$*

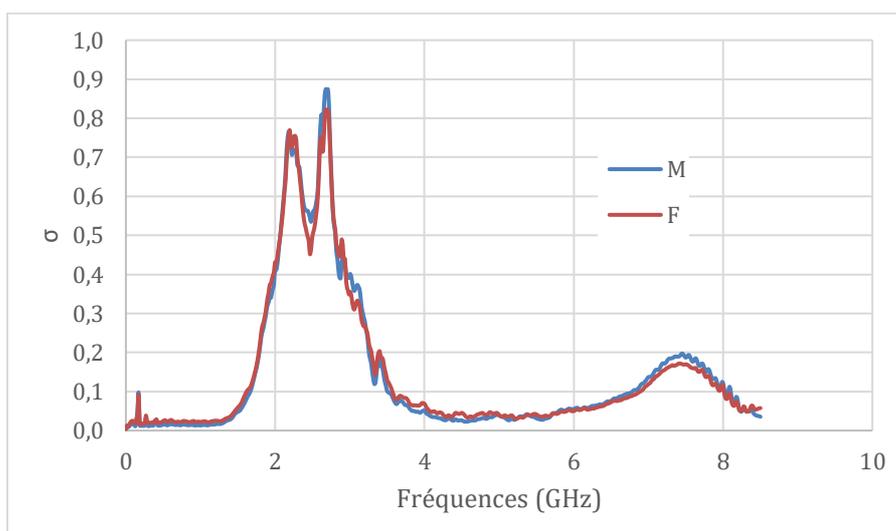


Figure 128 *écart types du coefficient de réflexion (dB) des œufs mâles (M) et femelles (F) en J7*

Pour cette campagne de mesures nous avons augmenté considérablement le nombre d'œufs mesurés (120 œufs) pour les jours 6 et 8 d'incubation. Avec une amélioration du contact œuf capteur nous avons réduit l'erreur de mesure due au positionnement de l'œuf dans le capteur. Cependant, nous avons obtenu un contraste mâle femelle plus faible, sans nous permettre de pouvoir discriminer les œufs mâles des femelles dans les plans  $\Delta(S_{11})$  vs  $\phi(S_{11})$ .

## IV.6. CAMPAGNE N°4

Nous avons mesuré des œufs aux stades précoces de développement embryonnaire : J-0 (avant incubation), J-3.5 et J-5.5. Le but était de trouver une différence entre les œufs fécondés et non-fécondés.

De même que pour les campagnes précédents chaque œuf a été mesuré 3 fois pour avoir une idée des erreurs de mesure par œuf. La moyenne des écart-types du coefficient de réflexion des œufs aux différents jours d'incubation est montré dans la Figure 129. Nous observons une répétabilité similaire à celle obtenue dans la campagne N°3.

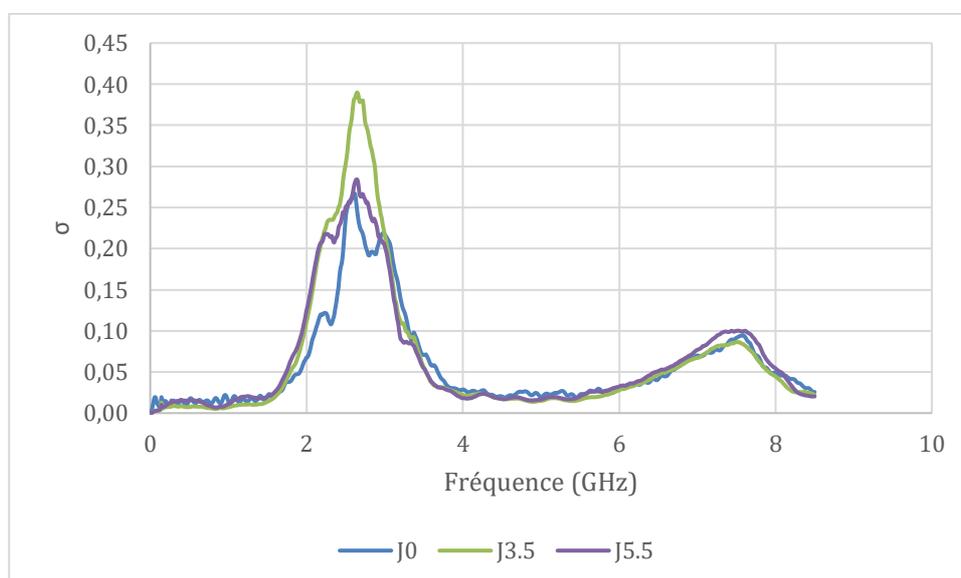


Figure 129 moyenne des écart-types par œuf aux différents jours d'incubation

Nous avons obtenu un fort contraste entre 46 œufs fécondés (27 mâles et 19 femelles) et 10 œufs clairs (non fécondés) en J-5 à la fréquence de 2.5 GHz (cf. Figure 130). Plus précisément nous obtenons un contraste de 2.3 dB pour le module du coefficient de réflexion étant significativement supérieure aux écart-types des œufs fécondés et clairs (cf. Tableau 19).

A noter que à ce stade (J-5) de développement embryonnaire le contraste mâle-femelle n'est pas significatif.

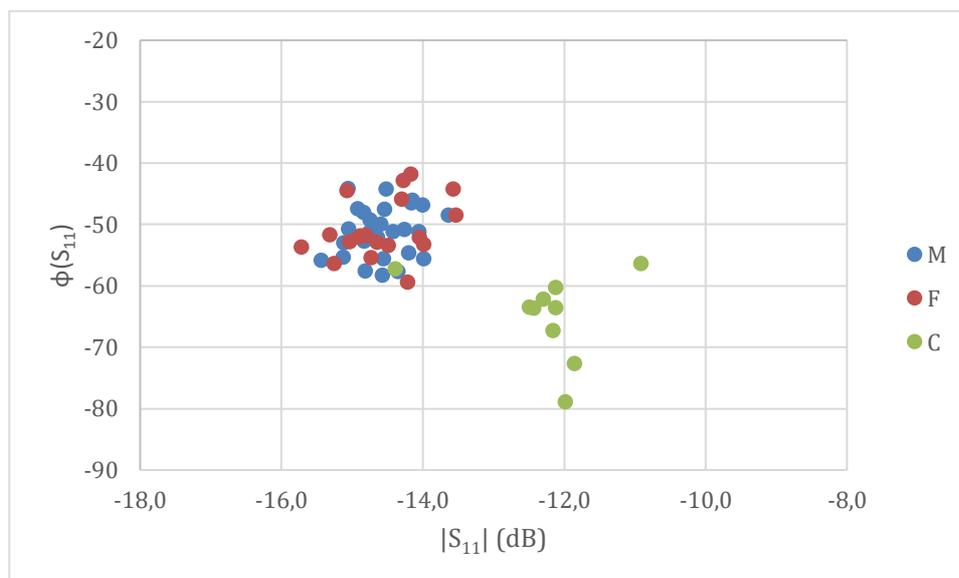


Figure 130 œufs Fécondes (M et F) et non-fécondes (C) en J-5 à 2.5 GHz

	$ S_{11} $ (dB)	$\Phi(S_{11})^\circ$
$\sigma$ (Fécondes)	0.41	3.62
$\sigma$ (Clairs)	0.50	5.04
$ \Delta_{\overline{Fec.} - \overline{C}} $	2.3	13.6

Tableau 19 Ecart-types et contraste des œufs fécondés et clairs (non fécondés) à 2.5 GHz

Ce résultat est intéressant car il démontre les potentialités du banc non-invasif de spectroscopie RF pour la détection des œufs non-fécondés à un stade précoce de développement embryonnaire (16% du processus total d'incubation).

