

Evaluation du niveau de stress du cheval en compétition et en milieu hospitalier

Mesures comportementales, physiologiques et
appréciation du tempérament



Prof. M. Vandenheede (ULg - Promoteur)
Prof. P. Poncin (ULg - Copromoteur)
Prof. J-P Thomé (ULg - Président)
Prof. D. Serteyn (ULg)
Prof. J-F Beckers (ULg)
Prof. F.O. Ödberg (UGent)
Dr L. Lansade (INRA)

Dissertation présentée par
MARIE PEETERS

En vue de l'obtention du grade de
Docteur en Sciences

FACULTÉ DES SCIENCES

Évaluation du niveau de stress du cheval en compétition et en milieu hospitalier

Mesures comportementales, physiologiques et
appréciation du tempérament



Thèse de doctorat en Sciences
Présentée par

MARIE PEETERS

Soutenue le 20 décembre 2011 à Liège

Thèse réalisée à la Faculté de Médecine
Vétérinaire de
l'Université de Liège (Belgique),
dans le Service d'Ethologie et
Bien-être des Animaux (FMV-ULg),
en collaboration avec l'Unité de Biologie
du Comportement
(Faculté des Sciences – ULg)

Thèse financée par le Fonds pour la
formation à la Recherche dans
l'Industrie et dans l'Agriculture

FRIA FNRS

Photos © Marie Peeters

Évaluation du niveau de stress du cheval en compétition et en milieu hospitalier

Mesures comportementales, physiologiques et
appréciation du tempérament



Thèse de doctorat en Sciences
Présentée par

MARIE PEETERS

Soutenue le 20 décembre 2011 à Liège

Table des matières

Prologue	7
Remerciements	9
Résumé	13
Abstract	17
Liste des publications	19
Introduction	23
1. Le concept de stress	25
2. Les éléments stressants	27
3. Les réponses au stress	28
4. Le coût biologique du stress et son impact sur le bien-être animal	29
5. Les facteurs influençant les réponses au stress	34
6. Le tempérament	38
7. La mesure du stress	46
8. La réponse comportementale au stress	50
9. La réponse neuroendocrine au stress	56
10. Les autres mesures du stress	72
11. Le stress et la compétition	73
12. Le stress en milieu hospitalier	79
13. Les objectifs de la thèse	80
Résultats et discussion	85
1. Validation de l'utilisation de la salive pour mesurer le taux de cortisol libre chez le cheval	87
2. Evaluation du niveau de stress en compétition	105
3. Evaluation du niveau de stress en clinique	141
Discussion générale, conclusions et perspectives	175
Abréviations utilisées	183
Tables et figures	185
Références	187

PROLOGUE



REMERCIEMENTS

Je tiens tout particulièrement à remercier le **Professeur Marc Vandenneede** qui n'a jamais cessé de m'encourager et de me soutenir. Il m'a aidé à préparer mon projet et m'a entourée tout au long de cette aventure. Il m'a toujours poussée à suivre les voies de recherche qui me tenaient à cœur. Ses capacités de rédaction m'ont particulièrement aidée. Son respect et sa compréhension m'ont permis d'évoluer de façon sereine durant toutes ces années.

Je tiens également à remercier le **Professeur Pascal Poncin** qui a toujours manifesté un grand intérêt à l'évolution de mes recherches, prodiguant conseils et encouragements.

Je tiens à remercier tous les membres du Service de Physiologie de la Reproduction (FMV – ULg) pour leur accueil et plus particulièrement le **Professeur Jean-François Beckers** pour son soutien et ses conseils lors de la rédaction des publications. Toute ma gratitude va également au **Docteur Joseph Sulon** qui m'a encadrée, pas à pas, lors des dosages radioimmunologiques. Son enseignement, sa rigueur, sa patience et sa disponibilité, même après son départ à la retraite, m'ont été une aide essentielle.

Je remercie le **Professeur Didier Serteyn** de m'avoir autorisé à effectuer mes recherches au sein du pôle équin de la Clinique Vétérinaire Universitaire (FMV – ULg). Je suis également extrêmement reconnaissante du soutien apporté par le personnel de la clinique, à savoir les Docteurs **Denis Verwilghen, Charlotte Sandersen** et **Fabrice Péters**. Je tiens également à remercier chaleureusement **Marc Coninx, Catherine Strauven** et **Sylvie Mathonet** pour leur aide. Je remercie également **Jean Clément Bustin** du Centre de Médecine Sportive (CeMeSPo – FMV – ULg).

Je remercie le **Professeur Baudouin Nicks, Aurélia Zizo, Edwin Dawans, et les Docteurs, Jean-François Cabaraux et François-Xavier Philippe** pour le matériel et les locaux mis à ma disposition ainsi que pour leur accueil chaleureux au sein du service d'Ecologie et Ethologie Vétérinaire.

Ce travail ne serait rien sans l'aide précieuse en statistique du Professeur **Frédéric Farnir** et de Messieurs les Docteurs **Didier Ledoux** et **Laurent Massart**.

Je tiens également à remercier le **Professeur Marie-Claude Huynen**, membre du comité de lecture, pour ses nombreux conseils lors des séminaires organisés par l'Unité de Biologie du Comportement de la Faculté des Sciences (ULg).

Je remercie Mesdames **Christiane** et **Anne Duchêne** de l'Ecole Provinciale d'Elevage et d'Equitation de Gesves (EPEEG) pour nous avoir autorisés à suivre les couples cavaliers/chevaux au repos et en concours. Je remercie également **les élèves** pour leur accueil et leur enthousiasme envers nos recherches, ainsi que les **éleveurs et propriétaires**, qui nous ont permis d'observer leurs chevaux et qui ont accepté de répondre à nos questionnaires.

Je remercie toutes les personnes de mon entourage qui m'ont aidée lors des expérimentations : **Sarah Gabriel, Coline Closson, Sandra Godfroid, Laëtitia Nyssen**, ainsi que **Julie Désirant** pour le temps passé à améliorer l'anglais de nos publications et **Sophie Bricteux**, pour les relectures minutieuses et les corrections apportées à mes manuscrits.

Je remercie les membres du jury extérieur, pour avoir accepté de juger ce travail, à savoir le **Docteur Léa Lansade** et le **Professeur Frank Ödberg**. La lecture de leurs travaux dans le domaine de l'éthologie équine m'a été précieuse.

Enfin, je tiens à remercier chaleureusement mes parents, sans la présence et le soutien desquels tout ceci n'aurait simplement pas existé.

*« Un bon maître a ce souci constant : enseigner à se passer de lui. »
(André Gide)*

*« Les meilleurs professeurs sont ceux qui savent se transformer en ponts, et
qui invitent leurs élèves à les franchir. »
(Nikos Kazantzakis).*

RÉSUMÉ

Chez l'homme comme chez l'animal, le stress peut parfois être considéré comme favorable à l'accomplissement de certaines tâches, mais il peut également inhiber les capacités, devenir néfaste et avoir un impact non négligeable sur la santé et le bien-être. Nous imposons souvent au cheval domestique un cadre de vie très différent de celui de son environnement naturel. Dès que nous interagissons avec cet animal, que cela soit en compétition ou lors de manipulations vétérinaires, nous le confrontons à divers éléments stressants. Le stress généré peut avoir un impact sur sa santé et son bien-être, sur ses performances sportives mais également sur la sécurité des personnes qui le manipulent (cavaliers, éleveurs, personnel soignant, ...).

Diverses méthodes indirectes existent pour mesurer le niveau de stress. Parmi les réponses développées par le cheval suite à la perception d'un élément stressant, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à la réponse comportementale ainsi qu'à la réponse neuroendocrine, principalement la modification des concentrations en cortisol circulant.

Notre premier objectif a été de valider l'utilisation de la salive pour doser le cortisol libre. Nous avons ensuite utilisé cette approche pour suivre le niveau de stress de couples cavalier-cheval en compétition via la cinétique du cortisol salivaire. Nous avons alors pu comparer les niveaux de stress du cavalier et du cheval et étudier l'éventuelle relation entre ces niveaux de stress et les performances obtenues. Nos résultats montrent que les taux de cortisol augmentent significativement pendant la compétition, chez le cheval (de 200% à 360%) et chez le cavalier (de 140% à 230%). Les meilleures performances sont réalisées par les cavaliers dont l'augmentation en cortisol est la plus faible et, de façon plus surprenante, par les chevaux dont l'augmentation en cortisol est la plus élevée. Le stress des deux partenaires semble donc exercer une influence opposée sur leurs performances en compétition, positive dans le cas du cheval mais négative chez le cavalier. Ces observations mériteraient d'être réalisées dans d'autres conditions de compétition. Nous nous sommes également intéressés aux liens potentiels entre traits de tempérament de l'animal, évalués par le propriétaire, niveaux de stress en compétition, et performances obtenues. Il en est sorti qu'une plus forte augmentation du cortisol est liée à une certaine excitation, plutôt qu'à de l'anxiété, et s'est retrouvée principalement chez des animaux curieux, motivés et actifs. Ce suivi du stress en compétition devrait permettre d'améliorer le bien-être du cheval, du cavalier et vraisemblablement aussi les performances réalisées par le couple.

Lors du suivi de chevaux hospitalisés, nous avons pu déterminer quels étaient les comportements associés au stress qui ont pour effet de diminuer la facilité avec laquelle la manipulation est réalisée. Nous avons également testé les liens entre une évaluation du tempérament par les propriétaires, par le personnel de la clinique et ces comportements associés au stress. Nous avons notamment observé un effet prédictif d'un test simple de pesée sur l'apparition de ces comportements. Ce test permettrait aux cliniciens d'anticiper d'éventuelles difficultés lors des examens et de prendre ainsi les mesures préventives ad hoc.

L'amélioration des techniques de mesure du stress et du tempérament du cheval dans le cadre d'une hospitalisation ou d'une compétition est essentielle aux études dans le domaine du bien-être du cheval domestique. L'utilisation de méthodes de mesure du stress dites physiologiques, comme l'utilisation de la salive pour doser le taux de cortisol, sont très utiles et sont d'autant plus fiables qu'elles sont conjointement utilisées avec des méthodes éthologiques.

ABSTRACT

Both in humans and in animals, stress is sometimes considered as useful for the accomplishment of certain tasks. But it might also have a negative influence on health, welfare or safety. We often impose on our domestic horses a lifestyle very different from their natural one. As soon as we interact with this animal, either during manipulations or in competition, we face him to various stressors. This stress can affect their health, their well-being as well as their sportive performances. Horses' stress might also lead to a lack of safety for people handling them (horsemen, riders, breeders, veterinarian,...).

Stress can be assessed by various indirect ways. Among all responses possibly shown by horses submitted to a stressor, we mainly focused on behavioural responses and on a physiological response: changes in cortisol secretion.

Our first goal was to validate the use of saliva for free cortisol level determination. Secondly, we used this technique to assess stress level of both horses and riders during equestrian competitions. We compared riders' and horses' stress levels and we examined the potential relationship between the stress levels and the competition performances. The results showed that cortisol levels significantly increased during competition, both in horses and riders. The best performances were achieved by riders with the smallest increase in cortisol during competition. And, more surprisingly, the best performances were achieved by horses with highest cortisol increase. In this study, stress of both partners seems to have an opposite influence on their performances during competition: positive effects for horses ('*eustress*') but negative effects for riders ('*distress*'). It would be interesting to test these measurements under other competition conditions. We also have tested the relationship between the horse's temperament (scored by the owner), the stress levels in competition and the obtained performances. It came out that a higher increase in cortisol is more related to some 'excitement' rather than anxiety, and was mainly found in curious, motivated and active horses. This stress follow-up in competition should improve the welfare of the horse and his rider, and should probably also enhance performances achieved by the pair.

In clinical settings, we identified the stress-related behaviours, that use to lead to a low 'easiness of manipulation'. We also tested the relationship between temperament assessed by the owners, by the clinic staff and the stress-related behaviours. More particularly, we observed a predictive effect of a simple test (weigh scale test) on the appearance of these stress-related behaviours. This test would allow clinicians to anticipate potential difficulties during examinations and to prevent deriving injuries.

Improving the stress measurement techniques and horses' temperament assessment is essential for domestic horse welfare studies, as they occur in hospital, during competition, or in other stressful situations. Using physiological stress measurements, as salivary cortisol, is very useful and more reliable if they are used in conjunction with ethological methods.

LISTE DES PUBLICATIONS

PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES SOUMISES À COMITÉ DE LECTURE

M. PEETERS, J. SULON, J.-F. BECKERS, D. LEDOUX and M. VANDENHEEDE (2011) Comparison between blood serum and salivary cortisol concentrations in horses using an adrenocorticotrophic hormone challenge. *Equine Veterinary Journal*. **43**, (4), 487-493. (Voir thèse, p.91)

M. PEETERS, D. VERWILGHEN, D. SERTEYN and M. VANDENHEEDE. Relationships between young stallions' temperament and their behavioral reactions during standardized veterinary examinations. *Accepted for publication (27 oct 2011) in Journal of Veterinary Behavior: Clinical Applications and Research.* (Voir thèse, p.155)

M. PEETERS, C. CLOSSON, J-F BECKERS, M. VANDENHEEDE. Rider and horse salivary cortisol levels during competition and impact on performance. *Accepted for publication (28 sept 2011) in Journal of Equine Veterinary Science.* (Voir thèse, p.121)

COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

M. PEETERS, F. PETERS, J. SULON, C. SANDERSEN, P. PONCIN, D. SERTEYN and M. VANDENHEEDE (2008) Behavioural and physiological assessment of stress level in hospitalized horses: correlation between parameters. *42nd Congress of the International Society for Applied Ethology, 5-9th August, Dublin (Ireland).*

M. PEETERS, F. PETERS, J. SULON, C. SANDERSEN, P. PONCIN, D. SERTEYN and M. VANDENHEEDE (2008) Assessment of stress level in horses (*Equus caballus*): Behavioural and physiological measurements in hospital. *15th Benelux Congress of Zoology. 30-31 October. Liège (Belgium).*

M. PEETERS, J. SULON, J-F BECKERS, D. LEDOUX and M. VANDENHEEDE (2009) Comparison between blood and salivary cortisol levels in horses (*Equus caballus*) using an ACTH challenge. *43rd Congress of the International Society for Applied Ethology, 6-10th July, Cairns (Australia).*

M. PEETERS, J. SULON, D. SERTEYN and M. VANDENHEEDE (2009) Assessment of stress level in horses during competition using salivary cortisol: preliminary studies. *15th International Equitation Science Conference. 12-14th July. Sydney (Australia)*

M. PEETERS, S. GODEFROID, J. SULON, J-F BECKERS, D. SERTEYN and M. VANDENHEEDE (2010) Can we predict troubles during horse clinical examinations by a simple test? *44th Congress of the International Society for Applied Ethology. 31st July-2nd August. Uppsala (Sweden).*

M. PEETERS, D. VERWILGHEN, D. SERTEYN, J-F BECKERS and M. VANDENHEEDE (2010) Impact of the temperament of young stallions on their stress reactions when subjected to a standardised veterinary examination. *16th International Equitation Science Conference. 4-7th August. Uppsala (Sweden).*

M. PEETERS, C. CLOSSON, J-F BECKERS and M. VANDENHEEDE (2011) Le stress du cavalier et du cheval en compétition: appréciation, cinétique et impact sur les performances - Stress of riders and horses in competition: assessment, kinetics and effect on performance. *37^{ème} Journée de la Recherche Equine. Jeudi 24 février, Paris (France).*

MÉMOIRES DE LICENCE/MASTER EN SCIENCES

M. PEETERS, F. PETERS, D. SERTEYN, P. PONCIN et M. VANDENHEEDE

Appréciation comportementale et physiologique du niveau de stress chez les chevaux domestiques (*Equus caballus*) hospitalisés - Impact sur la qualité de l'induction et du réveil, étapes balisant une anesthésie générale. *Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de Licenciée en Sciences biologiques, année académique 2005-2006, Université de Liège - Belgique*

S. GODFROID, **M. PEETERS**, P. PONCIN, M. VANDENHEEDE

Le stress du cheval en milieu hospitalier : approche éthologique, par questionnaire et physiologique. Relation avec la qualité des soins. *Mémoire présenté par Sandra Godfroid, en vue de l'obtention du diplôme de Master en Biologie des organismes et écologie, année académique 2008-2009, Université de Liège - Belgique*

C. CLOSSON, **M. PEETERS**, J-F BECKERS, M. VANDENHEEDE

Influence du tempérament du cheval et du cavalier sur leur niveau de stress et les performances en compétition équestre : approches éthologique, physiologique et psychologique. *Mémoire présenté par Coline Closson, en vue de l'obtention du diplôme de Master en Biologie des organismes et écologie, année académique 2009-2010, Université de Liège - Belgique*

INTRODUCTION



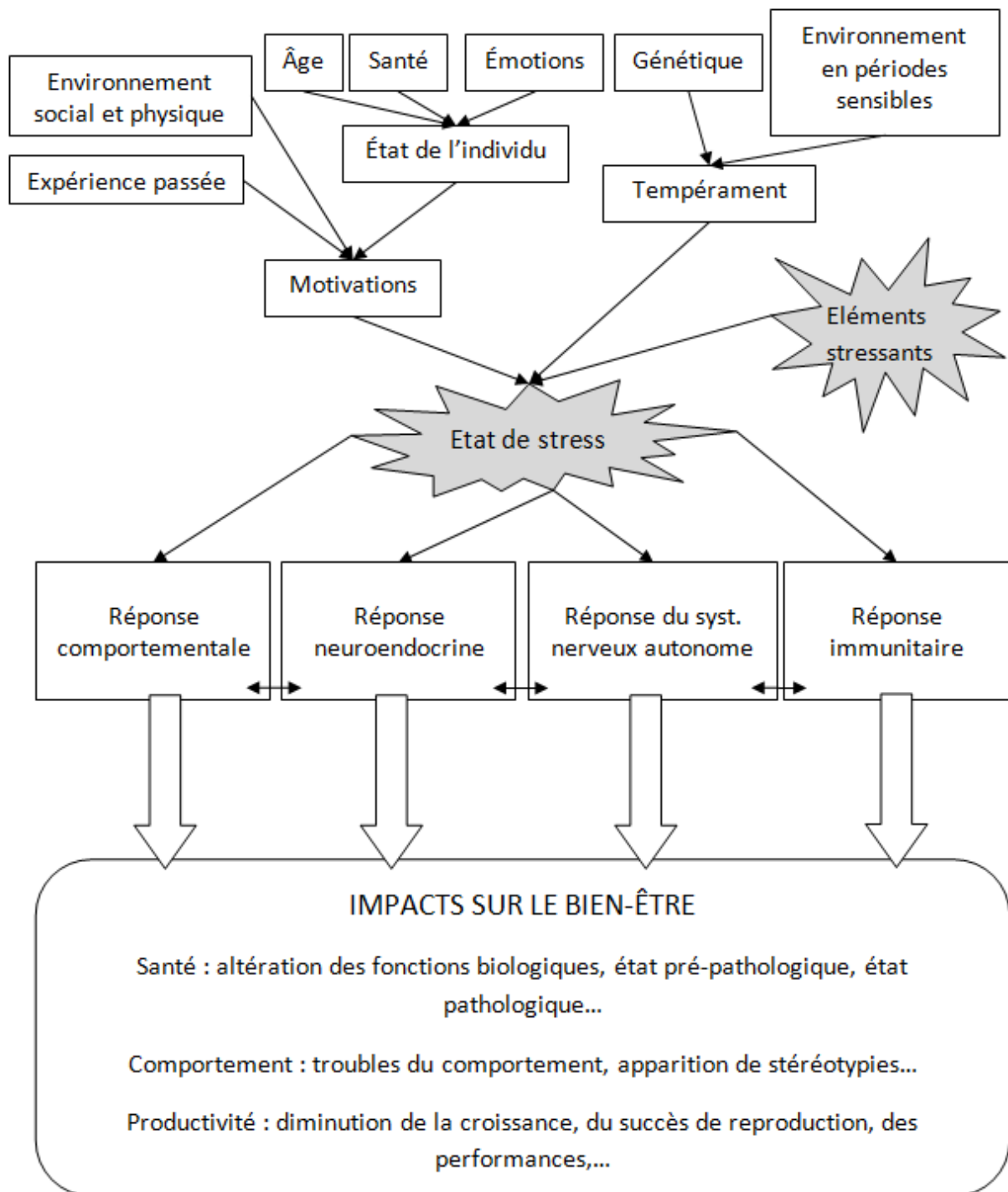


Figure 1 : Diagramme schématisant les principales interactions entre les facteurs internes et externes de l'individu et de son environnement, les réponses mise en place lors de la présence d'éléments stressants et les impacts sur le bien-être de l'individu

1. LE CONCEPT DE STRESS

Pour l'homme contemporain, le stress peut à la fois être considéré comme favorable aux performances socioprofessionnelles, mais il peut également inhiber ses capacités et devenir l'ennemi qu'il faut combattre pour maintenir son bien-être. L'origine latine du mot stress est « *stringere* », qui signifie « rendre raide », « serrer », « presser ». Le terme « *stress* » est tout d'abord utilisé en physique métallurgique avec la loi de Hooke qui stipule qu'une force extérieure agissant sur un corps, provoque une tension de ce corps (en anglais « *stress* ») qui peut se transformer en déformation mécanique. Cette utilisation du mot « *stress* » crée déjà un lien avec une certaine forme d'adaptation mais où l'excès de stress rendrait le matériau plus vulnérable.