## V. ANALYSE DES RESULTATS ET PERSPECTIVES

Afin de cibler l'embryon dans l'œuf, nous avons utilisé un support mécanique conçu originalement pour mesurer un œuf vertical en l'adaptant à la mesure horizontale des œufs. Cette solution n'a pas permis une discrimination mâle femelle due en partie à la répétabilité due au positionnement de l'œuf entre les capteurs. En conclusion l'analyse non invasive des œufs nécessite un support mécanique adapté qui assure la position horizontale de l'œuf et un contact œuf-capteur (encore plus) répétable. De plus, des capteurs plus adaptés à la géométrie de l'œuf peuvent jouer un rôle important dans la répétabilité de la mesure.

D'autre part, la dispersion intrinsèque entre les œufs du même sexe reste élevée. Cette dispersion est liée aux conditions d'incubation et origines des œufs. Afin d'avoir une homogénéité des œufs, nous avons choisi des œufs du même lot (même canne pondeuse) et nous avons réalisé les processus d'incubation de façon contrôlée au LAAS-CNRS. Nonobstant ces précautions, les groupes d'œufs mesurés présentent des différences en taille et poids ainsi que différences de développement entre les embryons (taille et poids). Une étude parallèle est actuellement en cours de réalisation par la société partenaire de ce projet, Ovalie Innovation, afin d'identifier les paramètres d'incubation qui jouent un rôle dans l'homogénéité d'un groupe d'œufs. Ceci nous permettra dans un futur proche d'avoir un groupe d'œuf plus homogène nous permettant de mieux cibler le contraste mâle-femelle.

Concernant le système d'illumination RF (capteurs et support mécanique) nous avons conçu un capteur souple pouvant s'adapter à la forme d'un œuf afin d'améliorer le contact œuf capteur. Pour cela nous avons utilisé le même principe de conception utilisé pour les versions précédentes du capteur. En utilisant le logiciel de simulation électromagnétique HFSS nous avons étudié les performances de ce nouveau capteur avant sa fabrication.

### V.1.1. Conception des capteurs souples C3

Nous avons utilisé le même principe de capteur à deux couches, dont l'énergie électromagnétique est rayonnée par un disque métallique sur dans la face avant du capteur. La face arrière contient une ligne de transmission (micro ruban) permettant de propager les ondes électromagnétiques vers le disque central (zone de contact avec l'œuf). La Figure 131 montre le schéma des capteurs avec leurs dimensions. Le substrat utilisé, permettant le caractère flexible du capteur, est du kapton avec une

épaisseur de 125  $\mu\text{m}$ , une permittivité relative de  $\epsilon_r=3,2$  et une tangente de pertes de  $\tan(\delta)=0,03$ .

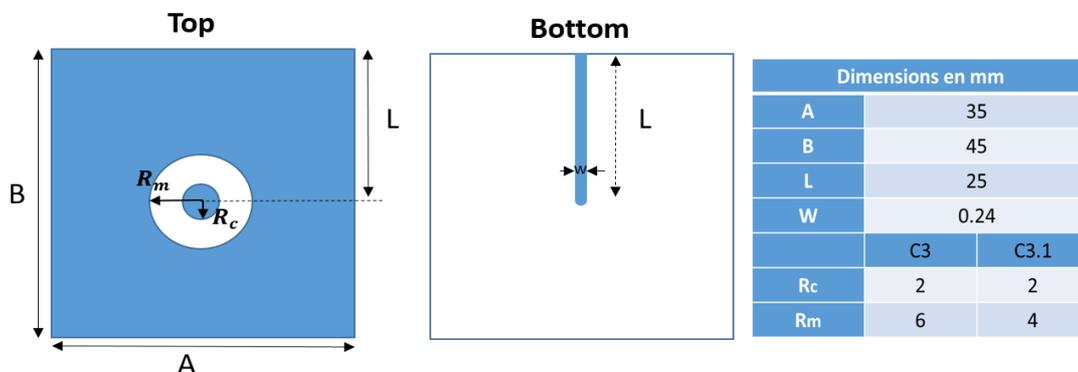


Figure 131 dimensions capteurs souples C3

Due à l'épaisseur du substrat nous avons diminué considérablement la largeur de la ligne d'accès ( $w$ ) pour avoir une impédance caractéristique de 50 ohms. Par conséquence nous avons ainsi diminué le rayon des cercles conductrice  $R_c$  et du plan de masse  $R_m$  cependant, nous avons conservé la taille du gap ( $R_m - R_c$ ) du 4 mm pour le capteur à grand gap et du 2 mm pour le capteur à petit gap.

Pour évaluer la propagation des ondes dans l'œuf, nous avons simulé sur HFSS l'ensemble œuf-capteur. L'œuf est modélisé par une coquille de 0.4 mm d'épaisseur et remplis d'eau. Pour prendre compte de la flexibilité du capteur dans la simulation, nous avons assumé que la totalité du capteur est en contact avec la coquille. Pour cela nous avons alors modélisé l'œuf avec une géométrie plane (cf Figure 132).

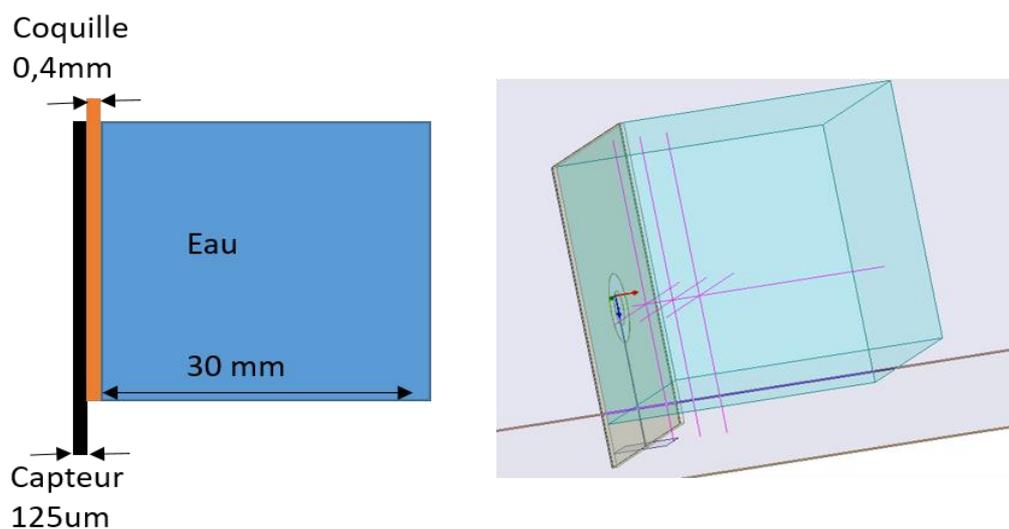


Figure 132 simulation du capteur et modèle d'œuf sur HFSS

Comme pour les simulations faites pour le capteur C2 nous avons défini trois axes à l'intérieur de l'œuf centrés dans le disque métallique du capteur. Ensuite nous avons simulé l'intensité du champ pour chaque axe.

Les coefficients de réflexion des capteurs à grand et petit gap en contact avec l'œuf simulés sur HFSS sont montrés à la Figure 133.

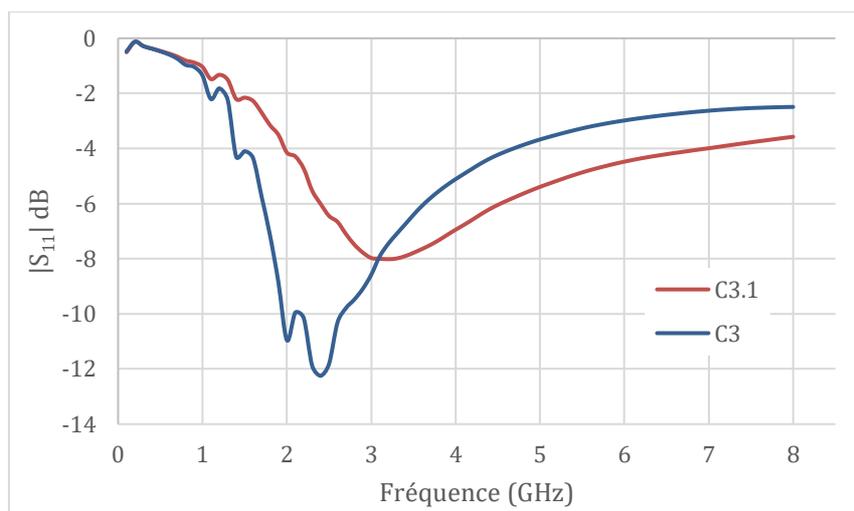


Figure 133 spectre du module de réflexion  $|S_{11}|$ , capteurs souples C3 (grande gap) et C3.1 (petit gap)

L'intensité du champ électrique  $|E|$  en fonction de l'axe x est montré à la Figure 134 pour le capteur à grand gap. Nous observons une plus forte pénétration des ondes entre 2 et 3 GHz, d'environ 9 mm en considérant 300 v/m comme la valeur minimale d'intensité du champ. La Figure 135 montre l'intensité du champ électrique en fonction de l'axe y dont nous observons une fenêtre de détection horizontale d'environ 15 mm à 2GHz et de 10 mm à 3 GHz.

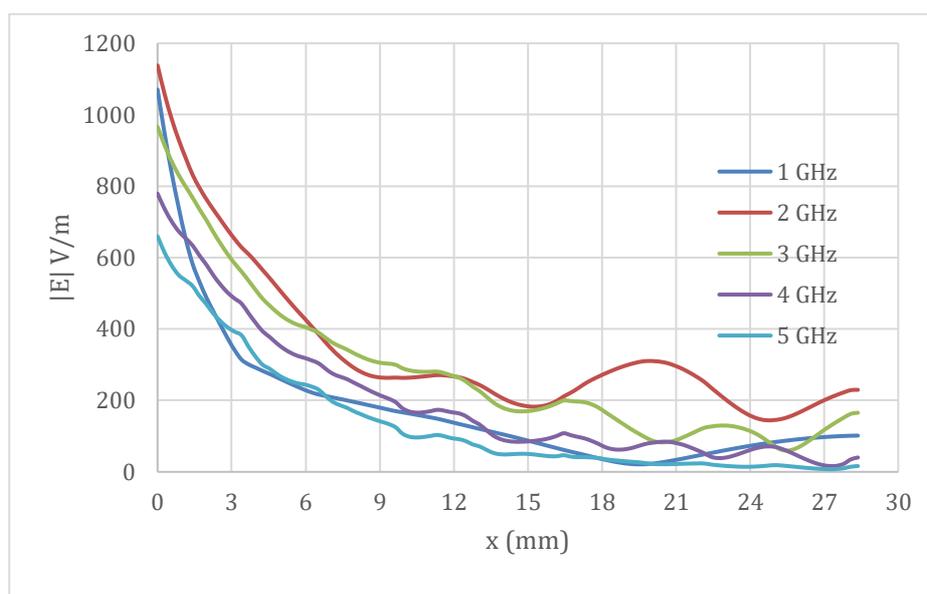


Figure 134 Intensité du champ électrique en fonction de l'axe x (profondeur de détection) aux différentes fréquences

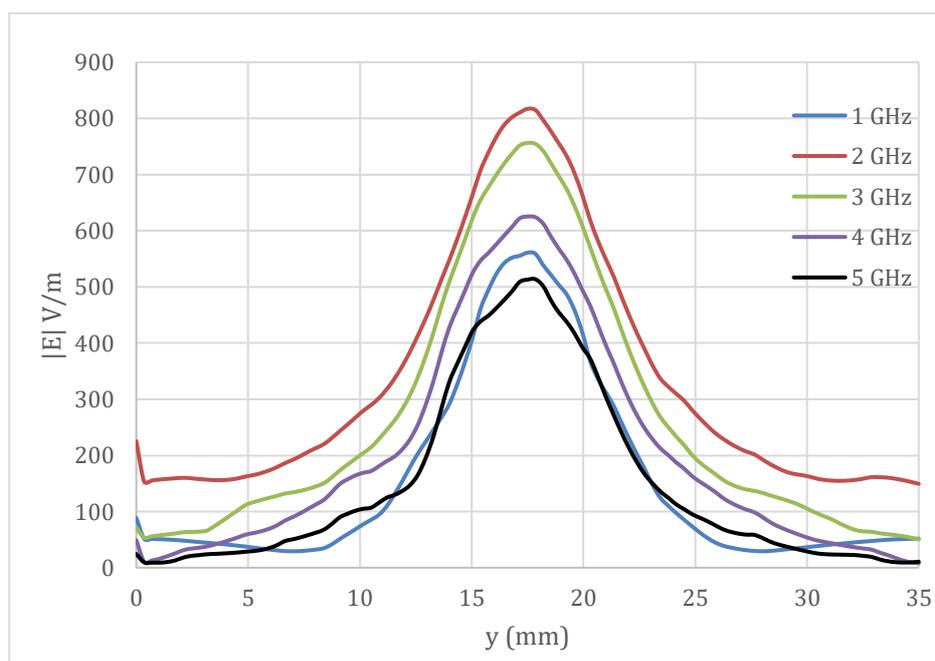


Figure 135 intensité du champ électrique en fonction de l'axe y (fenêtre de détection horizontale) aux différentes fréquences.