En 1865, le médecin physiologiste français Claude Bernard écrit que « *tous les mécanismes vitaux quelque variés qu'ils soient, n'ont toujours qu'un seul but, celui de maintenir l'unité des conditions de la vie dans le milieu intérieur* » (Bernard, 1865). Ce maintien de l'équilibre interne sera décrit par Cannon, 50 ans plus tard, et appelé « *homéostasie* ». Claude Bernard est un des premiers, en 1868, à interpréter les réactions provoquées par le stress sur le comportement humain comme des réactions servant à maintenir l'équilibre de l'organisme. En 1878, il montrera que, lorsque la stabilité intérieure est perturbée, un organisme est plus vulnérable à la maladie. Ce dérangement de l'équilibre est un facteur fragilisant, rendant l'organisme plus sensible à la présence d'un germe et au développement d'une maladie (Bernard, 1878) in (Wikipédia, 2011).

C'est en 1915 que Walter Bradford Cannon (1871-1945), physiologiste américain, utilise le nom d'homéostasie (*homoios* : égal ; *stasis* : état) et y inclut la notion de stress. Il s'intéresse aux réactions de l'organisme lors de réactions émotionnelles fortes (frayeur, crainte, fureur) et observe l'effet d'un stress sur le système nerveux autonome de l'organisme (dérèglement de la digestion, accélération du rythme cardiaque, production d'adrénaline) (Cannon, 1915, 1932). Il est un des premiers à s'intéresser à la médullosurrénale, productrice d'adrénaline et à décrire comment elle permet de faire face à des changements de température, des nouveaux besoins énergétiques ou des variations de pression partielle d'oxygène dans l'air (Cannon, 1935). Cannon associe donc le stress à son concept d'homéostasie. Il conçoit que l'homéostasie a certaines limites dont la transgression provoque un stress. Il définit le stress comme « *un stimulus endogène ou exogène provenant du déséquilibre trop important de l'homéostasie* » (Wikipédia, 2011). Pendant tout le 20^{ème} siècle, l'approche biologique du stress va lier les termes « *stress* », « *homéostasie* » et « *adaptation* » et engendrer une littérature abondante et féconde.

L'endocrinologue Hans Selye (1907-1982) fut un des premiers chercheurs à s'intéresser au stress et à employer ce terme en médecine humaine, au début du 20^{ème} siècle (Selye, 1935). Il décrit le stress comme étant la réponse de l'organisme face à

des pathogènes ou des conditions environnementales sévères (telles que la sécheresse, le froid, un choc électrique...) (Veissier et al., 2007). Selon lui, l'organisme soumis à un stress et qui veut maintenir son homéostasie, réagit toujours par une double réponse. La première est spécifique et varie selon l'élément stressant et la situation. La seconde est non-spécifique car identique dans toutes les situations. Que l'élément déclencheur soit plaisant ou désagréable importe peu ; c'est l'intensité de la demande de réajustement ou d'adaptation qui compte.

C'est dans les années 1920 que Hans Selye se rend compte de cette non-spécificité. Il étudie alors la médecine à l'Université de Prague et observe des patients présentant des symptômes qui ne sont pas liés à leur maladie mais plutôt au fait d'être malade (Selye, 1935). C'est en 1950 qu'il développera cette idée avec la théorie du syndrome général d'adaptation (SGA). Il décrit ce syndrome général d'adaptation comme « *l'ensemble des modifications qui permettent à un organisme de supporter les conséquences d'un traumatisme naturel ou opératoire* » (Selye, 1956). Ce syndrome reprend tout les symptômes non spécifiques qui apparaissent quelle que soit la nature de l'élément stressant. Chaque personne possède un SGA plus ou moins fort et ainsi a une capacité d'adaptation différente. Le syndrome du stress évolue en suivant 3 stades successifs : la réaction d'alarme (mobilisation des défenses), le stade de résistance (adaptation à l'élément stressant) et le stade d'épuisement (si l'élément stressant est puissant et/ou agit longtemps). Par la suite, il trouvera des résultats similaires lors d'expérimentations sur des rats auxquels il injecte diverses substances nocives. Peu importe la substance injectée, il observe les mêmes symptômes chez les rats : agrandissement de la surrénale, atrophie du thymus et des ganglions lymphatiques et ulcères gastriques (Selye, 1973). Cette réponse ne dépend donc pas de la nature de l'élément stressant. Non seulement il fut un des premiers à parler de stress, mais il fut également un des premiers à démontrer le rôle des glucocorticoïdes et de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien lors de la réponse au stress (voir « La réponse neuroendocrine au stress », p. 56). Il décrit également la différence entre *eustress* et *distress* (Selye, 1975) (voir le chapitre « Quand stress devient distress, impact sur le bien-être de l'animal », p.32).

D'autres chercheurs (Mason et al. 1976 et Levine 1989 in Wiepkema, 1993) ont également mis en évidence le fait que différents éléments stressants provoquaient une réaction spécifique (comportementale et physiologique) ainsi qu'une réponse non spécifique. Wiepkema (1993) décrit le *stress* comme étant *l'état* d'un organisme qui est déterminé par l'apparition de *réponses au stress* et qui est provoqué par un ou plusieurs éléments stressants (*stressors*). Alors que ces auteurs décrivent le stress comme l'état d'un organisme, Moberg lui le définit comme étant « *la réponse biologique induite quand un individu perçoit une menace pour son homéostasie* ». Il décrit la réponse biologique de l'animal face au stress en trois étapes : la reconnaissance de l'élément stressant, la défense biologique contre cet élément stressant et la conséquence de cette réponse (Moberg, 2000).

Nous considérons qu'un stress est un *état* de l'organisme, induit par des *éléments stressants* (voir ci-après, p.27), provoquant des *réponses biologiques* (p.28). Ces réponses au stress ont un *coût biologique* (p.29), qui aura ou non un impact sur le *bien-être* (p.29) de l'animal (*eustress* ou *distress*, p.32). Nous allons ci-dessous définir ces diverses notions.

2. LES ÉLÉMENTS STRESSANTS

La réponse biologique au stress commence lorsque l'organisme perçoit, via son système nerveux central, un élément potentiellement menaçant pour son homéostasie. Ces éléments stressants sont très variés. Il peut s'agir d'une agression directe de l'organisme, comme une blessure, une diminution de la température corporelle, ou d'un changement de l'environnement comme la modification de la routine, une séparation sociale, la détérioration de l'habitat, une restriction de l'accès à la nourriture, une pathologie... Les éléments stressants éloignent l'organisme d'un environnement idéal (Veissier et al., 2007). L'élément stressant peut également n'être qu'un sentiment de danger perçu par l'individu, comme une menace de prédation ou le fait de se trouver dans situation risquée (Wiepkema, 1993). Le fait que cet élément soit réellement dangereux ou non importe peu, c'est l'impression de menace, ressentie par l'animal, qui engage la réponse biologique (Moberg, 2000; Veissier et al., 2007). C'est la raison pour laquelle certains stress psychologiques peuvent être dévastateurs.

Chez les animaux domestiques, les interactions avec l'homme peuvent provoquer du stress. Lorsque les contacts avec l'homme sont intrusifs et fréquents, la qualité de l'interaction peut avoir des conséquences non négligeables pour les 2 partenaires (Hemsworth et al., 2000). Le stress provoqué par l'homme peut avoir un impact sur la productivité, la reproductivité et le bien-être des animaux domestiques (Rushen et al., 1999). De nombreuses études se sont intéressées au stress de l'animal induit par l'homme (Rushen et al., 1999; Hemsworth et al., 2000; de Passille et al., 2005), principalement chez des animaux de production, comme les bovins (Rushen et al., 2001; Breuer et al., 2003) ou les porcs (Hemsworth et al., 1987), mais également chez le cheval (Lansade et al., 2004; Lansade et al., 2005; Hausberger et al., 2008; Lansade et al., 2008a).

Le facteur nouveauté d'un stimulus ou d'une situation aura également un impact sur la réaction induite. Le fait de perdre le contrôle, ou de ne plus pouvoir prévoir les événements de son environnement, qu'ils soient à caractère positif ou négatif, peut également entraîner un stress psychologique important (Wiepkema, 1993). L'élément stressant peut être ponctuel, intermittent ou continu et induire un stress aigu ou chronique.

3. LES RÉPONSES AU STRESS

La défense biologique engagée lors de la perception de l'élément stressant est une combinaison de quatre réponses : (1) la réponse comportementale, (2) la réponse du système nerveux autonome, (3) la réponse neuroendocrine et (4) la réponse immunitaire (Moberg, 2000). Ces réponses modifient les fonctions biologiques de l'organisme.

Dans la plupart des cas, la première réponse est la réponse comportementale. L'animal gagne à éviter l'élément stressant en s'en éloignant simplement. Par exemple en fuyant un prédateur ou en se déplaçant vers un point d'ombre pour réguler sa température. La réponse comportementale n'est pas appropriée à tous les éléments stressants : les animaux peuvent se retrouver dans des situations où leur choix de réactions comportementales sera limité ou contrecarré. Cela sera particulièrement le cas lorsque l'animal est confiné.

Une seconde défense face à un élément stressant est enclenchée via le système nerveux autonome. Le SN autonome est composé de deux parties ayant des rôles opposés : le système nerveux parasympathique et le système nerveux sympathique. Le SN parasympathique régule les fonctions telles que la croissance, la digestion, il ralentit la respiration et la fréquence cardiaque. Il est stimulé lors du sommeil ou après un repas copieux et sera inhibé lors d'un stress. À l'opposé, le SN sympathique est stimulé par l'excitation, la vigilance ou lors d'une situation stressante. Lors d'un stress, il va dilater les pupilles, accélérer la fréquence cardiaque et respiratoire, inhiber le système digestif... Le stockage de l'énergie est suspendu et l'énergie stockée sera remise à disposition. La concentration sanguine en glucose augmente. Pour que ce glucose et l'oxygène atteignent rapidement et préférentiellement les muscles utiles pour la réponse au stress (par exemple la fuite en présence d'un prédateur), les fréquences cardiaque et respiratoire ainsi que la pression sanguine augmentent, l'eau est retenue dans la circulation pour augmenter le volume sanguin, et certaines parties du système circulatoire sont déviées (Sapolsky, 2002).

Via ses relais présents dans la corde spinale, le système nerveux autonome transmet l'influx nerveux jusqu'à la surrénale. La zone médullaire de la surrénale sécrète l'adrénaline. La transmission de cet influx ne prend que quelques secondes. D'autres organes sont également stimulés et sécrètent la noradrénaline. L'adrénaline et la noradrénaline appartiennent toutes les deux au groupe des catécholamines. La zone corticale de la surrénale sécrète les glucocorticoïdes. Les glucocorticoïdes et les catécholamines sont les principaux médiateurs des changements provoqués par la réponse au stress (Sapolsky, 2002).

Les hormones sécrétées par le système neuroendocrine ont un vaste et durable effet sur l'individu. Les fonctions biologiques qui sont affectées par le stress sont souvent régulées par des hormones. La sécrétion de ces hormones est altérée de façon directe ou indirecte lors d'un stress (Matteri et al., 2000). Dans la plupart des études sur le

stress, l'activité de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien, que nous appellerons ensuite, pour plus de clarté, axe HPA (hypothalamo-pituitary-adrenal) est la première mesure neuroendocrine effectuée (voir « La réponse neuroendocrine au stress », p. 56). L'augmentation des glucocorticostéroïdes surrénaliens circulants (cortisol et corticostérone) est depuis longtemps assimilée au stress. La sécrétion de prolactine et de somatotropine (ou hormone de croissance) est également sensible au stress. La TSH (thyroid stimulating hormone) et les gonadotrophines, LH (luteinizing hormone) et FSH (follicle-stimulating hormone) sont directement ou indirectement modifiées par le stress (Moberg, 2000).

Les scientifiques, dès le début de la médecine moderne, s'intéressent aux liens entre symptômes psychiatriques et fonction immunitaire. Au milieu du 20^{ème} siècle, des études sur des patients psychotiques rapportent une diminution du nombre de lymphocytes (Freeman et al., 1947) et une réponse à la vaccination plus faible que les patients non psychotiques (Vaughan et al., 1949). En 1964 est inventé le terme de « *psychoimmunology* » (Solomon et al., 1964) et en 1975 la notion de « *psychoneuroimmunology* » est avancée (Ader et al., 1975). Ces auteurs sont les premiers à démontrer les liens entre le système nerveux et le système immunitaire, lors d'expérimentations avec des rats en laboratoire. Les scientifiques s'accordent donc pour dire qu'il y a des interactions bidirectionnelles entre le système nerveux et le système immunitaire. La majorité de ces interactions seraient relayées par les cytokines, qui jouent un rôle dans la réponse au stress. L'activation de l'axe HPA influencerait également l'immunité (Blecha, 2000). Ce lien entre stress et altération du système immunitaire est appuyé par le nombre croissant de cas de maladies observé chez des animaux soumis à des stress intenses. L'exemple le plus souvent utilisé est celui du développement de maladies respiratoires chez les bovins transportés par bateaux (Blecha, 2000). En situation stressante, divers facteurs physiologiques (système neuroendocrinien) et comportementaux interagissent pour influencer le système immunitaire (Blecha, 2000). D'autres études plus récentes confirment ces liens, chez l'homme (Burns et al., 2003), chez les bovins (Sporer et al., 2008) et chez les chevaux (Malinowski et al., 2006). L'appréciation des compétences immunitaires pourrait dès lors être un outil intéressant pour étudier le stress.

4. LE COÛT BIOLOGIQUE DU STRESS ET SON IMPACT SUR LE BIEN-ÊTRE ANIMAL

LE BIEN-ÊTRE ANIMAL

Historiquement, l'homme a d'abord considéré l'animal comme une ressource prélevée dans la nature (homme prédateur). Avec la domestication animale, l'homme se rend compte des nombreuses utilités qu'il apporte pour le transport, l'élevage, les divertissements, les cultes... Le regard de l'homme sur l'animal évolue selon les époques, les civilisations, selon les animaux (Janet, 2007). Au 17^{ème} siècle, Descartes,

avec sa conception mécaniciste, considère l'animal comme une machine. Au 18^{ème} siècle, la théorie de Descartes est critiquée et les théories rapprochent l'homme de l'animal. Au 19^{ème} siècle, Darwin et sa théorie de l'évolution montre une parenté entre l'homme et l'animal. C'est au début des années 1800 que sont apparues les premiers groupes se préoccupant du bien-être animal, comme la « *Society for the Prevention of Cruelty to Animal* » (1824). Elle se composait d'inspecteurs chargés d'identifier les abus et de les dénoncer aux autorités. Toutefois, les réels progrès au niveau du bien-être animal ne sont apparus qu'à la fin du 20^{ème} siècle (Phillips, 2009). En 1967, le gouvernement anglais crée le « *Farm Animal Welfare Advisory Committee* » qui évolue en 1979 vers le « *Farm Animal Welfare Council* ». Leurs premières recommandations, basées sur le rapport du professeur Brambell (en 1965), sont que l'animal d'élevage doit avoir la possibilité de se lever, se coucher, se retourner, faire sa toilette (*groom themselves*) et étirer ses membres (*stretch their limbs*). Ces recommandations ont ensuite évolué vers ce que l'on appelle les 5 libertés (*five freedoms*). Ces 5 besoins fondamentaux sont rédigés dans un rapport datant du 5 décembre 1979 (FAWC, 1979). 40 ans plus tard, ils se présentent toujours selon 5 libertés (FAWC, 2009) (voir Table 1).

FAWC 1979	FAWC 2009
Freedom from thirst, hunger or malnutrition ;	Freedom from hunger and thirst ;
Appropriate comfort and shelter ;	Freedom from discomfort ;
Prevention, or rapid diagnosis and treatment, of injury and disease ;	Freedom from pain, Injury or Disease ;
Freedom to display most normal patterns of behaviour ;	Freedom to express normal behaviour ;
Freedom from fear.	Freedom from fear and distress.

Table 1 : Table reprenant les 5 libertés selon le rapport de la FAWC datant du 5 décembre 1979 et celui de 2009

On retrouve souvent un lien entre le bien-être et la notion d'adaptation d'un individu à son environnement. Selon Broom (1991), le bien-être d'un animal correspond à l'état dans lequel il se trouve lorsqu'il doit s'adapter à un nouvel environnement. Lors qu'il s'adapte sans trop d'efforts, à faible coût (Broom, 1991), ou sans souffrance (Carpenter 1980 in Veissier and Boissy, 2007), l'état de bien-être est préservé. Le mal-être découlerait donc d'un problème d'adaptation à l'environnement.

Le bien-être est défini comme « *un état d'équilibre dynamique (homéostasie) entre l'animal et son environnement (interne ou externe)* » et l'auteur d'ajouter que « *Les efforts qu'il doit consentir pour maintenir ou retrouver cet équilibre peuvent provoquer*

des souffrances physiques et mentales éventuellement préjudiciables tant au point de vue de sa santé que de la productivité » (Vandenheede, 2003).

« Le bien-être de l'animal d'élevage est apprécié en utilisant 4 types de mesures, complémentaires et indissociables : zootechniques, sémiologiques, physiologiques et éthologiques. Ces dernières comportent de nombreux avantages et sont de plus en plus utilisées : étude des capacités d'adaptation, des troubles du comportement, ou des motivations et préférences des animaux » (Vandenheede, 2003). Les mesures zootechniques (p.72), basées sur la productivité d'un ensemble d'animaux (croissance, production viandeuse ou laitière, reproduction...), et les mesures sémiologiques (présence de lésions, pathologie...) sont des approches indispensables mais non suffisantes pour apprécier le bien-être. Les méthodes physiologiques permettant d'évaluer le bien-être animal sont très proches de celles utilisées pour mesurer le stress. Certains scientifiques considèrent d'ailleurs que le stress et le bien-être sont les versions opposées d'un même processus (Veissier et al., 2007). On retrouve le dosage des hormones surrénaliennes (voir ci-après, p.56), la fréquence cardiaque (p.72), la fréquence respiratoire (p.72) et détection d'altérations du système immunitaire. Les mesures éthologiques, également utilisées pour mesurer le stress, se basent sur l'observation de comportements exprimés par l'animal dans le milieu. Pour apprécier le stress ou le bien-être à l'aide d'observations comportementales, il est important de bien connaître l'éthogramme des espèces concernées, de comprendre les mécanismes d'adaptation que la domestication leur impose et les mécanismes sous-jacents qui font naître ces comportements (causes, fonction, ontogenèse, phylogenèse...) (Rushen, 2000; Vandenheede, 2003). Nous développons cette méthode d'appréciation comportementale du stress et l'apparition de comportement anormaux dans le chapitre « La réponse comportementale au stress » (voir p.50).

NOTION DE COÛT BIOLOGIQUE DU STRESS

Les réponses provoquées par un stress modifient des fonctions biologiques. Ces changements apportés aux fonctions biologiques impliquent un déplacement des ressources biologiques, ce qui va directement affecter le bien-être de l'individu. Cette énergie détournée est appelée le « *coût biologique du stress* » (Moberg, 2000). Le stress affecte le métabolisme et l'utilisation des nutriments. Des stress légers vont simplement modifier des comportements et provoquer par exemple une augmentation du temps passé à s'alimenter ainsi qu'une amélioration de l'assimilation des nutriments. Des stress plus aigus ou prolongés vont avoir des effets plus importants sur le métabolisme. Pour plus de détails sur les conséquences métaboliques du stress, voir (Elsasser et al., 2000).

QUAND STRESS DEVIENT DISTRESS, IMPACT SUR LE BIEN-ÊTRE DE L'ANIMAL

En 1975, Selye publie un modèle séparant *l'eustress* du *distress* (Selye, 1975). Il explique que lorsqu'un stress améliore des fonctions biologiques en augmentant par exemple les capacités physiques ou mentales de l'individu, il peut être considéré comme positif et est appelé « *eustress* » (préfixe *eu-* = bon, bien). Dans le cas d'un animal qui s'échappe face à un prédateur, c'est la survie qui compte. L'énergie détournée des fonctions biologiques pour permettre la fuite est faible comparée à l'issue mortelle que pourrait avoir la non fuite. Le coût biologique de ce type de stress est donc négligeable car il est de courte durée et l'animal possède les ressources nécessaires pour lui faire face. Une fois que le stress est passé, l'animal peut rapidement renouveler les ressources utilisées. Cette réponse adaptée est donc favorable en termes de sélection naturelle. Ce type de stress « naturel » est nécessaire à l'individu pour se maintenir en interaction avec son environnement, mais aussi pour mobiliser ses ressources, pour sa motivation, pour ses performances...

Lorsqu'un stress persiste et que l'individu ne peut s'adapter, on se trouve dans une situation appelée « *distress* », qui peut mener à des comportements d'anxiété ou de dépression (Selye, 1975) in (Wikipédia, 2011). Ce stress sera alors associé à la diminution du bien-être. Plus récemment, Moberg décrit également les 2 situations en lien avec la notion de coût biologique du stress. Si un stress est peu intense et de très courte durée, son coût biologique sera faible et l'impact sur le bien-être négligeable. Lorsque le stress se prolonge, le coût biologique devient significatif. Suite à de tels stress, l'animal entre dans des états pré-pathologiques et/ou pathologiques. Le stade pré-pathologique est atteint lorsque la réponse au stress altère les fonctions biologiques de telle sorte que l'individu peut développer des pathologies. L'exemple le plus évident est la maladie infectieuse. Les modifications des fonctions biologiques provoquées par un stress peuvent réduire les compétences immunologiques, rendant l'animal vulnérable aux pathogènes présents dans son environnement. Si les pathogènes atteignent l'animal et s'y développent, celui-ci entre dans un stade pathologique. Plus longtemps l'animal sera en présence d'un stress, plus longtemps durera son état pré-pathologique et plus il aura de risques de développer une pathologie (Moberg, 2000).