Les caractéristiques de ce capteur sont, en général, similaires aux capteurs précédents, sauf pour la profondeur des ondes dans l'œuf se présentant 3 mm inférieure au capteur C2. L'aspect innovant ici, est son caractère flexible qui permettra d'avoir un contact œuf plus répétable.

### V.1.2. Conception d'un support mécanique œuf capteurs

Depuis, nous avons conçu à l'atelier mécanique du laboratoire un premier prototype du support mécanique « amélioré » destiné à la mesure horizontale des œufs en utilisant des capteurs souples comme montré dans la photo de la Figure 136. Nous avons conservé le principe : le capteur 2, en réception, reste statique tandis que le capteur 1, en réflexion (du côté de l'embryon), est mobile. Ceci nous permettra de placer l'œuf au milieu des capteurs et qui déformera par pression les capteurs en s'adaptant à la forme de l'œuf.

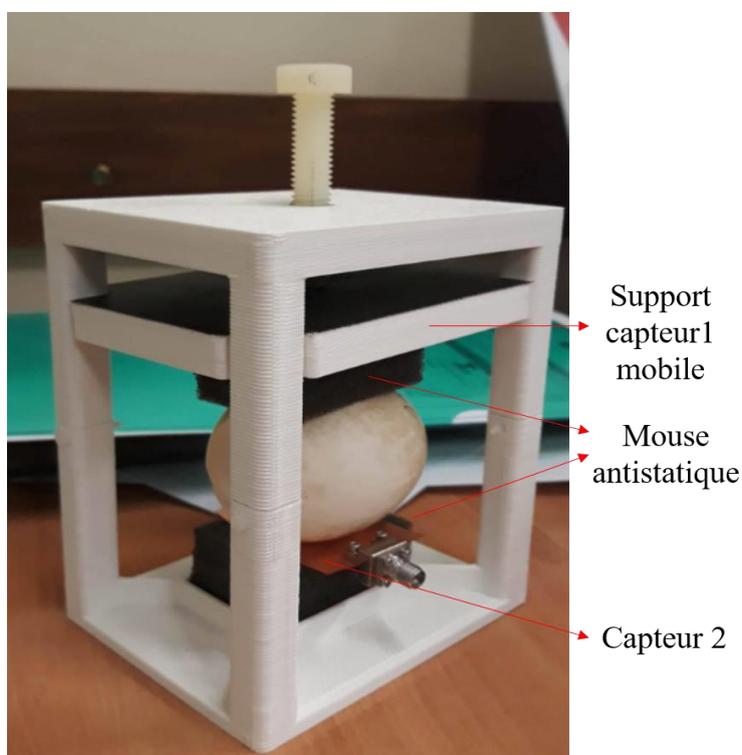


Figure 136 support mécanique capteurs souples et œuf

La conception des capteurs souples et de la dernière version du support mécanique correspondent aux derniers travaux réalisés dans le cadre de mon projet doctoral. Les premiers tests nous permettant d'évaluer expérimentalement le nouveau banc de spectroscopie RF des œufs n'ont pas encore eu lieu au moment de la rédaction de ce manuscrit.

## VI. CONCLUSION

Dans ce chapitre de thèse, nous avons développé des méthodes nous permettant de concevoir des capteurs dédiés spécialement à la spectroscopie RF des œufs. Pour la conception des capteurs nous avons utilisés des outils de simulation électromagnétiques basés sur la géométrie et matériaux du capteur. De plus nous avons aussi utilisé des outils de simulation électrique en définissant un circuit équivalent. Ces simulations nous ont permis d'optimiser différentes versions de capteurs. Nous avons validé ces différentes simulations en fabriquant et mesurant ces capteurs. Nous avons conduit différentes itérations entre conception, simulation, fabrication et caractérisation en laboratoire, pour aboutir les différentes versions des capteurs présentés dans ce chapitre.

Par ailleurs, un montage expérimental a été mis en place nous permettant d'évaluer la sensibilité des capteurs pour la mesure d'un œuf. Puis, nous avons validé cette procédure en utilisant des outils de simulation électromagnétique.

Ensuite nous avons réalisé différentes campagnes de mesures de sexage des œufs. Celles-ci nous ont permis de mettre en place des procédures afin de mesurer la zone de l'œuf susceptible d'être le siège de la discrimination sexuelle : l'embryon. Les différentes campagnes de mesures nous ont amenés à développer une approche de plus en plus fine tant sur la préparation des échantillons que sur la mesure. Nous avons notamment trouvé des résultats intéressants pour des œufs au huitième jours d'incubation. Bien qu'encourageant, nos résultats expérimentaux ne nous permettent pas encore de, significativement, détecter le genre d'un œuf par spectroscopie RF non-invasive. En revanche, nous avons obtenu une excellente discrimination des œufs non fécondes au 5ème jour d'incubation correspondant au 16% du processus total d'incubation.

Enfin, nous avons proposé une nouvelle version du banc de spectroscopie RF intégrant des capteurs flexibles plus adaptés à la géométrie de l'œuf avec laquelle des avancées suffisantes nous permettrait de conclure sur le potentiel du sexage par spectroscopie RF.

## CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES

L'objectif principal de ce travail de thèse était de développer des instrumentations radiofréquences (RF) dédiées d'une part à l'étude des liquides constituants des œufs et d'autre part à la mise en place d'un système de spectroscopie non invasif des œufs. En particulier, nous avons abordé la problématique du sexage des œufs, afin d'éviter la pratique de broyage des cannetons et poussins dans les couvoirs industriels.

Nous avons d'abord étudié l'état de l'art des techniques existantes pour le sexage des œufs, elles sont majoritairement basées sur des techniques optiques et biochimiques. La plupart utilisent des méthodes invasives car elles requièrent l'ouverture de l'œuf ou bien le prélèvement d'un liquide, ou encore des modifications génétiques. Même si ces techniques permettent l'identification du sexe d'un embryon d'incubation avec un taux de réussite supérieure à 90%, leur caractère invasif rend ces techniques peu efficaces pour une application à grande échelle.

Concernant les techniques RF, jusqu'à présent elles n'ont pas été appliquées au sexage des œufs. Toutefois, elles ont été utilisées pour l'analyse de la fraîcheur des œufs de consommation. Ces études ont confirmé la sensibilité des ondes RF à l'analyse des indices de qualité des œufs tels que : le temps de stockage, la taille de la poche d'air, l'indice de jaune et la hauteur du blanc. Ces indices sont liés à la teneur en eau et au contenu protéique de l'œuf.

Dans ce contexte nous avons alors proposé d'évaluer et donc de développer la technique de spectroscopie RF pour le sexage des œufs, grâce notamment à son caractère non invasif, mais aussi grâce à sa sensibilité au contenu biochimique des œufs, à sa rapidité de mesure, et aux faibles coûts de fabrication en comparaison avec les techniques optiques. Cette technique de sexage est alors apte pour une application en grande échelle.

Nous avons divisé le travail de recherche en deux axes : un premier dédié au développement d'une instrumentation RF pour l'analyse des différents liquides constituants les œufs fécondés (sexage ex-ovo). Pour cela nous avons alors conçu un dispositif de spectroscopie RF milli-fluidique nous permettant de mesurer les propriétés diélectriques des liquides à partir d'un échantillon d'un volume de 1.3 ml. Nous avons mesuré les propriétés diélectriques de liquides modèles tels que ; l'eau, l'éthanol, et des solutions de BSA à différentes concentrations, nous permettant de valider le dispositif.

Nous avons ensuite analysé différents liquides contenus dans les œufs en mettant en place des protocoles de conditionnement des échantillons ainsi que des protocoles fluidiques adaptés à de tels liquides visqueux et attachants. Les premiers résultats obtenus nous ont permis d'identifier certaines pistes pour le sexage des œufs (ex ovo) tel que le jaune pour des œufs en J-12, avec une forte discrimination entre œufs clairs (non-fécondés) et œufs fécondés. Cependant, en mesurant un nombre plus important d'œufs les résultats obtenus montrent une forte dispersion sans possibilité de confirmer une telle différenciation mâle/femelle à partir de la permittivité effective mesurée.

Finalement nous avons proposé une étape supplémentaire de calibrage du dispositif avec des liquides modèles nous permettant d'obtenir la permittivité d'un liquide à partir de sa permittivité effective mesurée.

Le deuxième axe de recherche a été focalisé sur l'analyse non-invasive pour le sexage des œufs (in ovo). Pour ce faire nous avons conçu un système d'illumination nous permettant de sonder un œuf par ondes RF. Une première partie de ce travail a été alors dédiée à la conception des capteurs RF en utilisant des simulations électromagnétiques basées sur la géométrie et sur les matériaux du capteur et des simulations électriques basées sur leur schéma électrique équivalent. Ces deux méthodes nous ont permis de concevoir et d'optimiser les capteurs. Ce processus a été finalement validé par la fabrication et par la mesure en laboratoire des capteurs.

De plus, un banc expérimental a été mis en place afin d'évaluer la sensibilité des capteurs face à un œuf. Il est composé d'une coquille d'œuf remplie d'eau et d'un perturbateur métallique que l'on place à l'intérieur grâce à un bras métallique à 3 axes. Cette méthode a été validée par simulation électromagnétique.

Postérieurement, nous avons fait des campagnes de mesures dédiées au sexage des œufs, en focalisant les ondes RF dans la zone où se trouve l'embryon. Nous avons observé un contraste mâle/femelle visible, pour des œufs en J-8. Cependant, sur un nombre élevé d'œufs nous trouvons aussi une forte dispersion sans possibilité de confirmer cette piste de sexage. De plus, nous avons fait une campagne de mesure destinée à la détection des œufs clairs (non fécondés) obtenant une forte discrimination entre œufs fécondés et œufs clairs à un stade précoce de développement embryonnaire (J-5).

Dans la dernière partie de ce travail, nous avons conçu des capteurs flexibles pouvant s'adapter à la forme de l'œuf afin d'améliorer le contact capteur-œuf.

Ce travail de thèse a été focalisé sur la conception d'une instrumentation RF dédié au sexage précoce des œufs. Nous avons fait des premières campagnes de mesures sur œufs nous permettant d'identifier les enjeux techniques concernés ainsi que des pistes possibles pour le sexage. Le dispositif de spectroscopie RF milli-fluidique conçu dans ce travail de thèse a fait l'objet d'une publication scientifique internationale, et le banc de spectroscopie RF non-invasif des œufs a fait l'objet d'un brevet français.

## **Perspectives**

A la fin de ce travail de thèse des questions restent ouvertes concernant la source dans l'œuf qui contient l'information nous permettant de différencier un œuf mâle d'un œuf femelle. Même si nous avons trouvé des pistes possibles de sexage, elles n'ont pas été confirmées. Il serait alors intéressant de faire, parallèlement aux mesures RF, des analyses biochimiques des œufs fécondés à différents stades de développement embryonnaire, en mesurant la teneur en eau et le contenu protéique, entre autres, des constituants extra-embryonnaires de l'œuf mais aussi des analyses biochimiques des embryons qui ont aussi été signalé comme possible source de sexage dans ce travail de thèse.

De plus, à l'issue des résultats obtenus nous avons observé que la dispersion intrinsèque entre œufs joue négativement sur le contraste mâle/femelle. Il serait alors utile de travailler sur l'homogénéité des œufs en incubation de façon à diminuer la dispersion intrinsèque des œufs et ainsi maximiser le contraste mâle/femelle. Des études préliminaires ont été déjà faites à ce sujet pendant le déroulement de ma thèse, montrant effectivement cette forte dispersion entre œufs ayant les mêmes conditions d'incubation.

Le traitement des données n'a pas été finalisé dans ce travail de thèse, il serait intéressant dans le futur de travailler sur un logiciel de classification mâle/femelle en utilisant des méthodes statistiques basées sur des réseaux neuronaux et prenant en compte tous les paramètres mesurés dans un spectre large en fréquence.

Le sexage des œufs constitue une problématique interdisciplinaire dont ce travail de thèse a contribué en proposant la technique de la spectroscopie radiofréquence. Nous avons développé alors une instrumentation dédiée à ce sujet. Concernant le sexage nous avons démarré des premiers tests nous permettant d'identifier les enjeux techniques concernés. A la fin de cette thèse un autre projet de recherche dédié au sexage des œufs de poule a été démarré en utilisant les méthodes et l'instrumentation présentées dans cette thèse.

## VII. ANNEXES

### VII.1. RAPPEL SUR L'UTILISATION DES MATRICES S ET T

Dans la pratique, il est difficile de mesurer directement les tensions et les courants sur des circuits radiofréquences. Ces mesures impliquent de prendre en compte la magnitude et la phase d'une onde se propageant dans une direction (Pozar 2006). Une représentation, en fonction des ondes réfléchies et transmises, est donnée par les matrices S et T, (décrites ci-dessous). Cette représentation est plus utile au moment de caractériser les dispositifs RF. Nous avons ainsi utilisé ces matrices pour l'analyse RF des liquides de l'œuf, ainsi que pour l'étude non-invasive de l'œuf (décrit dans le chapitre 3).