Actuellement, il y a consensus sur le fait que le stress peut avoir des effets délétères sur les individus et qu'il peut également entraîner chez l'animal des pathologies similaires à celles des humains. Le *distress* peut donc provoquer des problèmes de santé physique en altérant des fonctions biologiques. Le stress peut favoriser des ulcères gastriques et des coliques/diarrhées (Covalesky et al., 1992). Il peut écourter la digestion, inhiber l'inflammation, suspendre la cicatrisation ou la réparation de tissus lésés. Le stress peut également provoquer des dérèglements immunitaires (Blecha, 2000). Il peut induire une diminution de la productivité, traduite par des troubles de la reproduction (Hjollund et al., 1999), une diminution de la fertilité, une diminution des performances, de la croissance, de la production de lait ou de viande.

C'est la raison pour laquelle le stress peut avoir un impact plus important sur les jeunes en croissance ou chez les femelles en période de reproduction (Sapolsky, 2002). Le stress a également un impact sur la santé mentale : troubles du comportement (Rushen, 2000), stéréotypies, dépression... (voir chapitre « La réponse comportementale au stress », p.50). Le stress et peut parfois diminuer la perception de la douleur. Cette action s'avère essentielle lorsque par exemple, un animal blessé doit continuer de fuir son prédateur (Sapolsky, 2002).

STRESS AIGU OU STRESS CHRONIQUE

Un *distress* peut résulter d'un stress aigu ou d'un stress chronique. La différence entre ces deux stress s'exprime dans leur durée : un stress aigu est considéré comme une exposition brève à un élément fort stressant. Les stress aigus deviennent néfastes lorsqu'ils altèrent des fonctions biologiques qui dépendent d'un timing précis. Quand le timing est perturbé, la fonction normale peut être perdue. C'est le cas pour l'ovulation ; son succès dépend d'un parfait timing entre la sécrétion d'hormones de pré-ovulation et l'expression des comportements d'œstrus. Si le timing est perturbé, l'opportunité de se reproduire sera perdue (Moberg, 2000). Un stress aigu peut également mener au *distress* par le détournement des ressources biologiques lors de la phase de croissance rapide des animaux et fortement perturber le développement de l'animal.

Un stress chronique est communément considéré comme un stress continu, de longue durée. Il est cependant difficile de concevoir qu'un individu soit confronté à un seul stress chronique et ce en continu. La plupart du temps, le stress chronique résulte en une série de stress aigus qui voient leurs coûts biologiques s'additionner et mener l'individu vers un état pré-pathologique qui peut devenir pathologique (Moberg, 2000). Si l'animal est confronté de façon successive à un stress aigu, et que ces successions sont trop proches pour lui laisser le temps de reformer les ressources utilisées, les coûts biologiques accumulés auront un effet délétère sur son organisme. Même si ce stress seul est non-menaçant, son accumulation provoque un état de *distress*. Ce concept d'addition des coûts biologiques nous permet d'envisager l'effet qu'un second stress aigu peut avoir sur un animal déjà sous l'influence d'un premier stress. L'addition des coûts biologiques de ces deux éléments stressants peut avoir des effets délétères sur l'organisme de l'animal. La période de *distress* durera jusqu'à ce que l'individu ait récupéré les ressources détournées pour faire face à cette addition de coûts biologiques et qu'il ait restauré les fonctions biologiques (physiques et mentales) qui ont été altérées (Moberg, 1999).

Pour étudier les réponses d'un organisme soumis à un stress chronique, il ne faut pas considérer ce stress comme un état constant, invariable. Lors d'un stress chronique, les réponses vont varier. Par exemple, certaines réponses comportementales vont diminuer, en réponse à une adaptation cognitive aux éléments stressants. Des réponses physiologiques vont cesser, revenir à la normale (concentration en cortisol

sanguin) ou augmenter (sensibilisation de l'axe HP) (Ladewig, 2000) (voir chapitre « La réponse neuroendocrine au stress », p.56).

CONCLUSION SUR LA GESTION DU STRESS ET DU BIEN-ÊTRE

L'absence totale de stress pour atteindre le bien-être absolu est utopique. Parce que le stress fait partie inhérente de la vie, une situation dans laquelle nous tiendrions l'animal hors de portée de tout stress n'est pas imaginable. Le stress est présent en élevage, dans les zoos, chez nos animaux de compagnie et lors de l'utilisation d'animaux en laboratoire. Des méthodes de gestion du stress dans ces conditions d'exploitation animale font l'objet de nombreuses études pour améliorer le bien-être animal. Le bien-être animal est la principale préoccupation de l'éthologie appliquée. Les techniques d'élevage sont étudiées et adaptées pour éviter, voire interdire, les situations qui entraînent l'apparition de stress au point de mener l'animal en *distress*. Ces méthodes tentent de réduire les coûts biologiques engendrés par les stress tels que l'hébergement, les manipulations, les contacts avec les humains, l'isolement... Et lorsque le stress est inévitable, on peut tenter d'apprendre à l'animal qu'il n'y a pas de menace, ou détourner son attention du stimulus stressant. On peut également amener l'animal à exécuter d'autres comportements pendant un stress, comme par exemple en proposant un objet-jeu lors d'un moment de frustration alimentaire (Moberg, 2000).

Une autre approche de la gestion du stress est de tirer profit des facteurs influençant la perception ou la réponse au stress. La génétique et l'expérience passée sont des outils intéressants pour moduler la réponse de l'animal au stress. La sélection génétique permettrait de rendre des animaux domestiques moins sensibles au confinement ou au stress en général (Pottinger, 2000). Habituer des animaux aux manipulations, aux contacts avec les humains et au confinement, permettrait de diminuer les ressources nécessaires aux réponses biologiques induites par les conditions d'élevage. Ces facteurs modulant la réponse au stress sont développés dans le chapitre « Les facteurs influençant les réponses au stress » ci-dessous.

5. LES FACTEURS INFLUENÇANT LES RÉPONSES AU STRESS

La perception de l'élément stressant et le transfert des informations via le système nerveux central enclenchent la réponse au stress. Une partie de la variabilité de la réponse est donc liée à cette perception. Un même élément ne sera pas perçu de la même façon par diverses espèces, ni par divers individus d'une même espèce. Cette variabilité inter-individus dépend de facteurs qui influencent l'intensité avec laquelle l'animal perçoit le stimulus comme une menace envers son homéostasie. Aux facteurs modifiant la perception du stimulus s'ajoutent d'autres facteurs qui déterminent la sensibilité de la réponse mais également sa nature.

Ces facteurs sont notamment l'environnement interne (pathologie) et externe (social et physique), l'âge, les émotions, l'expérience passée, la génétique, le tempérament.

L'ENVIRONNEMENT INTERNE ET EXTERNE

Comme expliqué dans le chapitre « Le coût biologique du stress et son impact sur le bien-être animal » (p.29), le fait d'être en présence d'éléments stressants augmente la sensibilité à un nouvel élément stressant. Lorsqu'une partie des ressources d'un animal est déjà mobilisée pour lutter contre une pathologie, l'animal sera plus sensible au stress. La sensibilité face à un stress aigu ou chronique va donc être augmentée si l'animal n'est pas en bonne santé.

L'environnement physique a également une importance. Chez le cheval domestique et chez le cheval de Przewalski, des conditions climatiques extrêmes (températures et humidité relative élevées) peuvent provoquer une élévation du niveau du stress (Mayes et al., 1986; Berger et al., 1999; Werhahn et al., 2011).

L'environnement dans lequel l'animal se trouve lorsqu'il est confronté à un élément stressant a un impact sur le type de réponse qu'il va exhiber et sur l'intensité de celle-ci. L'environnement social, les relations que l'individu entretient avec ses congénères au moment de la mise en contact avec l'élément stressant influencent les réponses au stress. L'enrichissement de l'environnement ainsi que des contacts avec des adultes réduisent le stress du sevrage chez le jeune porc (Oostindjer et al., 2011). Une étude récente a également démontré que les poulains hébergés dans un environnement enrichi, socialement et physiquement, étaient moins émotifs et plus proches de l'homme (Lansade et al., 2011). Ils expriment également moins de postures de vigilance et de comportements de défense. Vivre dans un environnement éloigné de l'environnement naturel de l'animal peut être considéré comme un stress chronique, mettant l'animal dans un état de vulnérabilité avancé (Morgan et al., 2007) (voir chapitre « Stress aigu ou stress chronique », p.33), qui le rendra plus sensible au stress et pourra influencer la réponse attribuée à l'arrivée d'un nouvel élément stressant. Pour les animaux domestiques, qu'ils soient de compagnie ou d'élevage, les interactions homme-animal ont également leur importance (Hemsworth et al., 2000; Fureix et al., 2009a; Fureix et al., 2009b) (voir chapitre « Les éléments stressants », p.27).

L'ÂGE

Alors que les mécanismes homéostatiques sont généralement considérés comme déclinant avec l'âge, les études sur l'axe HPA ne semblent pas si claires. En médecine humaine, les résultats sur des individus âgés montrent des concentrations en cortisol plus élevées, plus basses ou inchangées en comparaison avec des individus d'âge moyen. Chez le rat, un délai de récupération du taux de glucocorticoïdes normal plus long a été observé chez les individus plus âgés (Nicolson et al., 1997). Dans l'étude de Malinowski et al. (2006), les chevaux les plus âgés semblent avoir un taux de cortisol

sanguin anormalement bas en réponse à un effort intense. Cette différence pourrait avoir un impact en terme de bien-être et de santé, provoqué par une récupération plus lente après l'effort : plus lente réparation des tissus, inflammation persistante, douleurs... (Malinowski et al., 2006). Pardon et al. (2008) expliquent que chez l'homme, l'espérance et la qualité de vie peuvent être déterminées par des gènes de tolérance au stress. L'âge et le stress sont donc liés, mais de façon assez mystérieuse, surtout chez l'homme où le stress peut faire vieillir, mais vieillir provoque également du stress (Pardon et al., 2008).

LES ÉMOTIONS

La perception de l'élément stressant comme menace ou non à l'homéostasie est déterminée par l'interprétation que l'animal fait de la situation. La représentation mentale de cet élément stressant a donc toute son importance pour comprendre la réponse au stress qui va suivre. Les études de Mason en 1971, dans (Désiré et al., 2002) ont montré que des singes privés de nourriture ont un taux de cortisol élevé lorsque leurs voisins sont nourris. Leur taux de cortisol reste toutefois normal lorsqu'ils sont isolés des voisins ou lorsqu'ils ont accès à des aliments non nutritifs. Ce n'est pas tant l'absence de nourriture que la perception d'une privation qui provoque le stress. Idem lorsque des vaches sont soumises à une augmentation soudaine ou progressive de température. Quand la température ambiante augmente progressivement, le cortisol sanguin diminue (ce qui réduit la propre production de chaleur corporelle), tandis que lorsque la température augmente brusquement, le taux de cortisol commence par augmenter pour ensuite diminuer. Cette augmentation serait la réponse psychologique à la situation. Elle n'est pas liée à la nature de la situation, mais à son apparition soudaine, perçue par l'animal comme une agression.

L'EXPÉRIENCE PASSÉE

L'expérience du stress lors du développement du fœtus semble avoir un impact sur la sensibilité future des individus. Beaucoup d'études se concentrent sur le stress prénatal ou le stress des nouveaux-nés et sur son influence sur le développement des jeunes et les réponses au stress chez l'adulte (Braastad, 1998; Lay Jr, 2000; Mason, 2000; Espmark et al., 2008; Mesquita et al., 2009; Charil et al., 2010; Oostindjer et al., 2010; Parker et al., 2011). Les animaux ayant subi un stress prénatal (stress subi par la mère lors de la gestation) montrent des retards de développement moteur, une diminution des comportements d'exploration et de jeux ainsi que des troubles de l'apprentissage, des comportements sociaux, sexuels et maternels (Braastad, 1998). De manière générale, le stress subi par une femelle gestante peut modifier les capacités de réaction ultérieure de ses jeunes. Le stress prénatal et l'excès de corticostéroïdes plasmatiques maternelles et fœtales entraînent un dysfonctionnement du rétrocontrôle de l'axe HPA (Weinstock 2005 in (Crozatier, 2005)). La période périnatale, la petite enfance, l'enfance et l'adolescence sont des périodes d'accroissement de la plasticité du système lié au stress et sont par

conséquent particulièrement sensibles aux stress. Un environnement stimulant et donc légèrement stressant pour des animaux juvéniles favorisera leurs capacités d'adaptation. Tandis qu'un environnement très stressant survenant après la naissance peut avoir des conséquences neurobiologiques à long terme. C'est le cas chez les rats nouveaux-nés isolés de leur mère qui sont plus vulnérable au stress à l'âge adulte (plus anxieux et hyperactifs lors de test, taux de corticostéroïdes et d'ACTH plus élevés...) (Crozatier, 2005).

Le système hormonal, à des stades précoces de la vie, peut avoir un impact structurant et des effets à long terme souvent pour la vie entière de l'individu. *“Le développement du système nerveux central est très dépendant des interactions entre l'organisme et son environnement. Il est bien établi que pendant la grossesse, de nombreux facteurs comme des virus,[...]ou le stress peuvent conduire à des malformations physiques et des dysfonctionnements comportementaux”* (Crozatier, 2005). L'expérience d'un individu, tout au long de sa vie pourra moduler la réponses au stress (Pardon et al., 2008).

Des scientifiques se sont intéressés aux facteurs impliqués dans les réactions des chevaux domestiques envers l'homme, en prenant notamment en compte leur état de bien-être. Ils ont démontré que la perception de l'humain par le cheval dépend de son expérience avec ce dernier (Fureix et al., 2009a; Fureix et al., 2009b).

LA GÉNÉTIQUE

Dans une population, la variabilité de la réponse au stress est en partie expliquée par le génotype des individus. L'ampleur de la réponse au stress caractérise un individu durant toute sa vie (Pottinger, 2000). Des comportements tels que les « *flight or fight response* » et le « *freezing* » ainsi que la réactivité émotionnelle sont génétiquement déterminés. Une sélection artificielle de lignées sur base de ces comportements est possible. Par exemple des lignées de rats ont été sélectionnées selon les comportements exhibés lors d'un stress ('très réactifs' ou 'peu réactifs'). Cette sélection a un impact sur le bien-être. On observe par exemple significativement plus d'ulcères gastriques chez les rats les plus réactifs (Ramos et al., 1998; Pottinger, 2000) ou une augmentation plus importante du taux d'ACTH sanguin chez une lignée de rats hypersensibles lors d'un stress de type contrainte (Ramos et al., 1998).

Lorsqu'il est impossible d'éliminer un élément stressant, pour des raisons économiques et pratiques, comme par exemple le confinement des animaux dans les systèmes de production intensive, il est proposé de diminuer la réponse au stress pour limiter l'impact sur le bien-être. Les espèces domestiquées depuis des millénaires ont évolué et se sont adaptées plus ou moins bien à la vie que leur propose l'élevage (Pottinger, 2000). La sélection génétique des espèces est une solution pour accélérer le processus de domestication. La réduction de la sensibilité des espèces au stress a pour avantage une augmentation de la production (viande, lait,...) et de la reproduction, une diminution des maladies et une amélioration de la qualité de vie et

du bien-être ces animaux en captivité. Le porc a été bien étudié car sa sensibilité au stress est un problème majeur, souvent rencontré en élevage intensif. Les réponses au stress des porcs sont très variables selon les individus. Les porc sont donc sélectionnés pour éliminer les individus porteurs du gène associé à une grande sensibilité au stress (porcine stress syndrome, halothane stress gene). Lors de stress importants, les porcs porteurs de ce gène sont moins aptes à contrôler l'excès d'acide lactique, ce qui a des effets négatifs sur le bien-être et la santé du porc (Bäckström and Kauffman (1995) in (Pottinger, 2000)). Pottinger (2000) conclut à l'évidence qu'une grande partie de la sensibilité au stress d'un individu est héréditaire. De manière plus globale, on peut dire que la génétique et l'environnement précoce influencent le tempérament des animaux (Lansade, 2005). Le tempérament est plus largement développé dans le chapitre « Le tempérament » (p.38).

CONCLUSIONS

Un grand nombre de facteurs influencent la perception d'un élément stressant, l'état de stress ainsi que les réponses qui en découlent. En conditions de laboratoire, ces facteurs sont pour la plupart identifiables et il est possible de mesurer leur influence sur la réponse au stress. Mais sur le terrain, il est plus difficile d'estimer les variations inter-individus. Lors de l'évaluation du stress d'un troupeau de vaches ou d'une population d'animaux sauvages, nous n'avons pas la possibilité de connaître l'expérience passée de chaque individu, ses relations sociales avec ses congénères, ou ses prédispositions génétiques d'avoir une réponse vive au stress. Il faut donc rester vigilant et standardiser au mieux la population étudiée.

6. LE TEMPÉRAMENT

LE TEMPÉRAMENT DE L'ANIMAL

Les animaux perçoivent en permanence des stimuli de leur environnement, externe et interne. Ces stimuli sont très variés et engendrent des réponses qui le sont également. Cette variabilité des réponses s'explique notamment par des facteurs génétiques (espèces, race, sexe,...) et par la diversité des situations rencontrées, de l'état émotionnel de l'individu qui perçoit les stimuli, de son expérience passée,... Au sein d'une même espèce, lors d'une situation semblable, des individus génétiquement proches et d'expériences passées voisines peuvent encore réagir de façon différente à un stimulus identique. Le tempérament de l'individu peut être envisagé comme responsable de cette variabilité. Cette notion de tempérament n'est utilisée pour décrire l'animal que depuis les années 1930, alors que les études réellement basées sur cette question ne se développent qu'à partir des années 1990. L'homme s'intéresse au tempérament de l'animal parce que celui-ci peut servir de modèle aux théories de personnalité humaine. L'étude comparative du tempérament chez diverses espèces aide également à comprendre les mécanismes de l'évolution

(Gosling et al., 1999). L'étude du tempérament de l'animal peut de surcroît avoir des implications pratiques en permettant de prédire ses comportements, de sélectionner les individus selon leurs aptitudes et d'orienter leur utilisation future. Ces études se développent dans le domaine des animaux dits de production, comme les bovins (Muller et al., 2006) ou les porcs (Melotti et al., 2011) et des animaux dits de compagnie comme le chien (Hennessy et al., 2001; Jones et al., 2005; Gosling et al., 2009) ou le cheval (Seaman et al., 2002; Lansade, 2005; Lloyd et al., 2008).

Nous préférons utiliser le terme « tempérament » plutôt que « personnalité » dans le cadre d'études sur le cheval, car comme le suggèrent Jones et Gosling (2005) le terme anglo-saxon « *temperament* » est plus souvent utilisé lors d'études concernant des animaux ou des nouveaux-nés, alors que le terme « *personality* » est réservé aux études sur les enfants ou les adultes (Jones et al., 2005). Le tempérament peut être défini comme un concept global, composé de plusieurs dimensions. Les dimensions sont définies comme des « *caractéristiques comportementales stables dans le temps et entre les situations* » (Lansade et al., 2010).

LA STRUCTURE DU TEMPÉRAMENT ET LES QUESTIONNAIRES

Le modèle théorique du tempérament le décompose en dimensions, qui elles-mêmes se décomposent en traits, exprimés par des états (comportements) (modèle hiérarchique proposé par Eysenck (1967) dans (Lansade, 2005)). « *Le trait désigne une propension à manifester un type d'état dans des situations similaires* » et « *la dimension se définit à partir de la corrélation de plusieurs traits entre eux* ». « *Les dimensions sont théoriquement indépendantes entre elles* » (Lansade, 2005).

Les dimensions et les traits dont est composé le tempérament ou la personnalité ont fait l'objet de nombreuses études, d'abord dans le domaine de la psychologie humaine.

La composition de la structure de la personnalité la plus largement acceptée chez l'humain est le modèle des cinq facteurs (FFM) (Costa et al., 1992; Plaisant et al., 2005). Les cinq grandes dimensions de ce modèle sont acceptées comme la taxonomie empiriquement stable et efficace des traits de la personnalité humaine (hors pathologie psychologique). Ces cinq dimensions sont : l'Extraversion (énergie, enthousiasme, vs introversion), l'Agréabilité (altruisme, affection, vs hostile), la Conscience (caractère consciencieux, capacité à se contraindre, contrôle de soi, vs impulsivité), l'Ouverture (originalité, ouverture d'esprit, vs fermé à l'expérience, étroitesse d'esprit) et le Névrosisme (nervosité, affectivité négative, vs stabilité émotionnelle positive) (Gosling et al., 1999). Les définitions de ces 5 dimensions sont proposées par John et Srivastava (1999) in (Plaisant et al., 2005) : « *L'extraversion implique une approche enthousiaste du monde matériel et social incluant des traits comme la sociabilité, l'action, l'affirmation de soi et les émotions positives. L'agréabilité oppose une approche communautaire et sociale tournée vers les autres avec son contraire. [...] La conscience décrit le contrôle socialement autorisé des impulsions qui*

facilitent un comportement orienté vers une tâche ou un but. [...] Le névrosisme oppose une stabilité émotionnelle et une humeur égale avec des émotions négatives. [...] L'ouverture décrit la largeur, la profondeur, l'originalité et la complexité de la vie mentale et des expériences de l'individu ». Le tempérament ne peut être réduit à ces 5 dimensions, mais elles représentent toutefois une généralisation de la structure du tempérament et sont utilisées dans beaucoup de recherches empiriques. Ces 5 dimensions ont une base génétique et sont stable chez l'adulte (Plaisant et al., 2005).