#### VII.1.1. Matrice S

En radiofréquences, il est préférable de décrire une ligne de transmission, un composant, ou un réseau RF en fonction des *ondes* entrantes et sortantes. Par exemple pour un réseau à deux ports ( $P_1$  et  $P_2$ ), tels qu'une ligne de transmission de longueur  $l_i$  et d'impédance caractéristique  $z_c$ , les ondes entrantes  $a_i$  et sortantes  $b_i$  sont montrées dans la Figure 137 :

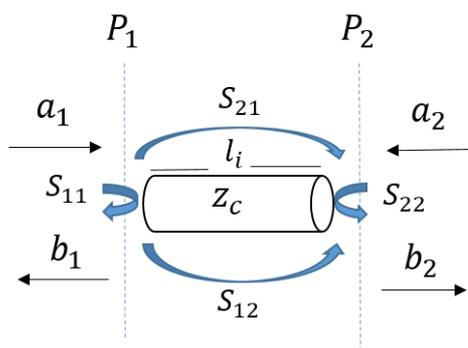


Figure 137 schéma d'une ligne de transmission et des paramètres S

On peut exprimer les ondes sortantes  $b_i$  en fonction des ondes entrantes  $a_i$ , en utilisant la matrice des paramètres S comme suit :

$$\begin{bmatrix} b_1 \\ b_2 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} S_{11} & S_{12} \\ S_{21} & S_{22} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} a_1 \\ a_2 \end{bmatrix}$$

La matrice S est très utile pour décrire un dispositif RF de n-ports en fonction des ondes. Un analyseur de réseau vectoriel (ARV) permet la mesure de ces paramètres. Cependant les paramètres S ne sont pas utiles pour caractériser un réseau composé pour n dispositifs de 2-ports configuré en cascade. Dans ce cas, il est plus convenant d'utiliser la matrice de transfert T (Caspers, McIntosh, et Kroyer, s. d.).

### VII.1.2. Matrice de transfert T

La matrice de transfert permet d'exprimer les ondes dans l'entrée ( $P_1$ ) du dispositif en fonction des ondes en sortie ( $P_2$ ) de dispositif comme suit :

$$\begin{bmatrix} b_1 \\ a_1 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} T_{11} & T_{12} \\ T_{21} & T_{22} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} b_2 \\ a_2 \end{bmatrix}$$

Une ligne de transmission  $L_i$ , avec des connecteurs en entrée  $c_e$  et sortie  $c_s$ , constitue système en cascade comme le montre la Figure 138 :

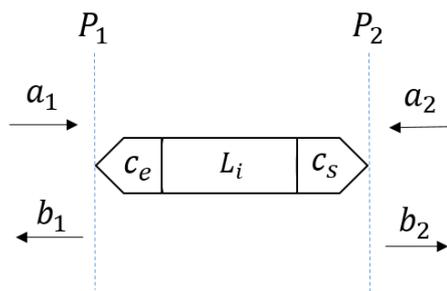


Figure 138 Schéma d'une ligne de transmission avec des connecteurs en entrée et en sortie

La matrice de transfert du système complet T est composée de la multiplication des matrices de transfert de chaque élément en cascade comme suit :

$$T = T_{c_e} T_{L_i} T_{c_s}$$

Nous pouvons obtenir les éléments d'une matrice T à partir de la matrice S pour un dispositif de deux ports comme montré ci-dessous :

$$T_{11} = S_{12} - \frac{S_{22}S_{11}}{S_{21}}$$

$$T_{12} = \frac{S_{11}}{S_{21}}$$

$$T_{21} = \frac{S_{22}}{S_{21}}$$

$$T_{22} = \frac{1}{S_{21}}$$

La matrice T a été utilisée dans le calcul qui nous a permis d'extraire la permittivité d'un liquide. Cependant pour les mesures RF nous utilisons un analyseur vectoriel de réseau (ARV) permettant d'obtenir la matrice S en fonction de la fréquence. Il est donc nécessaire d'obtenir la matrice T à partir de la matrice S grâce aux équations décrites ci-dessus.







## VIII. BIBLIOGRAPHIE

- Agreste, Direction générale des douanes et droits indirects (DGDDI). 2019. « Eclotions et mises en place de poussins, abattages, poids moyens, solde des échanges extérieurs - Agreste-Saiku ». 2019. [https://agreste.agriculture.gouv.fr/agreste-saiku/?plugin=true&query=query/open/D\\_0009#query/open/D\\_0009](https://agreste.agriculture.gouv.fr/agreste-saiku/?plugin=true&query=query/open/D_0009#query/open/D_0009).
- Angelopoulos, Evangelos S, Argiris Z Anastopoulos, Dimitra I Kaklamani, Antonis A Alexandridis, Fotis Lazarakis, et Kostas Dangakis. 2006. « Circular and elliptical CPW-fed slot and microstrip-fed antennas for ultrawideband applications ». *IEEE Antennas and Wireless Propagation Letters* 5: 294-97.
- Artis, François. 2014. « Spectroscopie diélectrique hyperfréquence pour l'analyse cellulaire: pertinence pour l'évaluation de l'efficacité d'agents anti-cancéreux ». Université Toulouse III Paul Sabatier.
- Aslam, M Aamir, Marcel Hulst, Rita AH Hoving-Bolink, Mari A Smits, Bonnie de Vries, Ilse Weites, Ton GG Groothuis, et Henri Woelders. 2013. « Yolk concentrations of hormones and glucose and egg weight and egg dimensions in unincubated chicken eggs, in relation to egg sex and hen body weight ». *General and comparative endocrinology* 187: 15-22.
- Ates, Kayhan, Sukru Ozen, et H. Feza Carlak. 2017. « The freshness analysis of an apple and a potato using dielectric properties at the microwave frequency region ». In *Progress In Electromagnetics Research Symposium-Spring (PIERS), 2017*, 1688-93. IEEE.
- Baggott, GK. 2001. « Development of extra-embryonic membranes and fluid compartments In: Perspectives in Fertilisation and Embryonic Development in Poultry ». In .
- Bianco, B, et M Parodi. 1976. « Determination of the propagation constant of uniform microstrip lines ». *Alta Frequenza* 45: 107-10.
- Booth, James C, Nathan D Orloff, Jordi Mateu, Michael Janezic, Matthew Rinehart, et James A Beall. 2010. « Quantitative permittivity measurements of nanoliter liquid volumes in microfluidic channels to 40 GHz ». *IEEE Transactions on Instrumentation and Measurement* 59 (12): 3279-88.
- Brodie, Graham, Mohan V Jacob, et Peter Farrell. 2016. *Microwave and Radio-Frequency Technologies in Agriculture: an introduction for agriculturalists and engineers*. Walter de Gruyter GmbH & Co KG.
- Brun, J, MM Richard, C Marie-Etancelin, R Rouvier, et C Larzul. 2005. « Le canard mulard: déterminisme génétique d'un hybride intergénérique ». *PRODUCTIONS ANIMALES-PARIS-INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE*- 18 (5): 295.
- Buckley, Floyd. 1958. « Tables of dielectric dispersion data for pure liquids and dilute solutions ». *Natl. Bur. Stand. Circ.* 589: 7-8.
- Caspers, Fritz, Peter McIntosh, et Tom Kroyer. s. d. « RF Engineering Basic Concepts ». *S-Parameters, CAS, Aarhus, June-2010*: <https://cas.web.cern.ch/cas/UK-2007/Afternoon> 20.
- Close, Bryony, Keith Banister, Vera Baumans, Eva-Maria Bernoth, Niall Bromage, John Bunyan, Wolff Erhardt, Paul Flecknell, Neville Gregory, et Hansjoachim Hackbarth. 1997. « Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 2 ». *Laboratory animals* 31 (1): 1-32.
- Cornuez, A., et B. Pain. 2015. « Morphometric comparisons of embryonic development of common, Muscovy and Mule duck [Conference poster]. » *Actes des 11èmes*