Diverses études ont testé ces 5 dimensions chez les animaux (Gosling et al., 1999; Gosling, 2001; Gosling et al., 2002; Gosling et al., 2007; Mehta et al., 2008). Ces questionnaires ont été adaptés et testés pour évaluer le tempérament du cheval (Morris et al., 2002a; Morris et al., 2002b). Chez le cheval domestique, les dimensions les plus représentatives du tempérament sont le névrosisme (anxiété, nervosité, propension à la peur, sentiment d'insécurité,...) et l'extraversion (sociable, gai, participatif, intrépide, compétitif, fier, intelligent, meneur,...) (Morris et al., 2002a; Momozawa et al., 2005; McGrogan et al., 2008).

D'autres études sur le tempérament des animaux existent : Stevenson Hinde et al. (1978 et 1980) dans (Lloyd et al., 2007) nous proposent une approche du tempérament basée sur des traits définis par adjectifs comportementaux (BDAs : *behaviourally defined adjectives*). Cette méthode a été initialement proposée pour les macaques rhésus et a ensuite été adaptée pour l'évaluation du tempérament d'autres espèces. Cette approche est flexible car elle utilise des adjectifs qui peuvent être facilement adaptés à diverses espèces. Lloyd et al. (2007) ont utilisé ces BDAs pour évaluer le tempérament des chevaux domestiques. Leurs résultats décomposent la structure du tempérament du cheval en 6 dimensions. Parmi les 30 BDAs, ils n'en valident que 25 pour les chevaux. Cinq BDAs ont été rejetés du questionnaire car ils sont difficilement appréciables chez le cheval, soit parce que le vocabulaire est non adapté à l'espèce équine, soit parce que la situation dans laquelle les chevaux sont observés ne permet pas d'observer les comportements liés à ces BDAs. Une analyse en composante principale de leurs résultats permet de montrer que les 6 dimensions expliquent 79,3% de la variance totale du tempérament. Ces 6 dimensions, utilisées dans ce questionnaire HPQ (Horse Personality Questionnaire), validé pour le cheval par Lloyd et al. (2007), sont appelées : la dominance, l'anxiété, l'excitabilité, la protection, la sociabilité et la curiosité. Les dimension se définissent selon des traits de tempérament. La dimension 'dominance' est définie par les traits agressif (+), excentrique (+), indépendant (+), équilibré (-), irritable (+), subalterne (-), fiable (-) et obstiné (+). La dimension 'anxiété' est définie par les traits craintif (+), peureux (+), manque d'assurance (+), crispé (+) et méfiant (+). La dimension 'excitabilité' est définie par les traits actif (+), lent, calme (-), nerveux (+) et intelligent (+). La dimension 'protection' est définie par les traits maternel (+), compréhensif (+) et protecteur (+). La dimension 'sociabilité' est définie par les traits taquin (+), populaire (+) et social (+). Et enfin la dimension 'curiosité' est définie par les traits curieux (+) et opportuniste (+).

Il y a des points communs entre la méthode dérivée des '*big five*' (Morris et al., 2002b) et celle du HPQ (Lloyd et al., 2007). Le facteur 'névrosisme' de la première méthode correspond à l'"anxiété" de la seconde (items relatifs à la peur et à l'insécurité). Le facteur 'extraversion' est proche de la 'sociabilité', le facteur 'agréabilité' proche de celui de 'dominance' et l'"ouverture" est proche de la 'curiosité'. Le questionnaire HPQ, développé pour les chevaux par Lloyd et al. (2007), est fiable et les termes utilisés dans les items sont définis par des comportements qui sont faciles à comprendre et à interpréter par les propriétaires et les personnes s'occupant de chevaux (Lloyd et al., 2007).

Toutefois, que cela soit avec la méthode dérivée de Stevensen-Hinde et al. (1980) ou celle dérivée des '*big five*' (Costa, 1992), les auteurs s'accordent sur le fait que certains facteurs ne sont pas applicables aux chevaux. En effet, certains traits du tempérament adaptés à l'humain ou aux macaques rhésus sont intéressants mais difficiles à apprécier chez un cheval. C'est le cas de « l'ouverture d'esprit » ou de la « conscience ». Les termes utilisés pour déterminer ces traits sont difficilement applicables au cheval (rêveur, sens moral, questionnement au sujet de la nature de l'univers, bien organisé...). Le trait concernant le caractère agréable du cheval est également difficilement évalué car ils dépendent des liens existant entre l'évaluateur et le cheval (Lloyd et al., 2007).

Les premières évaluations du tempérament des équidés par des questionnaires ont été réalisées pour déterminer le tempérament d'ânes (French, 1993), puis des chevaux (Le Scolan et al., 1997; Anderson et al., 1999; Morris et al., 2002a; Morris et al., 2002b; Seaman et al., 2002; Momozawa et al., 2003; Momozawa et al., 2005; Momozawa et al., 2007). Les questionnaires de ces études sont remplis par des personnes familières ou non du cheval, selon les comportements habituels du cheval ou selon les comportements observés lors d'un test, par une ou plusieurs personnes... Les méthodes sont très variées, les résultats obtenus également.

L'avantage des questionnaires décrits ci-dessus, remplis par les propriétaires, est qu'ils se basent sur des observations à long terme. Ils permettent également d'évaluer simultanément plusieurs traits de tempérament. Les inconvénients sont qu'ils sont soumis à la subjectivité des personnes qui les remplissent. Pour une évaluation complète et globale du tempérament, la personne questionnée doit avoir suffisamment côtoyé le cheval (Lansade, 2005). Les questionnaires peuvent cependant être adaptés pour mesurer divers traits de tempérament, selon le degré de familiarité de la personne et du cheval (propriétaire, palefrenier, vétérinaire, observateur étranger,...) et également selon la situation observée (milieu naturel, hospitalisation, compétition...).

LE TEMPÉRAMENT DÉTERMINÉ PAR L'OBSERVATION DE COMPORTEMENTS

Les animaux peuvent être observés dans leur milieu de vie, qu'il soit naturel, semi-naturel ou artificiel. On peut également observer l'animal dans des situations particulières. Les comportements exhibés lors de ces tests aident à déterminer les tendances du tempérament du cheval. Ces tests sont nombreux et les comportements observés, ainsi que les traits de tempérament qu'ils permettent d'identifier varient selon les espèces. Certains de ces tests sont adaptés au cheval et permettent d'évaluer un ou plusieurs traits de tempérament. En général les études utilisent un ou plusieurs tests comportementaux et ils se déroulent l'un à la suite de l'autre ou combinés (McCann et al., 1988; Le Scolan et al., 1997; Visser et al., 2001; Visser et al., 2003a; Forkman et al., 2007; Lesimple et al., 2011) .

Les tests les plus utilisés chez le cheval sont le test « *open-field* », le test « de l'objet nouveau », les tests de mise en présence d'un humain passif ou actif, les tests de manipulation, de vigilance, de sensibilité tactile,... Ils permettent de déterminer des traits de tempérament tels que la propension à la peur, la réactivité émotionnelle, la curiosité,... Aucun de ces tests ne peut cependant définir l'ensemble des traits qui composent le tempérament du cheval. Et selon Seaman et al. (2002), ils ne peuvent pas non plus prédire la réaction qu'un cheval aura dans une autre situation (Seaman et al., 2002).

LE TEST DE L'OPEN-FIELD

Le test de l'*open-field* est conçu au départ pour mesurer des comportements chez le rat tels que la peur ou la réactivité émotionnelle. La réactivité émotionnelle est une caractéristique propre à l'individu qui décrit sa réaction face à des événements perçus comme menaçants pour son intégrité, elle décrit la propension à manifester des réactions de peur (Lansade, 2005). C'est la « *disposition à ressentir des émotions, ou à différencier les individus réagissant plus rapidement et plus intensément à un stimulus effrayant des individus à réactions plus lentes et moins intenses* » (Vandenhede, 1996).

Lors du test de l'*open-field*, l'animal est placé dans un espace nouveau, de grande taille. Les réactions du rat, augmentation des défécations et de l'activité, sont interprétées comme étant des mesures de la peur de l'animal face à la nouveauté ou à la grandeur de l'espace proposé. Des recherches plus récentes suggèrent que les comportements exhibés par le rat varient selon les motivations, réactions telles que le « *freezing* » (immobilisation) provoqué par la peur, l'exploration, l'envie de s'échapper et l'isolement social (Rushen, 2000). Le test de l'*open-field* est souvent utilisé pour évaluer le stress des animaux domestiques. L'interprétation des résultats de ce test reste toutefois délicate. Certains auteurs attribueront au degré d'activité lors du test de l'*open-field* de la « nervosité », alors que d'autres auteurs y mesureront la « motivation locomotrice ». Les comportements exhibés lors de ces tests, que cela soit chez les rongeurs ou chez les animaux domestiques, semblent en fait plutôt résulter

d'un mélange de plusieurs motivations telles que la tendance à se déplacer, à explorer et/ou à avoir peur (Rushen, 2000).

Le test est initialement prévu pour des rongeurs, habitués à vivre en cage ou dans des espaces réduits : il n'aura donc pas le même effet sur le cheval, plus habitué aux grands espaces (manège, pâture...). Cette confrontation à un grand espace, élément stressant pour un animal-proie habitué à fuir dans le sous-sol (rongeurs), permet bien de mesurer la peur. Ce ne sera donc pas le cas pour un grand herbivore comme le cheval, qui lui exprimera d'avantage des comportement de stress et de peur lors d'un test de confinement. Le test de l'*open-field* n'est donc pas valide pour évaluer la peur chez le cheval (Forkman et al., 2007). Nous garderons le nom de test open-field pour décrire un test réalisé dans un endroit où le cheval à une relative *liberté* de mouvement (d'avantage que lorsqu'il est confiné dans une stalle). Le lieu dans lequel le cheval est testé peut être connu ou inconnu. Dans le cas du lieu inconnu, le test évalue également la réaction à la nouveauté du lieu (Lansade, 2005). Ces tests sont nommé « *test en liberté* » (Hausberger et al., 2002) ou « *arena test* » (Forkman et al., 2007) dans d'autres études. Pour le cheval domestique, ils évaluent donc plutôt la *motivation locomotrice* et la *motivation sociale* que réellement la *peur* ou la *nervosité* (Mal et al., 1991; Bagshaw et al., 1994).

En pratique, l'*open-field* consiste à isoler un cheval dans un endroit connu ou inconnu (par exemple un manège, une piste). Les comportements notés seront : l'activité locomotrice (immobile, marche, trot, exploration), la position de la queue, les comportements d'élimination (défécations et mictions) et les vocalisations. Le temps passé dans l'arène varie entre 5 et 20 minutes selon les cas (Forkman et al., 2007).

LE TEST DE L'OBJET NOUVEAU

Ce test est réalisé dans une arène, inconnue ou après habituation préalable du cheval au lieu (un jour précédant ou quelques minutes avant apparition de l'objet). Le stimulus proposé au cheval est un objet qui varie selon les études (parapluie, ballon...). Comme dans le test de l'*open-field*, le cheval est testé seul. Les comportements encodés sont ceux du test de l'*open-field* (locomotion, position du corps...) additionnés de comportements relatifs à l'intérêt que le cheval porte à l'objet : latence de contact, distance de l'objet, fréquence et durée des contacts, comportements d'exploration... (Forkman et al., 2007). Diverses études ont utilisé ces tests avec des méthodologies différentes, lieu connu ou inconnu, objet statique ou apparition soudaine (Le Scolan et al., 1997; Wolff et al., 1997; Visser et al., 2001; Seaman et al., 2002; Momozawa et al., 2003; Górecka et al., 2007; Visser et al., 2008a). Ces tests visent principalement à mesurer la propension du cheval à réagir à la nouveauté.

Le principal problème d'interprétation de ce test est qu'en plus de mesurer la propension à réagir à la nouveauté, il mesure également la réaction à l'isolement et la motivation locomotrice. Il faut également noter que des comportements actifs tels que

les interactions avec l'objet sont assez claires, tandis que les comportements passifs peuvent être plus difficiles à interpréter : un cheval indifférent, peu curieux et un cheval peureux mettront tous les deux beaucoup de temps à approcher l'objet (Forkman et al., 2007). D'autres comportements peuvent cependant aider à différencier ces 2 traits de tempérament. Des mesures physiologiques peuvent également aider à discerner l'indifférence de la peur.

LE TEST DE MANIPULATION

Tous les tests de manipulation impliquent la présence d'un humain et donc combinent l'effet de la manipulation à celui de la peur de l'homme (Forkman et al., 2007). Ces tests sont très variés. Ils s'inspirent la plupart du temps de manipulations classiquement rencontrées en élevage, telles que les manipulations vétérinaires, la pause d'un tord-nez, le passage sur une balance, la montée dans un camion... Les variables enregistrées lors de ces tests sont relatives à la facilité avec laquelle ces manipulations se déroulent : nombre de tentatives, durée des essais... ainsi que les réactions du cheval envers la contrainte : mouvements du corps (tête, pieds), tensions musculaires, et éventuelles vocalisations, défécations. Ces tests peuvent être intéressants et apporter beaucoup à l'étude du tempérament mais les résultats varient fortement selon le type de manipulation, l'implication de l'homme dans la procédure (Forkman et al., 2007), la relation préexistante entre l'homme et le cheval ainsi que la réponse de l'homme aux réactions exprimées par le cheval pendant le test. Plus les tests sont complexes, plus leur standardisation demande de l'attention. Contraindre un animal-proie comme un cheval peut être associé à l'attaque d'un prédateur, ou du moins la réduction de sa possibilité de fuir. Les résultats peuvent varier fortement selon le niveau de contention durant la manipulation mais également selon l'expérience que le cheval a des manipulations.

LES TESTS COMPORTEMENTAUX ET LA MOTIVATION SOCIALE DU CHEVAL

Lors des tests comportementaux, les chevaux sont testés seuls, avec possibilité ou non d'avoir des contacts visuels, auditifs ou olfactifs avec leurs congénères. Ces situations peuvent influencer fortement les résultats des tests. Le cheval étant un animal grégaire, il faudra tenir compte de sa motivation sociale. L'envie que le cheval aura de rejoindre ses congénères va modifier ses comportements. Par exemple, un cheval à forte motivation sociale, isolé dans une arène, passera beaucoup de temps à hennir, à explorer l'arène et/ou à attendre devant la porte qui mène vers les autres chevaux. Si, dans l'endroit dans lequel le cheval est testé, persiste l'odeur de ces congénères, le cheval passera beaucoup de temps à flairer le sol. Lors du test de l'objet nouveau, les comportements sociaux vont interférer avec les comportements de curiosité, d'exploration de l'objet. Donc, lors de tests évaluant des traits autres que l'attraction sociale, il faudra essayer de limiter la motivation sociale ou de standardiser la situation dans laquelle se déroulent les tests.

CORRÉLATIONS ENTRE QUESTIONNAIRES ET TESTS COMPORTEMENTAUX

Les traits du tempérament déterminés par les questionnaires correspondent-ils aux comportements que le cheval exprime lors des tests ? Les questionnaires utilisés lors des études sont souvent différents et la façon dont les tests sont réalisés varie également. C'est pourquoi il n'est pas étonnant de voir que les résultats divergent et sont même parfois contradictoires. Alors que certaines études ne trouvent pas de corrélation entre comportement lors des tests et scores obtenus dans les questionnaires (Seaman et al., 2002; Visser et al., 2003a), d'autres mettent en évidence certaines relations entre des traits de tempérament et des comportements observés (Momozawa et al., 2003; Visser et al., 2003a; Górecka-Bruzda et al., 2011). Lloyd et al. (2007) trouvent également des corrélations significatives entre les composantes du tempérament évaluées par le HPQ et des observations comportementales.

Dans leur étude, Anderson et al. (1999) n'obtiennent pas de corrélation fiable entre la réactivité, le tempérament et les concentrations en cortisol sanguin. Par contre, l'analyse plus profonde de leurs résultats indique qu'il y aurait une possibilité de prédire le tempérament grâce à la réactivité et les concentrations en cortisol sanguin. Une seule relation est significative : celle entre la réactivité et le taux d'hormones dans le sang. Les chevaux ayant un score de réactivité élevé ont un taux de cortisol sanguin plus élevé que ceux qui obtiennent un score de réactivité faible.

CONCLUSIONS SUR L'APPRÉCIATION DU TEMPÉRAMENT

L'étude du tempérament pourrait nous aider à anticiper les réactions des chevaux lorsqu'ils sont confrontés à des éléments stressants, tels que la nouveauté ou certaines manipulations (Visser et al., 2001; Visser et al., 2003a). Certains auteurs s'intéressent au tempérament pour chercher les causes du développement de comportements anormaux apparaissant en captivité, comme les fréquentes stéréotypies (Nagy et al., 2010). Le tempérament du cheval est également un facteur déterminant en équitation. Les performances réalisées en compétition de saut d'obstacles seraient liées à la condition physique, à l'entraînement du cheval, mais également à son tempérament ; évaluer le tempérament des chevaux permettrait donc de prédire les capacités d'apprentissage (Lansade et al., 2010) et les performances futures (Visser et al., 2001; Visser et al., 2003b). Ces liens entre performances en compétition et tempérament ont également été démontrés chez les humains (Egloff and Gruhn 1996 dans (Lloyd et al., 2007)). En compétition, les cavaliers de haut niveau sont unanimes pour dire que le tempérament de leur cheval est un facteur important de réussite. L'amélioration des performances en compétition est un but en soi mais il est également intéressant de permettre aux responsables de centre équestre (de loisirs ou d'hippothérapie) de choisir leurs chevaux selon leur tempérament, ce qui est déjà le cas dans certains centres équestres. Ceci éviterait

d'utiliser des chevaux trop peureux ou trop nerveux avec des cavaliers débutants (Lansade, 2005), situations à l'origine de nombreux accidents. Vu les liens étroits entre tempérament et comportements exhibés, il est possible de tester la valeur prédictive du tempérament sur les comportements futurs des chevaux. Des questionnaires et/ou des tests comportementaux pourraient être utilisés pour choisir les chevaux et les orienter vers diverses disciplines et ce dès leur plus jeune âge (Lansade, 2005). La sélection des chevaux selon leur tempérament réduirait les coûts pour les entraîneurs et augmenterait le bien-être des chevaux, en évitant de leur infliger des entraînements qui ne leur conviendraient pas (Lloyd et al., 2007). Le fait de pouvoir prédire l'intensité de la réaction comportementale face à une situation stressante, en compétition ou en clinique, et ce grâce à une appréciation préalable du tempérament présente donc un grand intérêt car cela devrait permettre de réduire le nombre d'accidents et d'augmenter le bien-être des cavaliers et de leur montures, et aussi de toute personne amenée à manipuler les chevaux.

7. LA MESURE DU STRESS

Un des objectifs des études sur la biologie du stress est de développer des mesures cliniques du stress et du *distress*. Il faut donc essayer de mesurer les réponses au stress. Le principal challenge technique va être de prélever les échantillons nécessaires à ces mesures sans induire un stress supplémentaire chez le sujet. Ensuite, l'être humain ou l'animal dispose de quatre systèmes de défense au stress, mais il ne va pas nécessairement les utiliser tous les quatre (voir chapitre « Les réponses au stress », p.28). Il n'existe pas de réponse non-spécifique applicable à n'importe quel élément stressant, comme le pensait Selye (1907-1982) lorsqu'il a étudié l'effet du stress sur des rats de laboratoire. Divers éléments stressants vont provoquer des réponses biologiques très variées. Dès lors, si nous utilisons ces différents systèmes pour diagnostiquer la présence d'un stress, nous devons utiliser des mesures spécifiques pour chaque élément stressant. Il est difficile d'évaluer quels systèmes de défense sont mis en place lors d'un stress. Mais nous devons nous rappeler que ce qui est important en terme de bien-être animal, ce n'est pas de savoir quelle défense est enclenchée, mais bien quels changements sont induits au niveau des fonctions biologiques et quels peuvent être leurs impacts sur le bien-être de l'animal.

Diverses méthodes ont été envisagées : endocrinologie, éthologie, neurologie, immunologie..., mais malheureusement, aucune n'est décisive en termes de mesure de stress. Une des raisons de cet échec réside dans le fait que le terme *stress* a été employé dans de nombreuses situations qui sont difficiles à standardiser. Il serait déraisonnable de penser qu'une seule mesure pourrait permettre d'évaluer le stress engendré par des éléments stressants de natures très diverses. De plus, certains systèmes peuvent réagir de la même manière, qu'ils soient face à des stimuli stressants ou inoffensifs. Par exemple, le cortisol circulant (voir chapitre « La réponse neuroendocrine au stress » p.56) d'un étalon verra sa concentration sanguine

augmenter de la même façon lorsqu'il est contraint, en plein exercice, ou autorisé à s'accoupler avec une jument (Colborn et al., 1991b). En termes de bien-être, il est délicat d'associer les effets de la contrainte à ceux de l'accouplement. Cet exemple illustre bien les difficultés rencontrées lorsqu'on se contente d'une seule mesure physiologique pour différencier un stress non menaçant d'un *distress*.