*Journées de la Recherche Avicole et Palmipèdes à Foie Gras, Tours, France, les 25 et 26 mars 2015*, 429-33.

- Crawford, Roy D. « Poultry breeding and genetics ». *Developments in animal and veterinary sciences*. Elsevier 1990.
- Da Silva, Mylène. 2017. « Les liquides amniotique et allantoïque de l'oeuf de poule : caractérisation et rôles dans la protection de l'embryon au cours du développement ». Université François-Rabelais de Tours.
- Ellendorf, F, et Klein, S. 2003. « Avian sex determination and sex diagnosis ». *World's Poultry Science Journal* 59 (1): 5-6. <https://doi.org/10.1079/WPS20030002>.
- Ellison, WJ. 2007. « Permittivity of pure water, at standard atmospheric pressure, over the frequency range 0–25 THz and the temperature range 0–100 C ». *Journal of physical and chemical reference data* 36 (1): 1-18.
- Facer, GR, Daniel A Notterman, et LL Sohn. 2001. « Dielectric spectroscopy for bioanalysis: From 40 Hz to 26.5 GHz in a microfabricated wave guide ». *Applied Physics Letters* 78 (7): 996-98.
- Faucheron, Georges. 1970. « Détermination de la permittivité complexe d'échantillons diélectriques insérés dans des guides d'onde ». In , 25:248-58. Springer.
- Freeman, B. M., et Margaret A. Vince. 1974. *Development of the avian embryo: a behavioural and physiological study*. London, New York: Chapman and Hall; Wiley.
- Funk, EM. 1948. « The relation of the yolk index determined in natural position to the yolk index as determined after separating the yolk from the albumen ». *Poultry Science* 27 (3): 367-367.
- Galli, Roberta, Grit Preusse, Ortrud Uckermann, Thomas Bartels, Maria-Elisabeth Krautwald-Junghanns, Edmund Koch, et Gerald Steiner. 2016a. « In ovo sexing of chicken eggs by fluorescence spectroscopy ». *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 1-10.
- Göhler, Doreen, Björn Fischer, et Sven Meissner. 2016. « In-ovo sexing of 14-day-old chicken embryos by pattern analysis in hyperspectral images (VIS/NIR spectra): A non-destructive method for layer lines with gender-specific down feather color ». *Poultry Science*, pew282.
- Gourmaud, Benoît, Bernard Alletru, Jean Christian, et Bertrand Pain. 2014. Use of the slc45a2 gene for identifying a population of palmipeds. WO 2013/088023 Al, issued 2014.
- Govoroun, Marina, et Jean-Pierre Brillard. 2004. « Sex-ratio chez les oiseaux sauvages et domestiques ». *Productions Animales* 5 (17), 365-372.(2004).
- Grenier, Katia, David Dubuc, Paul-Emile Poleni, Momoko Kumemura, Hiroshi Toshiyoshi, Teruo Fujii, et Hiroyuki Fujita. 2009. « Integrated broadband microwave and microfluidic sensor dedicated to bioengineering ». *IEEE Transactions on microwave theory and techniques* 57 (12): 3246-53.
- Haugh, RR. 1937. « A new method for determining the quality of an egg ». *US Egg Poultry* 39: 27-49.
- Hussain, Abid. 2009. « Dielectric properties and microwave assisted separation of eggshell and membrane ». Thesis of Master of Science, McGill University Quebec, Canada.
- ITAVI, Service Economie. 2016. « Situation de la production et du marché des oeufs et des ovoproduits Bilan 2015 », 2016.
- ITAVI, Service Economique. 2014. « Situation de la production et du marché du foie gras », 2014.

- Jaque Gonzalez, Patricio, David Dubuc, Katia Grenier, et T Veronese. 2019. « Millifluidic Sensor Dedicated to the Microwave Dielectric Spectroscopy of Liquids ». In , 204-7. IEEE-EuMC 2019.
- Ji, Gang, Xueguan Liu, Huiping Guo, Ying Wang, et Liang Yang. 2010. « Study of water-injected pork and pork freshness using microwave techniques ». In *Antennas Propagation and EM Theory (ISAPE), 2010 9th International Symposium on*, 614-17. IEEE.
- Kalet, EF, et T Redmann. 2008. « Approaches to determine the sex prior to and after incubation of chicken eggs and of day-old chicks ». *World's poultry science journal* 64 (3): 391-99.
- Klein, S, M Rokitta, U Baulain, J Thielebein, A Haase, et F Ellendorff. 2002. « Localization of the fertilized germinal disc in the chicken egg before incubation ». *Poultry science* 81 (4): 529-36.
- Knepper, Paul, Matthew O'hayer, Jonathan Hoopes, et Eran Gabbai. 2019. « System and method for in ovo sexing of avian embryos ». WO201823105A1
- Kupfer, Klaus. 2006. *Electromagnetic aquametry: Electromagnetic wave interaction with water and moist substances*. Springer Science & Business Media.
- Li-Chan, E. 1989. « Biochemical basis for the properties of egg white ». *CRC Crit. Rev. Poultry Biol.* 2: 21-58.
- Li-Chan, Eunice CY, et Hyun-Ock Kim. 2008. « Structure and chemical composition of eggs ». In *Egg bioscience and biotechnology*, 1-96. John Wiley and Sons Inc., New Jersey.
- Liu, Song, Nathan D Orloff, Charles AE Little, Wei Zhao, James C Booth, Dylan F Williams, Ilja Ocket, Dominique MM-P Schreurs, et Bart Nauwelaers. 2017. « Hybrid characterization of nanolitre dielectric fluids in a single microfluidic channel up to 110 GHz ». *IEEE Transactions on Microwave Theory and Techniques* 65 (12): 5063-73.
- Manickavasagan, A, DS Jayas, et NDG White. 2006. « Non-uniformity of surface temperatures of grain after microwave treatment in an industrial microwave dryer ». *Drying Technology* 24 (12): 1559-67.
- Nelson, Stuart O., Wenchuan Guo, et Samir Trabelsi. 2008. « Study of fruit permittivity measurements for quality detection ». In *Instrumentation and Measurement Technology Conference Proceedings, 2008. IMTC 2008. IEEE*, 1009-11. IEEE.
- Nelson, Stuart O., Wen-chuan Guo, Samir Trabelsi, et Stanley J. Kays. 2007. « Sensing quality of watermelons through dielectric permittivity ». In *Antennas and Propagation Society International Symposium, 2007 IEEE*, 285-88. IEEE.
- Nelson, Stuart O., Andrzej W. Kraszewski, Samir Trabelsi, et Kurt C. Lawrence. 1999. « Using cereal grain permittivity for quality sensing by moisture determination ». In *Instrumentation and Measurement Technology Conference, 1999. IMTC/99. Proceedings of the 16th IEEE*, 1:237-42. IEEE.
- Ning, Yaqing, Caroline Multari, Xi Luo, Cristiano Palego, Xuanhong Cheng, James CM Hwang, Agnese Denzi, Caterina Merla, Francesca Apollonio, et Micaela Liberti. 2014. « Broadband electrical detection of individual biological cells ». *IEEE Transactions on Microwave Theory and Techniques* 62 (9): 1905-11.
- Nys, Y, et N Guyot. 2011. « Egg formation and chemistry ». In *Improving the safety and quality of eggs and egg products*, 83-132. Elsevier.
- Offen, Daniel. 2019. « Methods for gender determination of avian embryos in unhatched eggs and means thereof », janvier.
- Patten, Bradley M. 1920. *Early embryology of the chick*. Wildside Press LLC.