L'évaluation du stress par les réponses physiologiques qu'il induit, telle que la mesure du cortisol plasmatique, est encore plus délicate lorsque l'on sort du laboratoire. Le prélèvement de ces mesures lui-même peut induire un stress, ce qui va influencer l'interprétation des résultats (Cook et al., 2000). Une autre difficulté rencontrée va être la variabilité interindividuelle de la réponse au stress (ontogenèse, tempérament, génétique...). Le fait que différentes pathologies apparaissent chez des animaux confrontés à un même stress, est dû au fait que leurs réponses au stress seront différentes. Toutes ces difficultés rencontrées – que mesure-t-on réellement ?, un bon stress ou un mauvais stress ?, le stress est-il lié au prélèvement ? ou les problèmes de variabilité inter-animal – sont décourageantes et certains seront dès lors tentés de conclure qu'il est impossible de mesurer le *distress* chez l'animal. Cependant, l'impact du stress sur le bien-être animal est tellement important que l'on ne peut l'ignorer. Il y a beaucoup de controverses au sujet de la définition de bien-être animal, mais personne ne contredit le fait qu'être sous l'influence d'un stress important et/ou de longue durée, et qui dépassera les capacités d'adaptation de l'individu, peut avoir un effet délétère sur le bien-être. Malgré les problèmes associés à la mesure du stress et à la définition du *distress*, nous voulons continuer à développer notre compréhension des mécanismes biologiques de réponse au stress.

MESURE DU BIEN-ÊTRE

Les études travaillant sur les indicateurs de bien-être/mal-être sont très proches de celles tentant de mesurer le niveau de stress (voir chapitre « Le coût biologique du stress et son impact sur le bien-être animal », p.29). Dans une récente synthèse, Fureix et al. (2010) rassemblent des mesures multidimensionnelles du mal-être du cheval domestique. Ils classent celles-ci en trois catégories. (1) Les indicateurs sanitaires (obésité, plaies, boiteries, troubles gastro-intestinaux, problèmes vertébraux, pathologies,...) peuvent être observés par un vétérinaire ou par les personnes s'occupant quotidiennement des chevaux. (2) Les indicateurs comportementaux comprennent des mesures qualitatives, comme la présence ou l'absence de certains comportements (agressivité, stéréotypies (Mason et al., 2004), apathie (Hall et al., 2008),...) et des mesures quantitatives de modification du budget temps du cheval comme une diminution du temps passé à s'alimenter, une diminution du temps passé couché, une augmentation du temps passé à exhiber des comportements anormaux ou agonistiques (Fureix et al., 2010). (3) Les indicateurs physiologiques (la fréquence cardiaque (p.72), le taux de cortisol (p.57),...).

VERS UNE ÉCHELLE DU STRESS

On pourrait penser qu'il existe un continuum entre mal-être et bien-être, entre l'*eustress* et le *distress*, et que le bien-être et le stress pourraient se mesurer sur une échelle linéaire. Des études montrent que ce continuum n'est pas toujours observable. C'est le cas par exemple pour la sensibilité de l'axe HPA (décrite dans le chapitre « Généralités et axe HPA », p.56) lors de stress chronique. Selon les cas, l'exposition à un stress chronique augmente ou diminue la sensibilité de l'axe à l'ACTH, ce qui donne des résultats très opposés : une augmentation ou une diminution du taux de cortisol sanguin (Ladewig, 2000). Il est également difficile de décrire la réponse comportementale selon un continuum. Face à un prédateur un animal peut avoir le choix entre la fuite ou l'attaque, deux comportements qui s'opposent. Ces deux comportements pourraient être mesurés sur un continuum comparant l'énergie requise et dès lors être tous deux représentatifs d'un stress intense. Mais face à un stress intense comme la prédation, certains oiseaux vont répondre par le *freezing*. Si le stress est mesuré avec l'échelle de l'énergie requise, la prédation de ces oiseaux serait considérée comme peu stressante (Veissier et al., 2007) !

LE PHÉNOMÈNE DE RÉSIGNATION ACQUISE OU '*LEARNED HELPLESSNESS*'

Lors de situations stressantes, on peut également observer des comportements tels que l'apathie, la baisse de réactivité, l'anhédonie (perte de la capacité à ressentir des émotions positives) (Hall et al., 2008), comparables à ceux rencontrés lors d'une dépression chez l'homme. Par exemple, des chevaux ont été observés au box avec une attitude « figée » (immobilité, yeux ouverts, regard fixe) et avec des taux de cortisol faibles, tout en étant dans des conditions défavorables au niveau du bien-être (Fureix et al., 2010). Ces observations ont également été faites chez les bovins (voir chapitre « La réponse face à un stress chronique », p.64) (Mormède et al., 2007). Cette « inversion » de tendance de la réponse comportementale ou physiologique est une des principales difficultés pour mesurer les stress chroniques. Alors que la situation stressante se maintient, l'intensité de la réponse au stress diminue (par exemple la concentration en cortisol chute, les comportements locomoteurs et la réactivité diminuent). Ceci peut s'expliquer par le fait que l'animal n'a pas de contrôle sur la situation, qu'il ne peut la modifier, ni y échapper (problèmes principalement rencontrés en captivité, lorsque l'animal est contraint, enfermé, isolé). L'animal apprend que ses réactions à l'encontre de la situation sont inutiles et il se résigne (Hall et al., 2008). Cette situation est appelée "*learned helplessness*" (résignation ou détresse acquise). Cette résignation a été observée notamment chez les chiens et les rongeurs de laboratoire : si l'animal est dans une situation d'apprentissage mais que l'aboutissement (par exemple punition ou récompense) est indépendant du comportement qu'il exhibe, il sera démuni et résigné lorsque la situation se représente. Cette "*learned helplessness*" est une adaptation qui semble logique : si les comportements exprimés n'influencent pas les conséquences, il ne sert à rien de sans

cesse chercher d'autres stratégies, car malgré l'effort fourni, l'issue sera la même (Hall et al., 2008). Mais cette résignation, même si elle diminue la réponse au stress, ne peut être considérée comme une amélioration du bien-être car le stress est toujours présent, et la modification des comportements entraîne une perte de motivation, voire de l'anhédonie. L'impact sur la santé de ces situations dont l'animal ne peut s'extraire est également important (perte de poids, ulcères gastriques...) (Hall et al., 2008).

Cette résignation acquise peut s'observer chez les chevaux à l'entraînement. En équitation, le terme « *broken* » est utilisé pour décrire un cheval débourré. Le terme « *horse breaking* » est utilisé pour décrire le début de l'éducation d'un cheval. Dans certains cas, l'incohérence des ordres donnés et des punitions subies ne permet pas au cheval de savoir quels comportements adopter pour éviter la punition (Ödberg, 1987). En équitation, le cheval est souvent jugé bon à être monté lorsqu'il a cessé de résister et qu'il se résigne (Hall et al., 2008). Soit le cheval accepte la situation et se résigne, soit il se bat et refuse d'obéir. Dans ce dernier cas apparaissent des comportements dangereux, dits « agressifs ». Ces chevaux font partie de ceux que l'on retrouve à l'abattoir, parfois très jeunes, pour des problèmes de comportement (Ödberg, 1987; Ödberg et al., 1999). La réactivité d'un cheval résigné face à un stimulus stressant est très faible. L'anxiété sera remplacée par de la dépression (« *emotional depression* », passif, démotivé, déprimé) (Hall et al., 2008). Les chevaux dits « de manège » sont considérés comme paresseux, non-réactifs, fainéants. Selon cette théorie, ils auraient vécu de nombreuses expériences négatives de cavaliers inexpérimentés et se seraient résignés.

À l'inverse de la résignation, permettre au cheval d'avoir un certain contrôle de son environnement (hébergement en groupe, extensif, enrichissements de l'environnement physique...) diminuerait le stress, réduirait l'anxiété et faciliterait l'apprentissage (Hall et al., 2008).

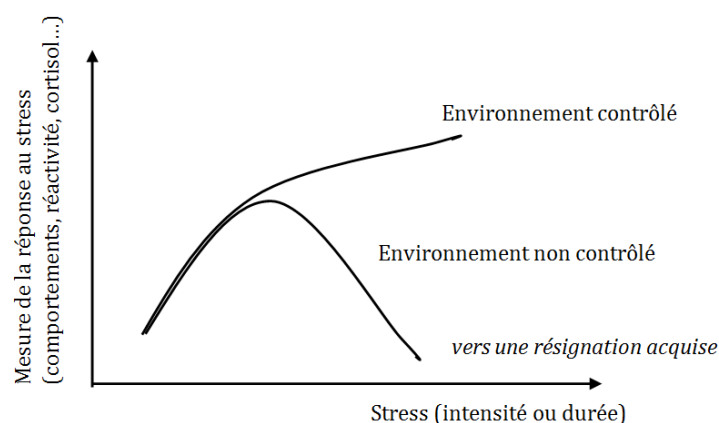


Figure 2 : Graphe théorique de l'influence du contrôle de l'environnement sur l'évolution de la réponse au stress selon son intensité ou sa durée

Nous allons développer plus en profondeur deux mesures du stress que nous avons privilégiées dans notre approche chez le cheval : la réponse comportementale (ci-dessous) et la réponse neuroendocrine (p.56).

8. LA RÉPONSE COMPORTEMENTALE AU STRESS

La réponse comportementale est considérée comme la première que l'animal va mettre en place. Rapide et efficace, elle va modifier les comportements habituels en cours. Fuir un prédateur, rentrer dans son nid pour se réchauffer, chercher de l'eau pour s'hydrater... tous ces comportements peuvent permettre rapidement, et pour un faible coût biologique, de sortir de la situation stressante. Si l'animal a la capacité de réagir par un comportement approprié, les effets délétères en termes de santé seront négligeables. Il peut cependant arriver que l'animal soit incapable d'exprimer les comportements nécessaires pour sortir de la situation stressante. Cette incapacité peut venir d'une contrainte imposée par l'homme (élevage, confinement) ou d'une pathologie.

Avant d'observer un animal confronté à un ou plusieurs éléments stressants, il est important de connaître l'éthogramme de l'animal. L'observation de perturbations dans la répartition quantitative des comportements peut être le signe que l'animal souffre, que son état de bien-être est altéré (Broom, 1991; Vandenheede, 2003). La détermination des comportements de stress exprimés par l'animal est complexe. Il est important, pour interpréter un comportement comme indicateur de stress, de comprendre les mécanismes sous-jacents dont ils découlent (Rushen, 2000). Les réponses comportementales sont spécifiques à l'élément stressant qui les déclenche. Une réponse comportementale au stress généralisée, qui se produirait lorsque l'animal est confronté à n'importe quel élément stressant, n'existe pas. Ce fait rend donc difficile l'utilisation des réponses comportementales pour évaluer et comparer l'intensité de stress induits par différents éléments stressants. Les réponses comportementales peuvent néanmoins être des indicateurs qualitatifs, informant du type d'élément stressant rencontré (Rushen, 2000).

Les comportements observés lors de la présence d'un élément stressant ont souvent été comparés avec des mesures physiologiques ou immunologiques du stress. Les corrélations obtenues entre des observations comportementales et des évaluations physiologiques du niveau de stress peuvent s'expliquer par le fait que l'on sait maintenant que les réponses comportementales et physiologiques au stress semblent être contrôlées, au moins en partie, par le même système neuroendocrine (Rushen, 2000). Des études se sont plus particulièrement intéressées à la relation entre comportements et axe HPA. Par exemple, une étude sur les rats en laboratoire démontre qu'un rat, qu'il soit en présence d'un élément stressant ou que son axe HPA ait été stimulé artificiellement (par injection cérébrale de CRH), exprime une augmentation des comportements locomoteurs (Morimoto et al. 1993 in (Rushen, 2000)). Des manipulations du système neuroendocrine nous permettent, en

observant les modifications comportementales qu'elles déclenchent, de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents qui gouvernent les réponses comportementales au stress. Mais on ne peut simplifier ce lien entre comportement et physiologie en disant que l'axe HPA contrôle et modifie les comportements. En effet, les liens qui existent entre mécanismes motivationnels, sécrétions de CRH et réactions émotionnelles de l'animal ne sont pas encore bien étudiés. Les comportements peuvent aussi à leur tour provoquer des modifications du système neuroendocrine (Rushen, 2000).

LES FACTEURS INFLUENÇANT LA RÉPONSE COMPORTEMENTALE

Les réponses comportementales peuvent varier selon l'environnement interne de l'animal (statut hormonal, pathologie), selon ses émotions, son tempérament, mais également selon l'environnement externe (situations, contacts sociaux,...). De nombreux facteurs déterminent l'apparition des comportements : l'espèce, l'âge, la génétique (Bagshaw et al., 1994), le développement, les motivations, l'expérience passée, l'apprentissage, l'environnement ainsi que de l'élément stressant lui-même (Toates, 2000; Veissier et al., 2007).

L'apparition d'un comportement dépend également du tempérament de l'individu et de sa motivation à exhiber ce comportement. Le chapitre « Le tempérament » y est consacré (p.38). Les systèmes motivationnels sont complexes et rendent donc difficile l'évaluation quantitative du stress induit par une situation particulière. En effet, le comportement exhibé et son intensité semblent dépendre de l'interaction entre divers systèmes motivationnels qui se battraient pour le contrôle du comportement. Le comportement exhibé reflète donc un mélange de ces motivations (Rushen, 2000).

LES COMPORTEMENTS ASSOCIÉS AU STRESS

Les réponses comportementales produites lors de certains stress, dont les stress aigus qui provoquent la peur chez l'animal, dérivent, du moins en partie, des comportements d'évitement du prédateur (Rushen, 2000). Les réponses comportementales à ce type de stress sont adaptatives et s'articulent autour de deux modes opposés, le mode passif (*freezing*) et le mode actif (*fight/flight*). Ils dépendent de la génétique de l'individu ainsi que de son expérience passée. Les réponses d'anti-prédation sont graduelles, la première d'entre elles étant d'être capable de détecter rapidement le prédateur. Pour les animaux-proies, les comportements de vigilance consisteront à surveiller régulièrement l'environnement. L'animal optimisera son temps de vigilance selon les situations rencontrées. Le partage des ressources utilisées pour rester vigilant et pour les autres fonctions biologiques (alimentation, reproduction...) dépendra du risque de prédation et des motivations à exprimer ces autres comportements. La vigilance va donc dépendre des niveaux de perception du stress par l'animal et de ses conflits motivationnels (Rushen, 2000). Les comportements de vigilance individuelle chez des animaux en liberté seront inversement proportionnel au nombre d'individus formant le groupe (meilleure

détection du prédateur et diminution du risque de prédation). L'isolement peut donc augmenter très fort cette motivation à exprimer les comportements de vigilance.

Les comportements relatifs à la communication intra-spécifique (comme les vocalisations) sont également souvent utilisés pour évaluer le stress. La fréquence mais également l'intensité, l'amplitude, la variabilité et la structure acoustique des vocalisations sont étudiées chez diverses espèces pour différencier les types d'éléments stressants, leurs intensités mais également l'état motivationnel de l'animal (Rushen, 2000). Les vocalisations varient fortement selon le type d'élément stressant. Chez les animaux grégaires, une séparation de leurs congénères occasionnera généralement plus de vocalisations qu'un autre stress qui semblerait pourtant plus sévère (contrainte, famine...).

STRESS ET STÉRÉOTYPIES

Les stéréotypies provoquées par un stress sont des *“répétitions de séquences comportementales simples et invariables, exprimées pendant longtemps, sans objectif apparent. Elles sont considérées comme des comportements anormaux, symptômes d'inadaptation à l'environnement”* (Ödberg, 1978; Mason, 1991). Les facteurs environnementaux peuvent induire une frustration accompagnée d'une augmentation de l'excitation et de l'anxiété (par exemple en captivité, l'animal cherchant y échapper). Cette situation provoque l'apparition de comportements (réorientation, substitution) dont le but n'est pas atteint (l'animal court le long de la cage en cherchant la sortie). Si la frustration persiste, le comportement est répété (allées et venues incessantes) et peut se transformer en comportement fixé, automatisé, simplifié, apparaissant indépendamment de la cause de départ et donc inadapté et pathologique (l'animal continuera par exemple ses allers-retours malgré le fait qu'il soit dans un environnement plus vaste) (Ödberg, 1978). Ces comportements varient selon le type de situation frustrante, l'environnement, l'espèce, la race, le tempérament et l'ontogenèse de l'individu.

Mason et Rushen (2006) expliquent également que la stéréotypie est un comportement répétitif induit par la frustration, par l'échec de tentatives d'adaptation et/ou par un dysfonctionnement du système nerveux (Nagy et al., 2009). Les stéréotypies sont fréquentes chez les animaux en captivité, et considérées comme équivalentes aux troubles obsessionnels et compulsifs (« TOCs ») décrits en psychiatrie. Certaines anomalies concernent le comportement alimentaire (pica, boulimie,...), le comportement de toilette (automutilation), social (hyper agressivité), ou encore sexuel (hypo ou hypersexualité)... Diverses situations sont susceptibles de provoquer l'apparition d'une stéréotypie chez le cheval : un inconfort voire une douleur gastrique (associée à une alimentation pauvre en fibres) (Nicol et al., 2002), des contacts sociaux limités (Cooper et al., 2000), une restriction spatiale ou encore des conditions de travail difficiles (Fureix et al., 2010).

Les stéréotypies jouent un rôle important pour l'évaluation du bien-être animal (Mason, 1991; Mason et al., 2004). Selon l'enquête de Mason et Latham (2004), les environnements qui provoquent ou renforcent des stéréotypies sont des environnements sub-optimaux au niveau du bien-être, par exemple lorsque l'animal est confiné, exposé à un environnement nouveau, en présence de stimuli provoquant une frustration, un conflit ou lorsqu'il vit dans un environnement stérile, pauvre en stimuli. Cependant, des stéréotypies peuvent survenir ou augmenter dans des situations qui semblent neutres ou même bénéfiques en termes de bien-être et d'un autre côté, des environnements négatifs peuvent ne pas provoquer de stéréotypies. Mason et Latham (2004) concluent toutefois qu'au niveau du bien-être animal, un système qui induit des stéréotypies est probablement pire qu'un système qui n'en induit pas. Ils ajoutent que la simple fréquence d'apparition des stéréotypies ne peut être utilisée seule comme index de bien-être.

Dans le monde équestre, les scientifiques considèrent les stéréotypies comme synonymes de mal-être (Heleski et al., 2002), et les vétérinaires leur attribuent des effets délétères sur la santé et sur les performances (Nicol, 2000). Ces stéréotypies affectent 5 à 20% des chevaux, toutes races confondues (Gaultier et al., 2005). Pour les éleveurs, elles représentent une baisse de la valeur du cheval et nombreux sont les propriétaires de chevaux qui souhaitent à tout prix voir disparaître ces comportements. Les scientifiques travaillant sur le cheval admettent également que les stéréotypies surviennent suite à une « *distorsion importante entre le mode de vie imposé à l'animal et les impératifs psychobiologiques de l'espèce* » (Gaultier et al., 2005). Des prédispositions génétiques aux stéréotypies existeraient chez les chevaux (Albright et al., 2009; McBride et al., 2009). Le manque de connaissance des comportements équins lors de la pratique de l'équitation induit des conflits qui peuvent provoquer un stress chronique chez les chevaux. Beaucoup de chevaux vivent des stress chroniques parce qu'ils ne comprennent pas comment éviter les punitions (mauvaises communication, punitions incohérentes ou mal ajustées) (Ödberg, 1987).

Tenter de supprimer les stéréotypies par des mécanismes coercitifs, visant à éliminer les symptômes et non les causes, aggraverait la santé mentale de l'animal (Ödberg, 1978) et augmenterait le stress (Nicol, 2000; Nagy et al., 2009). Une des solutions proposées en lutte contre les stéréotypies serait de supprimer les causes de ces troubles, en permettant à l'animal de vivre dans un environnement plus proche de son environnement naturel et ce, dès le début de son développement, car une fois la stéréotypie fixée, le comportement est très difficile à éliminer.

LES COMPORTEMENTS ASSOCIÉS AU STRESS CHEZ LE CHEVAL DOMESTIQUE

Le public est sensibilisé aux situations stressantes extrêmes, comme lors de transport des chevaux vers l'abattoir ou lorsque le cheval est confronté à des abus de la part des cavaliers (épuisement en fin de course, punitions douloureuses pour améliorer le saut,...). Mais le cheval est confronté à d'autres éléments stressants, moins « visibles »

aux yeux de personnes non sensibilisées à l'éthogramme et aux besoins naturels du cheval. Il faut pour cela se rappeler que le cheval, herbivore non ruminant, passe naturellement une partie importante de la journée à se nourrir (12 à 15 heures). Il effectue pour cela de grands déplacements (Hausberger et al., 1999). Il est un animal grégaire et la cohésion sociale est à la base du troupeau. On remarque d'ailleurs que les chevaux supportent difficilement de se séparer de leurs congénères (Kiley Worthington, 1999).

Les facteurs environnementaux pouvant provoquer un stress sont le confinement, la séparation de ses congénères, une alimentation rationnée, trop riche, trop rapidement ingérée, une possibilité de se déplacer ou de fuir insuffisante...

Chez le cheval, le stress est associé à des comportements de peur et de réactivité émotionnelle. En situation stressante, une augmentation des comportements locomoteurs (nombre de pas, vitesse et fréquence des déplacements) et une diminution des comportements de repos (immobilité, appui tripédal, yeux mi-clos ou fermés, tête basse) est observée (Mal et al., 1991; Bagshaw et al., 1994; Harewood et al., 2005; McCall et al., 2006; Werhahn et al., 2011). Le stress de l'isolement augmente la motivation pour le mouvement : augmentation de la distance parcourue et de la fréquence des déplacements au trot lors d'un test *open-field* (Mal et al., 1991), augmentation de l'activité locomotrice lors d'un test d'isolement (Bagshaw et al., 1994). Une augmentation des comportements de repos (immobile relax ou marche détendue) est observée lorsque le cheval a des contacts visuels avec ses congénères (Bagshaw et al., 1994) ou que son environnement est enrichi (Lansade et al., 2011). Par contre, d'autres études, mesurant la peur lors de tests, chez le cheval, obtiennent des résultats inverses avec une augmentation du temps passé immobile interprété comme un signe de peur (Viérin et al., 1998). Il peut s'agir bien entendu d'une stratégie comportementale ("freezing"), éventuellement en relation avec le type de situation effrayante et/ou l'intensité de la peur éprouvée par l'animal.

Les comportements d'alerte, de vigilance (tête relevée, oreilles mobiles, yeux grand ouverts, peu d'appui tripédal, soufflements fréquents (= flairages bruyants en position d'alerte), naseaux dilatés, position haute du corps, frissonnements musculaires) (Bagshaw et al., 1994), augmentent en situation stressante (Viérin et al., 1998; Heleski et al., 2002). Les oreilles vont directement s'orienter vers l'objet qui suscite la vigilance (Haupt et al., 1982). La position en arrière des oreilles serait un indicateur de stress aigu (von Borstel et al., 2009) ou chronique chez le cheval (Fureix et al., 2010). Les oreilles pointées en arrière sont aussi considérées comme un signe d'agressivité (Haupt et al., 1982). La position des oreilles peut également nous aider à savoir vers où le cheval regarde. En effet, vu le champ visuel très large du cheval, il n'est pas toujours facile de savoir où porte son attention. Les oreilles sont un bon indicateur des émotions du cheval, mais leurs mouvements rapides et leur orientation sont difficiles à suivre en continu. Une étude sur le bien-être a montré que des poulains dont les conditions d'hébergement ont été enrichies ont exprimé moins

de comportements de vigilance et, à partir de la 3^{ème} semaine d'enrichissement, ont été moins souvent vus avec les oreilles en arrière (Lansade et al., 2011). Une autre étude montre un lien entre le temps passé « oreilles en arrière » lorsque le cheval est au box et la présence de pathologies chroniques, d'atteintes de la colonne vertébrale et de stéréotypies (Fureix et al., 2010).

La localisation spatiale du cheval peut également refléter des attitudes de vigilance, comme par exemple lors d'un test (Bagshaw et al., 1994) ou dans une de nos études préliminaires, où l'on mesure que le cheval passe plus de temps dans la partie du box proche de la porte (Peeters et al., 2008).

Les comportements de communication intra-spécifique ont également leur importance. Le hennissement est une vocalisation (bouche ouverte) de salutation ou de séparation. Il est le plus souvent entendu lorsque 2 chevaux sont séparés, plus particulièrement lorsque l'on sépare une jument de son poulain (Haupt et al., 1982). Il y a également un hennissement plus doux (bouche fermée) pour solliciter de l'attention ou en donner. Ce type de hennissement n'est pas associé au stress ; il sera principalement entendu entre une jument et son poulain ou entre un étalon et une jument en chaleur (Haupt et al., 1982). D'autres vocalisations sont répertoriées comme l'ébrouement, les cris... (pour plus de détails voir (Haupt et al., 1982)). Lors d'un test d'isolement, des chercheurs ont obtenu une augmentation des vocalisations émises (Bagshaw et al., 1994; Harewood et al., 2005). Une étude sur le bien-être des poulains a montré que les individus dont les conditions d'hébergement ont été enrichies ont moins henni (Lansade et al., 2011). Le flehmen (relèvement de la lèvre supérieure) n'aurait par contre pas de lien avec le stress.

Les comportements d'alimentation tels que la prise de nourriture, les mâchonnements, le temps passé à manger, à brouter, peuvent varier selon le niveau de stress. Une étude a mesuré que le confinement et l'isolement social augmentaient le temps passé à s'alimenter ainsi que la fréquence des prises de nourriture dans le box (Mal et al., 1991). D'autres études ont obtenu l'effet inverse et associent une augmentation du temps passé à manger avec l'absence de peur, lors d'un test de surprise (Viérin et al., 1998). En considérant uniquement les juments hébergées en pâture, Mal et al. (1991) observent que les juments les plus nerveuses brotent des laps de temps plus courts. Le raccourcissement du temps passé à brouter, sans relever la tête, peut en effet être associé à des comportements de vigilance (qui augmentent en situation stressante et d'autant plus chez les individus les plus craintifs).

Les comportements d'exploration, avec une tête basse et un nez au sol (avec ou sans flairage) augmentent lorsque le cheval est isolé (Bagshaw et al., 1994). Les comportements d'élimination (défécations) sont plus fréquents lors d'un test d'isolement (Bagshaw et al., 1994; McCall et al., 2006).

Bagshaw et al. (1994) concluent en proposant les comportements suivants lors d'études sur l'évaluation du stress : un cheval marchant en reniflant le sol (comportement exploratoire), la marche ou l'immobilité en position d'alerte

(comportement de vigilance). Ils proposent également d'utiliser les fréquences de défécations et de souffles (expiration d'air en position d'alerte) comme indicateurs de stress (Bagshaw et al., 1994). Dans une étude préliminaire, les comportements que nous avons pu associer à un niveau de stress élevé sont : la position face à la porte du cheval dans le box et une fréquence élevée de mouvements lors d'une manipulation vétérinaire (Peeters, 2006).



Figure 3 : Souffle, expiration d'air en position d'alerte

CONCLUSION SUR LA RÉPONSE COMPORTEMENTALE AU STRESS

L'utilisation des comportements pour évaluer le stress semble être une méthode plus rapide et techniquement plus simple que d'obtenir des mesures physiologiques. Elle semble également plus fiable pour évaluer les émotions de l'animal. Malheureusement, même s'il y a des arguments qui vont dans ce sens, l'interprétation de comportements pour mesurer le stress est encore souvent simpliste et les mesures manquent cruellement validation. Selon le Dr Rushen, l'interprétation des comportements en termes de stress est loin d'être simple et il est nécessaire de comprendre les mécanismes sous jacents dont découlent ces comportements. Les réponses comportementales dépendent de l'élément stressant, mais également de l'individu et du contexte dans lequel le stress survient (Rushen, 2000).

9. LA RÉPONSE NEUROENDOCRINE AU STRESS

GÉNÉRALITÉS ET AXE HPA

La neuroendocrinologie étudie la communication entre le système nerveux central et les glandes endocrines. Cette communication s'établit principalement entre l'hypothalamus, l'hypophyse et le système nerveux périphérique. Les axones terminaux des cellules nerveuses de l'hypothalamus libèrent des hormones dans le système circulatoire, via des capillaires qui traversent l'hypophyse. Ces hormones régulent les fonctions de l'hypophyse. L'hypophyse est composée de trois parties : le lobe antérieur, le lobe postérieur et le lobe intermédiaire (Asa et al. (1995) in

Matteri et al. (2000)). La partie antérieure de l'hypophyse sécrète la GH (somatotropine, hormone de croissance), l'ACTH (adrenocorticotropique hormone), la TSH (thyroid-stimulating hormone), la LH (luteinizing hormone), la FSH (follicle-stimulating hormone) et la prolactine. Le rôle du lobe intermédiaire dépend de l'espèce concernée. Le lobe postérieur maintient un contact physique avec l'hypothalamus. Il sert de lieu de stockage pour l'ocytocine et la vasopressine (Matteri et al., 2000). Le système neuroendocrinien est composé de divers axes. Une des réponses neuroendocrines au stress les plus connues est l'activation de l'axe HPA. Cette réponse provoque la sécrétion d'hormones stéroïdes via la glande surrénale. La corticosurrénale sécrète les glucocorticoïdes (par ex. le cortisol) et les minéralocorticoïdes (par ex. l'aldostérone). La médullosurrénale sécrète l'adrénaline et la noradrénaline.

Cette relation entre stress et activation de la corticosurrénale est l'une des premières à avoir été observée par Selye dans les années 30, lors de ses recherches en neuroendocrinologie du stress chez l'animal. L'étude de l'axe HPA et du système nerveux autonome sont les méthodes les plus courantes pour apprécier physiologiquement le niveau de stress (Mormède et al., 2007).

La physiologie de cet axe HPA est décrite chez la plupart des mammifères (hommes et chevaux compris). Les facteurs de stress activent l'hypothalamus (Campbell, 1995). Lorsqu'il est stimulé, l'hypothalamus sécrète la CRH (corticotropin releasing hormone). Cette hormone agit sur l'hypophyse en régulant sa sécrétion d'ACTH (adrenocorticotropique hormone). Cette ACTH stimule la zone fasciculée de la corticosurrénale. Chez la majorité des animaux domestiques (équidés, bovins, caprins, ovins, porcs, visons, renards et poissons), le cortisol y est synthétisé à partir du cholestérol (Dupouy et al., 1992; Argemi, 1998). Chez les oiseaux et les rongeurs, c'est la corticostérone qui est synthétisée (Sapolsky, 2002; Mormède et al., 2007). Cette production de cortisol est alors déversée dans le sang. L'augmentation de CRH apparaît quelques secondes après l'exposition à l'élément stressant, l'augmentation d'ACTH après 15 secondes et celle de cortisol sanguin endéans quelques minutes. La CRH ne serait cependant pas la seule hormone à moduler la sécrétion d'ACTH (Sapolsky, 2002).

La sécrétion du cortisol dans le sang est régulée par un système de feedback négatif assuré par le cortisol sanguin lui-même (Dupouy et al., 1992; Argemi, 1998). Lorsque le taux de cortisol est suffisant, un système de rétroaction signale à l'hypophyse et à l'hypothalamus de réduire la production d'ACTH et de CRH (Campbell, 1995).

LE CORTISOL

Le cortisol, également appelé hydrocortisone, est un stéroïde, principal représentant du groupe des hormones glucocorticoïdes. Son nom complet est le 4-Pregnène-11 β ,17,21-triol-3,20-dione. Sa masse molaire est égale à 362.46 g/mol.

Les glucocorticoïdes, régulateurs de la glycémie ont un rôle important sur le plan du métabolisme énergétique (Dupouy et al., 1992). Le cortisol stimule la néoglucogenèse. C'est-à-dire qu'il stimule le foie à convertir les acides gras et les acides aminés en glucose (Sapolsky, 2002). La concentration sanguine en glucose va donc augmenter. Cette énergie supplémentaire sert à faire face à l'élément stressant (Mormède et al., 2007).

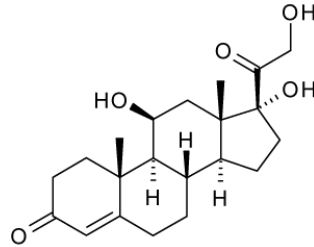


Figure 4 : Formule développée du cortisol (Wikipédia, 2011)

Dans le sang, la majorité du cortisol sécrété se lie à de larges protéines : l'albumine et la CBG (cortisol binding globuline, aussi appelée transcortine). La liaison aux protéines transporteuses est réversible (Dupouy et al., 1992). La minorité restée libre est celle qui est biologiquement active (Irvine et al., 1987). La CBG régule la disponibilité du cortisol en l'empêchant de sortir des vaisseaux sanguins (Alexander et al., 1998). Seul le cortisol non lié aux protéines peut traverser les membranes des vaisseaux sanguins (Siiteri et al., 1982). La CBG permet donc de garder une réserve de cortisol dans le sang. Cette réserve est capable d'être progressivement libérée si la fraction libre disparaît. Les protéines liantes ont donc un rôle de tampon qui empêche des variations rapides de la concentration d'hormone libre disponible (Dupouy et al., 1992). La concentration totale en cortisol dans le sang est contrôlée non seulement par le taux de production de cortisol mais également par les processus d'élimination et de transport dépendant du taux de saturation de la CBG (Bousquet-Melou et al., 2006).

En situation normale, la CBG est presque saturée. Ce degré de saturation varie selon les espèces. Lors d'un stress léger, l'augmentation de la concentration en cortisol peut passer inaperçue dans un dosage du cortisol libre, car cette légère augmentation commencera d'abord par saturer la CBG. Cet artéfact est éliminé si on dose le cortisol total. Lors d'un stress important, alors que la quantité de cortisol total doublera, le cortisol libre lui, augmentera de façon plus impressionnante. La CBG a une haute affinité pour le cortisol et une faible capacité. L'albumine a une grande capacité mais une faible affinité et spécificité pour le cortisol (Demey-Ponsart et al., 1986; Gayrard et al., 1996). Les paramètres de la CBG, sa capacité maximale et sa constante de dissociation, ont été étudiées chez diverses espèces. Chez l'homme et chez le cheval domestique, les pourcentages de cortisol libre (10-15%), lié à l'albumine (10-20%) et lié à la CBG (70-80%) ont été estimés par Gayrard et al. (1996) (Gayrard et al., 1996). Ces auteurs estiment l'occupation par le cortisol des sites de la CBG à 55-60% chez le cheval et 70-75% chez l'homme.

Le cortisol libre, qui peut aisément traverser les membranes biologiques, constitue la fraction biologiquement active agissant sur les tissus et intervenant dans le rétro-contrôle hypothalamo-hypophysaire (Sulon, 1981). Le cortisol interagit avec les récepteurs intracellulaires, qui, une fois activés par leur ligand, peuvent inhiber ou activer l'expression d'un gène (Mormède et al., 2007). En résumé, le cortisol a une activité catabolique (protéolytique et lipolytique) dans les tissus périphériques et une activité anabolique dans le foie, dont la gluco-génèse et la synthèse des protéines. Puisque le cortisol réduit l'entrée de glucose dans les cellules, il augmente le glucose sanguin et la sécrétion d'insuline. De plus, le cortisol a une action sur le cerveau qui tend à augmenter la prise de nourriture. La combinaison de cet apport supplémentaire en nourriture et de sécrétion d'insuline entraîne une production d'énergie qui, si elle n'est pas utilisée lors de la réponse au stress, sera stockée dans les tissus adipeux.

LES FACTEURS INFLUENÇANT L'AXE HPA

LE RYTHME NYCTHÉMÉRAL DU CORTISOL

Les rythmes physiologiques circadiens constituent un « *phénomène adaptatif qui participe à la survie de l'individu et à la pérennité de l'espèce face aux variations prévisibles de l'environnement* » (Dupouy et al., 1992). En général, chez les mammifères, la production de cortisol suit un rythme nycthé-méral (lié à l'alternance jour/nuit), déterminé et synchronisé par la luminosité (Mormède et al., 2007). Chez la plupart de animaux diurnes, les concentrations fluctuent tout au long de la journée : elles sont élevées le matin et faibles le soir. On observe souvent une augmentation importante de la concentration en cortisol sanguin en fin de nuit, juste avant le réveil. Les glucocorticoïdes, régulateurs de la glycémie, ont en effet un rôle important au moment du réveil, qui constitue une contrainte sur le plan du métabolisme énergétique (Dupouy et al., 1992). Chez l'homme, la sécrétion de cortisol suit un rythme circadien (Kelly et al., 2008). « *Le rythme circadien du cortisol plasmatiques est peu dépendant des facteurs exogènes, c'est un exemple de rythme à composante endogène forte ce qui en fait des marqueurs majeurs de la synchronisation circadienne d'un organisme* » (Touitou, 2006).

Pour ce qui est du cheval, les résultats diffèrent selon les études. Certains montrent que le cortisol varie selon un rythme circadien, avec un maximum le matin et un minimum l'après-midi, comme dans l'étude de Irvine et Alexander (1994). Selon ces auteurs, il existerait un rythme circadien pour le cortisol en l'absence d'intervention de l'homme sur le rythme de vie des chevaux (Irvine et al., 1994). Ils observent également un rythme circadien lorsque les chevaux vivent dans une certaine routine alternant temps passé au box et exercice. Toutain et al. (1988) ont également trouvé un rythme circadien, sur lequel se surimposent des sécrétions épisodiques (Toutain et al., 1988). La sécrétion du cortisol n'est pas continue mais pulsatile (Mormède et al., 2007). La libération de cortisol se compose de décharges successives dont la durée, la fréquence et l'amplitude varient au cours du nycthé-mère

(Dupouy et al., 1992). Selon les études, les moments auxquels la concentration est maximale et minimale varient : max à 9h-10h (Cavallone et al., 2002), max à 6h-9h et min à 18h-21h (Irvine et al., 1994), max une heure après le lever du soleil (Flisinska Bojanowska et al., 1991). Une étude a montré que, lorsque les prélèvements s'espacent de jours en jours, selon un interval entre deux prélèvements de 28 heures (au lieu de 4 heures), un rythme circadien apparaît (Hoffis et al. (1979) in (Irvine et al., 1994)). Cette méthode a pour objectif d'éliminer le stress d'un prélèvement au moment du prélèvement suivant.

Une relation a été établie entre ce rythme endocrinien et l'alternance activité-repos (Dupouy et al., 1992). Selon Irvine et Alexander (1994), les interventions humaines (routine) sont responsables de la rythmicité de la sécrétion du cortisol des chevaux (Irvine et al., 1994). Les différences entre le rythme nyctéméral du cheval et celui de l'homme seraient donc expliquées par le fait que le cheval n'a pas la même alternance activité/repos que l'homme.

Les différences entre les taux de cortisol du matin et ceux du soir peuvent être très élevées et variables selon l'espèce concernée. Chez l'homme, le pic précédant le réveil est très élevé comparé au reste de la journée. Chez le cheval, la concentration matinale maximale en cortisol sanguin est approximativement 2x plus élevée que celle du soir (Irvine et al., 1994; Peeters, 2006). Les variations journalières ne sont pas négligeables et sont un facteur important dont il faut tenir compte lors d'études cliniques ou expérimentales. Elles sont déterminées génétiquement et synchronisées par la lumière, par l'alternance activité/repos et par la routine due à l'hébergement du cheval domestique.

L'EFFORT PHYSIQUE, L'ENTRAÎNEMENT, L'ACTIVITÉ SEXUELLE ET L'ALIMENTATION

L'élément stressant n'est pas l'apanage de l'augmentation de la concentration en cortisol. Hormis l'alternance jour/nuit, activité/repos... expliquée ci-dessus, divers autres facteurs peuvent stimuler l'axe HPA. Il faut donc en tenir compte lors des études visant à mesurer un stress.

Après un effort physique, la concentration en cortisol augmente. Quelle que soit l'intensité ou la durée de l'effort physique, une augmentation du cortisol plasmatique est observée (Alexander et al., 1991; Colborn et al., 1991a; Colborn et al., 1991b; Malinowski et al., 2006). Creighton et al. (2004) ont testé le cortisol salivaire avant et après un effort physique. Leurs résultats montrent que le taux de cortisol salivaire est plus élevé 30 min après l'effort (Creighton et al., 2004). Ils répètent cette expérience en 2006 et obtiennent les mêmes résultats pour une heure d'exercice léger (Hughes et al., 2006). Cette augmentation en cortisol lors d'un effort physique dépend de l'intensité et de la durée de l'exercice ainsi que de l'état de santé de l'animal. Comme chez le chien et chez l'homme, l'entraînement tend à diminuer cette augmentation de cortisol chez le cheval. Des sujets entraînés verront leur

concentration en cortisol plasmatique augmenter moins fort que des sujets non entraînés (Covalesky et al., 1992).

Des augmentations en cortisol sanguin ont également été observées après une activité sexuelle ou tout simplement lorsqu'un étalon entend d'autres étalons stimulés sexuellement (Colborn et al., 1991a; Colborn et al., 1991b). Ce facteur peut cependant être assimilé à un *stress positif (eustress)*, permettant à l'animal de mettre à sa disposition les ressources nécessaires à l'activité physique lors de l'accouplement. L'alimentation provoque également une augmentation du cortisol sanguin (Mormède et al., 2007).

LE RYTHME SAISONNIER

Hormis la variation nyctémérale, influencée par l'alternance jour/nuit ou activité/repos, on observe des variations saisonnières du taux de cortisol, chez les juments en gestation (Flisinska-Bojanowska et al., 1991), ainsi que chez des poneys et juments saines (Donaldson et al., 2005).

Certains auteurs émettent l'hypothèse que l'augmentation de l'ACTH sanguin (et donc du cortisol) en automne serait responsable de l'augmentation du risque de boiteries chroniques rencontrées chez les chevaux et les poneys en automne. Le cortisol serait associé aux boiteries par la capacité du cortisol à altérer le tonus vasculaire et le métabolisme du glucose. Il est également proposé que les boiteries surviendraient suite à un élément stressant tel qu'un changement de photopériode ou de régime alimentaire, qui augmenterait également le taux d'ACTH et de cortisol circulant (Donaldson et al., 2005). Dans l'étude de Donaldson et al. (2005), chez le cheval, l'activité de l'axe HPA semble influencée par la saison. Les chevaux étant maintenus en prairie, une autre hypothèse propose que la variation de la qualité et de la quantité du fourrage soit responsable de cette variation de l'activité de l'axe HPA.

D'autres espèces voient leur axe HPA influencé par les changements de saisons. C'est le cas du mouton, chez qui l'on a observé des élévations des taux d'ACTH sanguin chez le bélier en été (Ssewanyana et al., 1990). Les taux de cortisol sanguin de l'écureuil sont également plus élevés au mois d'août (prise de poids avant hibernation) (Boswell et al. 1994 in (Donaldson et al., 2005)). D'autres facteurs de l'environnement, comme l'humidité ou la température, peuvent également influencer l'activité de l'axe HPA (Mormède et al., 2007). Lorsque l'on dose le cortisol, il est important de garder à l'esprit ces divers facteurs et de tenter de les standardiser un maximum lors de la mise en place d'un protocole expérimental.