- Petrie, Marion, Hubert Schwabl, Nanna Brande-Lavridsen, et Terry Burke. 2001. « Sex differences in avian yolk hormone levels ». *Nature* 412 (6846): 498-498.
- Pozar, David M. 2006. *Microwave Engineering 3e*. Wiley.
- Qasimi, Mohammad Ibrahim, Hadi Mohibbi, Kentaro Nagaoka, et Gen Watanabe. 2018. « Accumulation of steroid hormones in the eggshells of Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) ». *General and comparative endocrinology* 259: 161-64.
- Ragni, L., A. Al-Shami, A. Berardinelli, G. Mikhaylenko, et J. Tang. 2007. « Quality evaluation of shell eggs during storage using a dielectric technique ». *Transactions of the ASABE* 50 (4): 1331-40.
- Ragni, Luigi, Ali Al-Shami, Galina Mikhaylenko, et Juming Tang. 2007. « Dielectric characterization of hen eggs during storage ». *Journal of Food Engineering* 82 (4): 450-59.
- Ragni, Luigi, Annachiara Berardinelli, et Adriano Guarnieri. 2008. « A dielectric technique based on a one-chip network analyser to predict the quality indices of shell eggs ». *Biosystems engineering* 100 (4): 470-78.
- Ragni, Luigi, Chiara Cevoli, et Annachiara Berardinelli. 2010. « A waveguide technique for non-destructive determination of egg quality parameters ». *Journal of food engineering* 100 (2): 343-48.
- Redzwan, Syaiful, Mauricio D. Perez, Jacob Velander, et Robin Augustine. 2018. « Study of Maturity Fruit Assessment using Permittivity and Microwave Reflectivity Measurements for Quality Classification ». In *2018 IEEE Conference on Antenna Measurements & Applications (CAMA)*, 1-3. IEEE.
- Reyes, A., M. Yarlequé, W. Castro, et S. Chuquizuta. 2018. « Determination of Permittivity Values Using Microwave Dielectric Spectroscopy for Assessing Apple and Purple Sweet Potato Quality Parameters ». In *2018 International Conference on Electromagnetics in Advanced Applications (ICEAA)*, 593-96. IEEE.
- Romanoff, A.L. 1960. *The Avian Embryo*. Macmillan. <https://books.google.fr/books?id=k4hMDQEACAAJ>.
- Schwan, Herman P. 1994. « Electrical properties of tissues and cell suspensions: mechanisms and models ». In , 1:A70-71. IEEE.
- Setiady, D, J Tang, F Younce, BA Swanson, BA Rasco, et CD Clary. 2009. « Porosity, color, texture, and microscopic structure of russet potatoes dried using microwave vacuum, heated air, and freeze drying ». *Applied engineering in agriculture* 25 (5): 719-24.
- Simons, Rainee N. 2004. *Coplanar waveguide circuits, components, and systems*. Vol. 165. John Wiley & Sons.
- Steiner, Gerald, Thomas Bartels, Allison Stelling, Maria-Elisabeth Krautwald-Junghanns, Herbert Fuhrmann, Valdas Sablinskas, et Edmund Koch. 2011. « Gender determination of fertilized unincubated chicken eggs by infrared spectroscopic imaging ». *Analytical and bioanalytical chemistry* 400 (9): 2775-82.
- Stuchly, Maria A, Andrzej Kraszewski, Stanislaw S Stuchly, et Andrew M Smith. 1982. « Dielectric properties of animal tissues in vivo at radio and microwave frequencies: comparison between species ». *Physics in Medicine & Biology* 27 (7): 927.
- Trabelsi, Samir, Stuart O. Nelson, Deana R. Jones, et Wenchuan Guo. 2007. « Sensing Egg Quality during Storage by Radiofrequency Complex Permittivity Measurement ». In *Sensors, 2007 IEEE*, 1005-8. IEEE.
- Vélez, Paris, Lijuan Su, Katia Grenier, Javier Mata-Contreras, David Dubuc, et Ferran Martín. 2017. « Microwave microfluidic sensor based on a microstrip

- splitter/combiner configuration and split ring resonators (SRRs) for dielectric characterization of liquids ». *IEEE Sensors Journal* 17 (20): 6589-98.
- Verma, Urvashi. s. d. « Now You Can Count Your Chickens before They Hatch, Instead of Culling Them ». Consulté le 17 juin 2020. <https://www.timesofisrael.com/now-you-can-count-your-chickens-before-they-hatch-instead-of-culling-them/>.
- Weissmann, A., S. Reitemeier, A. Hahn, J. Gottschalk, et A. Einspanier. 2013. « Sexing domestic chicken before hatch: A new method for in ovo gender identification ». *Theriogenology* 80 (3): 199-205.
- Zedek, Amel, David Dubuc, et Katia Grenier. 2017. « Microwave permittivity extraction of individual biological cells submitted to different stimuli ». In , 865-68. IEEE.