LES ESPÈCES, LES RACES

Les mécanismes d'adaptation et les réponses au stress sont très variables selon les espèces, les races et les individus (Mormède et al., 2007). Les variations individuelles de l'activité de l'axe HPA sont également d'ordre génétique, comme le montrent des études comparant des familles et des jumeaux chez l'homme, diverses lignées de

rongeurs de laboratoire et diverses races d'animaux domestiques (Mormède et al., 2007). Certaines races seront plus sensibles au stress que d'autres (stress de confinement, stress de changement de température...). Ces études sont importantes pour la sélection de races mieux adaptées à certains types d'élevages. Dans une étude sur le stress induit par la séparation chez des génisses, les scientifiques ont trouvé des augmentations en cortisol plasmatique qui varient selon la race des bovins (Boissy et al., 1997). Donaldson et al. (2005) ne trouvent pas de différence significative entre le taux d'ACTH et de cortisol chez des poneys ou des chevaux. Cependant, une autre étude a mis en évidence un taux d'ACTH sanguin plus élevé chez les chevaux que chez les poneys (Couetil et al. 1996 in (Donaldson et al., 2005)).

Cette sensibilité au stress peut être génétiquement influencée par des différences de disponibilité du cortisol sanguin. En effet, le polymorphisme du gène codant pour la CBG, ou l'efficacité des récepteurs cellulaires peuvent influencer la concentration en cortisol sanguin circulant (Mormède et al., 2007).

L'INDIVIDU

Les niveaux de base des paramètres physiologiques des individus varient selon divers facteurs, tels que la race, l'âge, le sexe, l'hébergement, et l'expérience passée... Il n'est pas rare que la variation inter-individus de ces paramètres physiologiques soit plus importante que la variation perçue chez un individu entre son taux de base et celui lors de l'expérimentation (Bachmann et al., 2003)! Cela va compliquer grandement l'interprétation des résultats et imposer d'effectuer des mesures personnalisées des taux de base, en situation standardisée, pour y comparer les résultats obtenus lors de l'expérimentation. Les mesures individuelles de cortisol restent cependant très utiles pour évaluer la réponse au stress, à condition de les comparer à des taux de cortisol de contrôles, valeurs de base, servant de référence à l'individu (Mormède et al., 2007).

Chez le cheval, l'âge est positivement corrélé avec les taux d'ACTH et de cortisol sanguins au début et à la fin du test de suppression à la dexaméthasone. Cette corrélation suggère une détérioration de la fonction de l'axe HPA avec l'âge (Donaldson et al., 2005). Une autre étude conclut que l'âge et le niveau d'entraînement diminuent la réponse en cortisol sanguin lors d'un exercice intense (Malinowski et al., 2006). À l'inverse, Cavallone et al. (2002) n'ont pas trouvé de variation selon le sexe et l'âge (Cavallone et al., 2002). Donaldson et al. (2005) trouvent peu d'influence du sexe sur l'activité de l'axe HPA.

Lors de la gestation, les taux de progestérone et de CBG augmentent. Le taux de cortisol circulant dépendant de cette disponibilité de la CBG (Demey-Ponsart et al., 1982), il faut donc tenir compte de ces paramètres lors de mesures du taux de cortisol sanguin sur des individus en gestation ou post-partum.

Le passé des individus est également important. Malheureusement, il est rare de connaître le passé des individus lorsque l'on travaille avec des chevaux adultes.

L'expérience d'un stress, prénatal ou postnatal, peut également influencer la sensibilité de l'axe HPA (Braastad, 1998; Espmark et al., 2008). L'état physiologique de l'individu influence également l'activité de l'axe HPA (gestation, allaitement, pathologie...).

Comme expliqué dans le chapitre « Les facteurs influençant les réponses au stress » (p.34), la réponse au stress ne dépend pas réellement de l'élément stressant mais de la perception que l'animal a de cet élément, comme menace à son homéostasie. Cette perception va donc dépendre du tempérament de l'animal, de ces motivations et émotions au moment de la rencontre avec le stimulus stressant. L'importance des facteurs psychologiques lors de la réponse au stress fut démontrée par Mason (1971) et a été confirmée par Anderson et al. (1996) (Mormède et al., 2007). Ils observent que l'activation de l'axe HPA en réponse à un élément aversif dépend du contrôle que l'animal peut avoir sur la situation. L'étude de la réponse au stress sur le terrain ou en milieu naturel devient donc plus compliquée que le modèle initialement proposé par Selye (Selye, 1973). Un chapitre est réservé à l'étude du tempérament chez le cheval (p.38).

L'APPRÉCIATION DE L'ACTIVITÉ DE L'AXE HPA POUR ÉVALUER UN STRESS

L'évaluation de l'activité de l'axe HPA est souvent reliée à l'appréciation du stress ou du bien-être. Le taux de cortisol est utilisé pour évaluer l'activité de l'axe HPA, que cela soit chez l'homme (Levine et al., 2007), chez les animaux domestiques ou chez les animaux sauvages (Möstl et al., 2002). La concentration sanguine en cortisol est utilisée comme une mesure indirecte du stress dans beaucoup d'espèces, comme par exemple chez le mouton (Mears et al., 1997; Krawczel et al., 2007), chez le chien (Hennessy et al., 2001), chez les bovins (Boissy et al., 1997; Rushen et al., 2001) ou chez le cheval. La réaction de l'axe HPA dépend de l'intensité et de la durée d'exposition à l'élément stressant, ainsi que de la situation dans laquelle se trouve l'individu qui est confronté à cet élément stressant.

LA RÉPONSE FACE À UN STRESS AIGU

Lorsque l'animal est face à un stress aigu, son axe HPA est activé et son taux de cortisol sanguin augmente. Ces situations stressantes peuvent être variées : situation douloureuse, stress social, manipulation, transport, frustration... La décharge de cortisol induite par un stress n'est pas instantanée. Il faut quelques minutes pour que le taux de cortisol se mette à augmenter dans le sang. La sécrétion de cortisol sanguin peut se prolonger jusqu'à une heure après la fin du stress aigu (Szenci et al., 2011). Le premier prélèvement de sang après un stress se fait donc en général 10 minutes après l'exposition à l'élément stressant (Mormède et al., 2007). Des scientifiques ont mesuré les taux de cortisol sanguin chez des génisses soumises à des protocoles de manipulation différents (négatif ou positif). Les génisses manipulées de façon négative montrent des augmentations de cortisol sanguin total plus élevées 5, 10 et 15

minutes après avoir été exposées à l'homme et gardent une concentration en cortisol sanguin libre plus élevée l'après-midi suivant l'exposition à l'homme. Les manipulations négatives des génisses provoquent des réponses aiguës au stress lors de la mise en présence de l'homme (Breuer et al., 2003).

L'amplitude de la réponse dépend de l'espèce et du taux de cortisol de base de l'animal. On remarque que des espèces ayant des taux de cortisol au repos très bas, par exemple les bovins (max 15 nmol/L) auront une décharge élevée lors d'un stress (60–200 nmol/L) (Lay et al., 1996; Boissy et al., 1997; Szenci et al., 2011). Alors que des animaux ayant un taux de cortisol au repos élevé (par exemple les porcs), auront une décharge relativement moins élevée lors d'une exposition à un stress (Mormède et al., 2007).

La sécrétion de cortisol n'est pas additionnable. L'exposition à deux éléments stressants ne provoquera pas une sécrétion de cortisol égale à l'addition de celles provoquées par les 2 éléments stressants pris séparément.

LA RÉPONSE FACE À UN STRESS CHRONIQUE

Même si l'exposition au stress se prolonge, le taux de cortisol sanguin décline généralement, suite à la réponse aiguë produite. Alors que les comportements de stress se maintiennent, les taux de cortisol peuvent être revenus à la normale. Selon certaines études, une exposition répétée à plusieurs éléments stressants peut renforcer la réponse face à une nouvelle situation aversive. Un stress chronique sensibiliserait donc l'axe HPA. Face à un même élément stressant, les individus ayant été préalablement exposés de façon répétée à un élément stressant (le même ou un autre), auront une réponse de l'axe HPA plus sensible, une augmentation du cortisol circulant plus forte, que ceux n'ayant pas été préalablement exposés au stress. Selon Bhatnagar et Dallman (1998), cette sensibilité plus forte serait due à une augmentation de l'activité du cerveau qui régule l'axe HPA (Mormède et al., 2007).

Cependant, d'autres études obtiennent des résultats opposés, Janssens et al. (1995) concluent que l'exposition à un stress chronique tend à diminuer la sensibilité de l'axe HPA. Lors de situations de stress de confinement, des vaches vont d'abord exprimer des comportements de stress et on observe une augmentation du cortisol circulant. Lorsque ce stress devient chronique, les réactions comportementales et la réponse de l'axe HPA peuvent s'inverser. Selon Janssens et al. (1995), cette diminution de la réponse de l'axe HPA serait une adaptation à une situation de stress chronique (Janssens et al., 1995). Pour savoir si un animal est soumis à un stress chronique, les scientifiques effectuent des tests de stimulation à l'ACTH (Mormède et al., 1990). Selon les auteurs, lorsqu'un animal vit un stress chronique, les tests montrent soit une hypersensibilité à l'ACTH (augmentation de la décharge en cortisol sanguin) soit une hyposensibilité (diminution de la décharge en cortisol) (Mormède et al., 2007).

Des situations stressantes, comme un environnement social instable pour des veaux, être attachés pour une longue période pour des taureaux ou enfermés dans un

espace réduit pour des génisses, commencent par provoquer une réponse au stress qui consiste en une augmentation du taux de cortisol (Veissier et al., 2007). Si ces situations perdurent, la sécrétion de cortisol diminue jusqu'à retrouver des valeurs normales, alors que l'animal exhibe toujours des comportements indicateurs de stress (Jensen et al., 1996). Un stress chronique provoquerait donc une sorte d'épuisement, de résignation de l'axe HPA. Les résultats obtenus lors de ces tests sont influencés par l'âge de l'animal, mais également par le délai depuis lequel l'animal subit le stress (Mormède et al., 2007). Le contrôle que l'animal a sur son environnement lors d'un stress peut également influencer la réponse de l'axe HPA. Par exemple, en situation de stress, des bovins attachés peuvent montrer des comportements d'apathie et une désensibilisation de l'axe HPA (observée lors de tests de stimulation à l'ACTH), tandis que des bovins pouvant se déplacer montrent des comportements d'hyperactivité et une sensibilisation de l'axe HPA (Mormède et al., 2007).

LES 3 PHASES D'UN STRESS

La durée d'un stress a donc son importance. Le Dr Selye détermine 3 phases lors d'une exposition à un élément stressant : la *phase d'alarme*, la *phase de résistance* et la *phase d'épuisement* (Selye, 1956; Mormède et al., 2007). La phase d'alarme déclenche l'augmentation du taux de cortisol circulant. Même si le stress se maintient, comme lors de changement d'environnement social et physique, la concentration en cortisol reviendra à la normale, en raison de son mécanisme de feedback (Mormède et al., 2007). Bien que la concentration en cortisol soit normale, certains changements sont induits par l'activation chronique de l'axe HPA. C'est la phase appelée « *phase de résistance* ». Ces changements, bien étudiés chez les animaux de laboratoire, sont la perte de poids, le rétrécissement du thymus, l'inhibition de la synthèse d'ACTH,... (Mormède et al., 2007). Ces modifications de l'axe HPA ne sont visibles qu'en pratiquant des tests de stimulation (CRH, vasopressine, ACTH,...) ou de suppression (à la dexaméthasone) de ce dernier. La capacité de liaison de la CBG peut également être modifiée si l'animal est en présence d'un stress chronique. L'étude d'Alexander et al. (1998) a montré que la présence d'un stress social affecte l'axe HPA des chevaux. Ce stress diminue la capacité de liaison de la CBG et augmente donc la proportion de cortisol libre plasmatique. Cet effet sera d'autant plus marqué chez les chevaux nouveaux-venus (subordonnés) dans un groupe social que chez les dominants (Alexander et al., 1998).

Les résultats de diverses études sur l'effet du stress chez le bétail concluent que la réactivité des glandes surrénales augmente suite à un stress de court terme, mais diminue sur le long terme. Ce résultat ne fait cependant pas l'unanimité. Il semble que l'axe HPA s'adapte aux défis environnementaux de façon flexible et dynamique. On peut observer une sensibilisation ou une désensibilisation. Selon la nature de l'élément stressant, du moment où il survient, la réactivité du système HPA peut être augmentée, inchangée ou déprimée (Mormède et al., 2007). La « *phase d'épuisement* », de résignation, se rencontrerait lorsque l'individu est en contact prolongé avec l'élément stressant et que l'activité de son axe HPA est donc déprimée.

LE CORTISOL SANGUIN POUR ÉVALUER LE STRESS CHEZ LE CHEVAL

Chez le cheval, le cortisol sanguin a été largement utilisé pour évaluer le niveau de stress induit lors d'un transport (Clark et al., 1993; Cavallone et al., 2002; Fazio et al., 2003; Fazio et al., 2008a; Fazio et al., 2008b; Schmidt et al., 2010a; Schmidt et al., 2010b), d'une compétition (Covalesky et al., 1992), ou d'un entraînement (Alexander et al., 1991; Cayado et al., 2006; Malinowski et al., 2006). Le fait de simplement contenir un étalon avec un tord-nez provoque une augmentation significative du cortisol plasmatique (Colborn et al., 1991b). Une intervention chirurgicale, même peu invasive et de courte durée, constitue elle aussi une source de stress importante à en juger par les variations importantes des concentrations en cortisol (Taylor, 1998; Peeters, 2006; Peeters et al., 2008). Des études se sont également penchées sur le stress provoqué par un isolement (Kay et al., 2009) ou sur le stress associé à des stéréotypies (McGreevy et al., 1998). Lors d'un effort physique intense, un niveau inapproprié de cortisol sanguin, qu'il soit excessivement bas ou élevé indiquerait que le cheval est face à un défi physiologique qui excède ce qui est considéré comme normal (Malinowski et al., 2006).

Des études ont montré qu'un stress social comme un changement d'environnement ou l'insertion de nouveaux individus dans un groupe de chevaux déjà constitué pouvait augmenter la concentration en cortisol libre dans le plasma (Alexander et al., 1998). Toutefois, lors d'une étude précédente, la concentration totale en cortisol n'était pas significativement différente avant ou après un stress de séparation sociale (Alexander et al., 1988). Lors d'une étude comprenant un transport et un changement d'environnement, les auteurs déduisent que le facteur stressant le plus important est le changement de relation sociale entre les individus (chevaux) d'un groupe. Ce n'est qu'une fois la période d'adaptation passée que les taux de cortisol reviennent à la normale (Cavallone et al., 2002).

Etudier la réponse au stress via le cortisol est intéressante. Mais il faut remarquer que la sécrétion de cortisol est influencée par des facteurs très variés. Et lorsqu'il s'agit d'éléments stressants, il est difficile de différencier le « *bon* » stress, faisant partie de la vie, du *distress*, ayant un effet délétère sur le bien-être de l'animal : les sécrétions de cortisol sanguin observées lors d'événements potentiellement agréables (alimentation, activité sexuelle), ou lors d'événements nécessitant une mise à disposition de ressources énergétiques supplémentaires (exercice physique, digestion...) ne sont pas différentes de celles observées en cas de souffrance ou de stress. Il faut donc tenir compte des possibles stress positifs lors de la mise en place d'un protocole visant à mesurer un stress particulier. La durée du stress subi est également fort importante. Pour les stress chroniques, il est important d'envisager que les individus puissent potentiellement être dans l'une des 3 phases de stress, et donc interpréter les taux de cortisol avec attention. Lors des phases de résistance et d'épuisement, les tests de stimulation sont utiles pour détecter des modifications de la sensibilité de l'axe HPA.

LE CORTISOL DANS LA SALIVE

Le cortisol, hormone stéroïde, est liposoluble et diffuse librement à travers la membrane plasmique (Dupouy et al., 1992). Le cortisol se retrouve dans la salive suite à une diffusion passive au niveau des glandes salivaires. Il nous donne en permanence une estimation du taux de cortisol libre dans le sang. Dans la salive, la totalité du cortisol est libre, car cette dernière est dépourvue de protéines liant le cortisol (Riad-Fahmy et al., 1982).

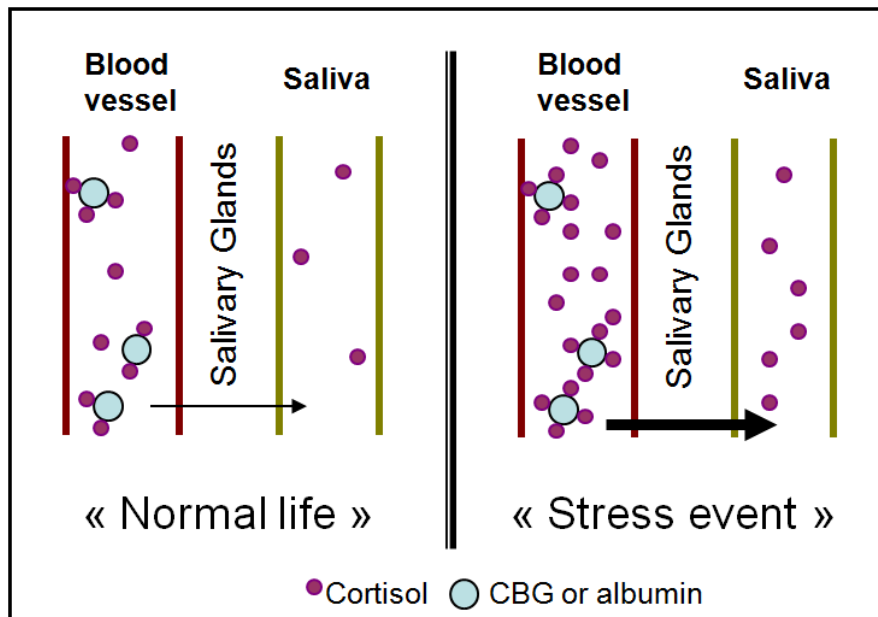


Figure 5 : Schéma de la diffusion passive du cortisol au niveau des glandes salivaires (Peeters et al., 2009)

Chez l'homme, la mesure du cortisol salivaire est une méthode alternative non-invasive validée pour l'estimation du taux de cortisol libre du sang (Demey-Ponsart et al., 1986; Calixto et al., 2002; Bigert et al., 2005; Arafah et al., 2007; Chiappin et al., 2007; Kirschbaum et al., 2007; Dorin et al., 2009). Cette mesure est utilisée dans de nombreuses études, en psychologie (Kirschbaum et al., 1989; Levine et al., 2007), comme outil de diagnostic (Walker et al., 1978; Riad-Fahmy et al., 1982; Francis et al., 1987; Castro et al., 2000) et dans de nombreuses études sur le stress chez l'homme (van Eck et al., 1996a; van Eck et al., 1996b; Nicolson et al., 1997; Roy et al., 2001; le Roux et al., 2003; Wolf et al., 2008; Hellhammer et al., 2009).

Chez le porc, Bushong et al. (2000) ont trouvé une relation entre le cortisol sanguin et salivaire avec et sans stimulation ACTH. La régression trouvée valide l'utilisation du cortisol salivaire pour évaluer le cortisol sanguin chez le porc (Bushong et al., 2000). Chez le cochon d'Inde également, le cortisol salivaire est validé comme mesure de l'activité de la surrénale (Fenske, 1996).

Chez les bovins, l'utilisation de la salive comme indicateur de l'activité de l'axe HPA est également utilisée et validée (Chacon Perez et al., 2004; Negrao et al., 2004; Ninomiya et al., 2009).

Chez le chien, la salive semble également être un milieu de choix pour l'évaluation du taux de cortisol dans la mesure de la réponse neuroendocrine au stress (Beerda et al., 1996). Le taux de cortisol salivaire est corrélé de façon significative au taux de cortisol sanguin (Vincent et al., 1992). C'est également le cas chez le mouton (Fell et al., 1985) et chez la chèvre (Greenwood et al., 1992; Nordmann et al., 2010; Szabo et al., 2010).

Chez les chevaux, la salive a également été utilisée pour évaluer le stress lors d'étude sur l'isolement (Harewood et al., 2005), le sevrage (Moons et al., 2005), le transport (Schmidt et al., 2010a; Schmidt et al., 2010b) ou lors de manipulations (Jongman et al., 2005). Certaines études obtiennent une corrélation entre le taux de cortisol dans le sang et dans la salive (Lebelt et al., 1996; Pell et al., 1999; van der Kolk et al., 2001), alors que d'autres n'ont trouvé qu'une corrélation faible ou inexistante entre les deux (Elsaesser et al., 2001). Jusqu'en 2007, aucune étude n'avait utilisé de modèle de régression pour expliquer et calculer cette relation entre sang et salive. Les précédentes études utilisant le cortisol salivaire pour évaluer le stress se basaient donc sur la relation sang/salive, validée chez l'homme ou dans d'autres espèces animales.

Creighton et al. (2004) obtiennent le matin des concentrations en cortisol salivaire approximativement doublées comparées à celles du soir, ce qui correspond aux variations de concentrations du cortisol sanguin (Irvine et al., 1994; Creighton et al., 2004). Pourtant, assez curieusement, Harewood et al. (2005) n'ont trouvé aucune trace de rythme circadien pour les taux de cortisol salivaire chez le cheval (Harewood et al., 2005). Chez le cheval, Hughes et al. (2006) mesurent un décalage de 30 minutes entre l'activation de l'axe HPA et le pic de cortisol dans la salive (Hughes et al., 2006).



Figure 6 : Éléments composant la 'Salivette' et tube de prélèvement sanguin



Figure 7 : Coton de la 'Salivette' sur la pince métallique

LES AVANTAGES ET INCONVÉNIENTS DU DOSAGE DU CORTISOL DANS LA SALIVE

Le dosage de cortisol salivaire présente des intérêts incontestables par rapport aux dosages dans le sang. Le prélèvement de sang, malgré sa facilité à être effectué chez le cheval, reste un acte invasif, légèrement douloureux, et qui nécessite une contention, ce qui peut augmenter l'anxiété du cheval et induire un stress supplémentaire et donc une augmentation de cortisol (Creighton et al., 2004; Hughes et al., 2006). C'est aussi le cas chez l'homme, même si les conditions de prélèvement ne sont évidemment pas les mêmes (Demey-Ponsart et al., 1986). Ces augmentations induites par la méthode de prélèvement peuvent fausser les résultats expérimentaux. La répétition des prélèvements sanguins dans la jugulaire peut aussi entraîner des complications chez le cheval (thromboses) (Walesby et al., 2003) et peut être, avec des chevaux sensibles, devenir potentiellement dangereuse pour le personnel soignant (accidents) (May et al., 2010). Les prélèvements salivaires sont par contre indolores et ne présentent aucun risque de complication. Le prélèvement de salive n'induit pas ou peu de stress chez la plupart des chevaux domestiques, sauf s'il nécessite un isolement et/ou des manipulations stressantes pour pouvoir garder l'animal immobile, ce qui n'est pas le cas du cheval domestique adulte habitué à l'homme. Il faut savoir que l'utilisation du tord-nez, par exemple pour effectuer un prélèvement de sang chez un cheval, augmente la concentration en cortisol (Colborn et al., 1991b). Le stress induit par l'aiguille pourrait également être dû à une mauvaise expérience passée, ou au stress transmis par la personne effectuant le prélèvement.

Les prélèvements sanguins nécessitent la présence d'un vétérinaire ou d'une autre personne habilitée à prélever du sang et parfois la pose d'un cathéter. La pose d'un cathéter automatique implique que l'animal doit être hébergé dans une stalle particulière et impose de limiter ses mouvements. Ces conditions sont souvent incompatibles avec les exigences d'études de terrain. Pour les études sur le stress des animaux sauvages, la télémétrie a toutefois développé des mécanismes portatifs capables de prélever des échantillons de sang régulièrement chez des animaux en liberté.

La salive peut quant à elle être prélevée par n'importe quelle personne ayant un minimum d'expérience avec les chevaux et, pour les chevaux domestiqués, son prélèvement ne soulève aucun problème d'éthique ou de bien-être. En effet, lors d'études de terrain sur des chevaux domestiques, les prélèvements de salive peuvent être réalisés par un étudiant, un palefrenier ou par un cavalier sans induire de stress supplémentaire. Il est cependant préférable que les chevaux soient habitués à la manipulation. Cette habitude se fait assez rapidement, car deux ou trois prélèvements suffisent. En effet, un cheval habitué à être manipulé accepte généralement volontiers l'ouverture de la bouche, pratique régulière en équitation.

Il subsiste cependant des problèmes lors des prélèvements chez les jeunes individus ou les individus semi-sauvages. Chez la chèvre par exemple, il est facile de prélever de

la salive chez l'adulte (aspiration via un tube en plastique). C'est par contre plus compliqué chez les jeunes dont le flux de salive est réduit (Greenwood et al., 1992). Les manipulations de jeunes animaux sont en général plus problématiques. Elles peuvent induire un stress et également provoquer des petites lésions buccales. Ces blessures contamineront la salive avec du sang et les résultats seront donc faussés (Greenwood et al., 1992). Moons et al. (2002) ont également rencontré ce type de problème en prélevant de la salive chez des poulains arabes âgés de 2 à 3 mois. Les poulains ont montré beaucoup de résistance, et beaucoup d'échantillons manquaient ou contenaient du coup un volume de salive insuffisant pour permettre un dosage du cortisol (Moons et al., 2002).

D'autres prélèvements, plus invasifs, peuvent nécessiter l'injection de sédatif. Une telle injection est peu favorable car il est difficile de maintenir un niveau stable d'inconscience et les individus ne réagissent pas tous aux produits de la même façon. De plus, certains sédatifs peuvent avoir un effet direct sur l'axe HPA (Cook et al., 2000).

Un autre avantage de l'utilisation de la salive est que la concentration en cortisol salivaire semble être indépendante du flux salivaire (Chiappin et al., 2007). Le prélèvement de salive, contrairement au prélèvement de sang, peut également être conservé à température ambiante (Levine et al., 2007).

La cinétique du cortisol libre (comme celui mesuré dans la salive) est différente de celle du cortisol total (mesuré dans le sang) : lors d'un stress important, alors que la quantité de cortisol total doublera, le cortisol libre, lui, augmentera de façon plus impressionnante. Lors d'études sur le stress, il est plus intéressant et plus pertinent de mesurer le cortisol libre, fraction biologiquement active, que le cortisol total (Alexander et al., 1998; Hellhammer et al., 2009). La concentration de cortisol sanguin totale inclut la fraction libre et la fraction liée. Pour mesurer la concentration de la fraction libre, il faut commencer par séparer le cortisol libre du cortisol lié. Cette séparation est complexe. Dans la salive, il n'y a que du cortisol libre ; la mesure est donc directe et plus simple à réaliser. Le dosage du cortisol salivaire peut donc être intéressant pour avoir une idée du taux de cortisol libre dans le plasma.

Lors de l'utilisation de la salive, comme alternative au prélèvement de sang, il faut tenir compte du temps nécessaire au cortisol pour diffuser du sang vers la salive. Les pics de cortisol apparaissent en effet d'abord dans le sang puis dans la salive. Chez l'homme, ce décalage est de 20-30 minutes (Kirschbaum et al., 1989).

LES AUTRES ALTERNATIVES AU PRÉLÈVEMENT DE SANG

Le cortisol ne se trouve pas uniquement dans le sang ou la salive. La fraction libre est également éliminée via les poils, les cheveux, le lait, l'urine et les fèces. Ces méthodes d'élimination lente du cortisol sont validées pour évaluer des stress chroniques ou stress de longue durée (Accorsi et al., 2008). Elles ne permettent toutefois pas la

détection des augmentations faibles ou transitoires de cortisol sanguin (Schmidt et al., 2009).

Le prélèvement de lait, même s'il est non invasif, requiert tout de même des manipulations qui peuvent stresser l'animal, sauf s'il est utilisé chez les espèces élevées pour la production laitière. Des études ont trouvé un lien entre la concentration en cortisol dans le lait et les comportements de stress social chez la vache (Fukasawa et al., 2009). Les prélèvements d'urine et de fèces non invasifs, c.-à-d. prélevés après excrétion, manquent de précision sur la temporalité de la sécrétion d'hormones. Cette notion de temporalité est importante lors d'études sur les stress aigu ou pour tester l'activité de l'axe HPA (Cook et al., 2000). Ce prélèvement passif ne permet pas non plus de distinguer de quel individu il provient lorsque les animaux sont hébergés en groupe. La mesure du cortisol sera donc la moyenne des individus du lot, et permettra d'estimer l'activité moyenne de l'axe HPA du groupe, donnée utile pour évaluer le bien-être du groupe, comme lors d'étude de la densité d'hébergement des poulets d'élevage (Buijs et al., 2009). Les prélèvements de fèces sont principalement utilisés pour évaluer le bien-être et les stress chroniques d'animaux sauvages dans les zoos, tels que le margay ou le tigre (Moreira et al., 2007) ou dans des élevages extensifs comme c'est le cas des rennes (Rehbinder et al., 2006) ou d'animaux difficile à manipuler, comme les lapins (Buijs et al., 2011) ou les visons (Malmkvist et al., 2008; Meagher et al., 2010; Spangberg et al., 2010).

Il faut cependant noter qu'un des désavantages est que la concentration en métabolites du cortisol des fèces varie rapidement à température ambiante. Le délai entre production du cortisol et excrétion dans les matières fécales est variable et dépend de l'espèce étudiée (Mormède et al., 2007). Accorsi et al. (2008) ont trouvé une relation significative entre le taux de cortisol mesuré dans les poils et dans les fèces, chez des chiens et des chats.

Le dosage du cortisol dans l'urine, naturellement excrétée, est également validé comme méthode non invasive d'évaluation du taux de cortisol libre (Beerda et al., 1996). Les prélèvements d'urine sont utilisés chez les animaux domestiques (Beerda et al., 1996; Jongman et al., 2005) et chez l'homme (Kirschbaum et al., 2009).

NOS OBJECTIFS CONCERNANT LA RÉPONSE NEUROENDOCRINE

Les avantages de l'utilisation de la salive pour doser le cortisol, énumérés et expliqués ci-dessus, sont nombreux, et ce tout particulièrement lors d'études sur le stress menées sur le terrain. Chez le cheval, la concentration en cortisol dans le sang est fréquemment utilisée comme mesure indirecte du niveau de stress. Cependant, aucune recherche jusqu'à présent n'a mesuré la relation entre le cortisol sanguin et salivaire chez le cheval. Ces précédentes études se basent sur la relation validée chez l'homme ou d'autres espèces animales. Lors de notre première étude, notre objectif était de comparer les taux de cortisol sanguin et salivaire chez le cheval, et ce dans une

large gamme de concentrations. Pour cela, nous avons procédé à un test de stimulation à l'ACTH. Cette injection d'hormone active l'axe HPA et simule donc l'effet qu'aurait un stress aigu standardisé sur l'axe HPA. Le but final, si nous trouvions une relation entre sang et salive, était de valider l'utilisation de la salive au lieu du sang pour doser le cortisol chez le cheval, lors d'études sur le stress.

10. LES AUTRES MESURES DU STRESS

MESURE DE LA FRÉQUENCE CARDIAQUE

Certaines études sur le stress et/ou le bien-être animal se basent sur des mesure de fréquence cardiaque (Covalesky et al., 1992; Bachmann et al., 2003; Rietmann et al., 2004b; von Borell et al., 2007; Lee et al., 2008; Nagy et al., 2009; Werhahn et al., 2011). La mesure de la fréquence cardiaque est une méthode souvent utilisée car elle est non invasive et les données peuvent être facilement collectées. Cependant, la FC peut facilement être influencée par d'autres facteurs, comme l'effort ou la présence d'une pathologie. Ces 15 dernières années, la mesure de la variation de la fréquence cardiaque (HRV : « Heart Rate Variability ») est devenue une méthode d'évaluation du niveau de stress chez le cheval (Visser et al., 2002; Rietmann et al., 2004a; Rietmann et al., 2004b; von Borell et al., 2007; Nagy et al., 2009; Werhahn et al., 2011). Celle-ci présente l'avantage d'être plus fiable et moins sensible que la fréquence cardiaque. Elle est parfois utilisée pour mesurer le stress des chevaux, en parallèle du cortisol salivaire (Schmidt et al., 2010a; Schmidt et al., 2010b).

MESURE DE LA FRÉQUENCE RESPIRATOIRE

La fréquence respiratoire, à savoir le nombre de cycles respiratoires (inspiration et expiration) mesuré par minute chez un individu est un signe vital (tout comme le pouls, la tension artérielle,...); une anomalie de la fréquence respiratoire peut être le signe de certaines pathologies respiratoires ou d'une adaptation de l'organisme à une situation donnée (exercice physique, émotion vive). L'évaluation de l'activité du système nerveux autonome en tant que mesure du niveau de stress est limitée et peu évidente, surtout lors d'études hors conditions de laboratoire. La mesure de cette réponse au stress est donc peu utilisée dans le cadre d'étude sur le bien-être animal (Moberg, 2000).

LES MESURES ZOOTECHNIQUES

Les mesures zootechniques peuvent être utilisées pour évaluer le stress et le bien-être d'une exploitation. Il s'agit d'une évaluation du bien-être animal se basant sur des indices économiques sensés refléter l'état d'un groupe d'individus (âge de la première parturition, productivité,...). Ces indices sont largement utilisés dans le secteur des

animaux de production. Ces mesures zootechniques n'évaluent que l'état général (moyen) d'un groupe, sans se préoccuper de la situation de chaque individu. Elles ne sont aujourd'hui plus considérées comme suffisantes pour évaluer le bien-être. En effet, d'après Vandenhede (2003); « *des animaux en souffrance peuvent encore présenter une productivité considérée comme suffisante* ».

11. LE STRESS ET LA COMPÉTITION

LA COMPÉTITION

Selon la plupart des entraîneurs de chevaux, la compétition est reconnue comme étant un moment stressant, pour le cavalier comme pour le cheval et ce, quelle que soit la discipline sportive. Comme nous l'avons expliqué précédemment, le stress a des impacts en termes de santé et de bien-être mais il peut également influencer les performances en compétition. Le stress de la compétition peut détourner des ressources biologiques et psychologiques qui auraient permis d'améliorer les performances. Pourtant, peu d'études se sont intéressées au stress en sport équestre.

Les sessions d'entraînement très intenses, des manipulations oppressantes, un régime alimentaire strict, des conditions d'hébergement inadaptées, de nombreux transports et la rigueur de la compétition, sont autant d'éléments stressants qu'un cheval participant à une compétition peut rencontrer. Les réponses d'un cheval face à ces éléments stressants varient selon la nature des événements, leur durée, leur intensité, mais également selon la façon dont le cheval les perçoit. Le niveau de stress en compétition sera donc aussi influencé par le cheval lui-même, sa génétique, son tempérament, son expérience de la compétition, ses émotions.

L'exercice physique proprement dit fait partie de ce stress. Un excès d'exercice peut avoir des effets délétères sur la santé. Le stress psychologique qu'un animal ressent lors d'une situation va également déterminer l'intensité de la réponse. Mais peu d'études scientifiques se sont penchées sur la mesure de ce stress psychologique.

Les éleveurs sont bien conscients que la génétique a son importance en compétition. Ce fait est appuyé par l'étude de Bartolomé et al. (2008) dont les résultats montrent un effet significatif du facteur « père » sur les performances obtenues. Ce lien serait stable dans le temps vu la corrélation entre les résultats sportifs obtenus lorsque le cheval est jeune et lorsqu'il est à l'âge adulte. Ils ont également observé que le sexe influence les performances : les meilleurs résultats sont obtenus par les femelles.

Des études ont démontré un lien entre le tempérament du cheval et ses capacités à apprendre (Lansade et al., 2010) mais également avec les performances obtenues en compétition (Visser et al., 2003b). Toutefois, la génétique ne fait pas tout et d'autres facteurs non-génétiques influencent également les performances. Ces facteurs sont l'âge, l'expérience passée, le type de parcours, le lieu de la compétition, et la durée et

le type de transport. Bartolomé et al. (2008) observent que les performances augmentent avec l'âge (pour des chevaux de 4, 5 et 6 ans). Le type de piste (sable, herbe ou synthétique) et le lieu où se déroule la compétition (facteurs susceptibles d'influencer la difficulté de l'épreuve) ont aussi un effet sur les performances obtenues. La température et l'humidité, variant en fonction du lieu, peuvent également influencer les résultats (Ott et al. (2005) in (Bartolomé et al., 2008)). La pluie pourrait rendre le sol glissant et le brouillard diminuer la visibilité lors d'épreuves en extérieur. Un autre facteur important est la durée et le moyen de transport, liés au niveau de stress/fatigue d'avant compétition. Ce stress altérerait le rendement de l'animal en compétition. Ces auteurs trouvent également une corrélation significative entre l'expérience du cheval (nombre de participations en compétition) ou le niveau d'entraînement et les performances obtenues (classement et pénalités).

Il faut cependant rappeler que le stress n'est pas toujours néfaste. Le stress positif ou "*eustress*" est nécessaire pour s'adapter à l'environnement, mais aussi pour mobiliser les ressources et assurer des performances en compétition.

Obtenir une mesure objective des performances en compétition équestre n'est pas toujours chose aisée. En dressage, les scores sont attribués selon l'appréciation des qualités et des défauts d'un couple cavalier/cheval lors de la reprise. Les qualités sur lesquelles les juges se basent sont la régularité des allures, la discrétion des aides du cavalier, la légèreté, la justesse des figures... En concours de saut d'obstacles, des pénalités sont attribuées au cours d'un parcours en cas de : renversement d'une barre, désobéissance, erreur de parcours, chute du cheval et/ou du cavalier, intervention physique d'un tiers, dépassement du temps accordé (règlement FEI saut d'obstacles, 2^{ème} édition, 01/01/2009). Une mesure quantifiée des performances semble donc plus facile à obtenir en compétition de saut d'obstacles. Le classement final du cheval ou le nombre de pénalités obtenues peuvent être utilisés comme mesures objectives des performances.

LES ÉTUDES SUR LE STRESS DU CHEVAL EN COMPÉTITION

MESURE DU NIVEAU DE STRESS VIA L'ACTIVITÉ DE L'AXE HPA

Covaleski et al. (1992) ont tenté de dissocier la partie psychologique de la réponse au stress de celle induite par l'exercice physique lors d'une compétition de jumping. Ils ont comparé les taux de cortisol sanguin en compétition et lors d'un entraînement à domicile (exercice de routine, ressemblant le plus possible au parcours proposé lors de la compétition). Ils ont également classé les chevaux selon trois niveaux d'expérience de la compétition. A domicile comme en compétition, ils ont prélevé du sang au repos (au box), juste avant l'entrée en piste et deux minutes après l'exercice (à domicile) ou le passage en piste (en compétition). Durant la compétition, les chevaux les moins expérimentés ont une concentration en cortisol plasmatique au repos plus élevée que les chevaux expérimentés. Par contre, les concentrations en

cortisol juste avant et après le passage en piste ne varient pas selon le niveau d'expérience. Lors des prélèvements effectués à domicile, ils n'obtiennent pas de différence significative entre les niveaux d'expérience. Les chevaux les moins expérimentés ont un taux de cortisol sanguin plus élevé au repos en compétition qu'au repos à la maison, alors qu'il n'y a pas de différence chez les chevaux expérimentés. Cette différence impliquerait que le changement d'environnement provoque un stress psychologique chez les chevaux moins habitués à la compétition (Covalesky et al., 1992).

Cayado et al. (2006) ont mesuré l'activité de l'axe HPA de chevaux au repos, en compétition avant l'effort et en compétition après l'effort. Ils ont également effectué des prélèvements de sang sur des chevaux n'allant pas en compétition (témoins), des chevaux de saut d'obstacles et des chevaux de dressage. Ils concluent que les deux types de compétition provoquent une augmentation de cortisol sanguin, avec un effet plus important en dressage qu'en jumping. Ils observent que cette augmentation est moindre chez les chevaux les plus expérimentés. Ils observent aussi que, au repos à domicile, la baseline des chevaux de jumping est plus élevée que celle des chevaux témoins et que la baseline des chevaux de dressage est plus faible que celle des chevaux témoins. L'augmentation attribuée au stress psychologique de la compétition, différence entre la baseline et la concentration avant le départ en piste (anticipation), est négligeable chez les chevaux de jumping, mais elle est significative chez les chevaux de dressage. Cette augmentation sera plus forte pour les chevaux les moins expérimentés (Cayado et al., 2006).

Ces 2 études nous montrent que l'expérience a bel et bien un impact sur l'activation de l'axe HPA vis-à-vis d'un même élément stressant. Il est possible, en compétition, de dissocier le stress induit par l'exercice de celui induit par le stress psychologique de la compétition. Le jumping apparaît comme moins stressant que l'épreuve de dressage.

Les résultats obtenus lors d'une étude, menée en 2008 par Fazio et son équipe, confirment une augmentation significative en cortisol sanguin chez des chevaux après le passage en piste (+5 min et +30 min), lors d'une compétition de jumping, et ce quel que soit leur niveau de compétition (Fazio et al., 2008b).

MESURE DU NIVEAU DE STRESS VIA LES COMPORTEMENTS

L'évaluation comportementale du niveau de stress en compétition semble délicate. Lors de compétition d'endurance (160km), la santé physique des chevaux est évaluée avant, pendant et après l'effort. Une équipe de chercheurs s'est penchée sur une appréciation qualitative des comportements du cheval d'endurance. Les observateurs ayant donné leur avis sur 10 chevaux, avant, pendant et après la course, 3 dimensions principales découlent des analyses : « agité/relax », « excité/fatigué » et « *engagement of the horse with its environment* ». Cette troisième dimension semble indiquer le niveau d'attention, de conscience ou d'implication du cheval sur ce qui l'entoure. Les

chevaux dont les scores pour cette troisième dimension étaient élevés avant le départ sont ceux qui ont terminé la course avec succès (Dorman et al., 2009).

Une autre étude s'est penchée sur les comportements non désirés lors de compétition de dressage (Williams et al., 2009). Ces comportements, indicateurs de conflits, sont des battements de queue, les oreilles en arrière, une mauvaise position de la tête, une tension musculaire, les dents apparentes... Ces comportements indiqueraient une certaine irritation du cheval.

Le suivi de ces comportements en compétition n'est pas aisé, malgré les techniques de vidéo disponibles sur le marché. Il est cependant possible d'observer les chevaux au box avant le passage en piste et d'y relever d'éventuels comportements associés au stress induit par le changement d'environnement impliqué par la compétition. Covalesky et al. (1992) ont utilisé un questionnaire pour évaluer le comportement des chevaux au box, à domicile et en compétition. Ce questionnaire ne donne aucun résultat intéressant mais ne comportait qu'une question relative à la réactivité du cheval.

IMPACT DU CAVALIER SUR LES PERFORMANCES OBTENUES

Dans l'étude de Bartolomé et al. (2008) le facteur « cavalier » influence significativement le classement et les pénalités obtenues en compétition de saut d'obstacles. Le cavalier aurait un impact sur l'amplitude et l'élévation du saut du cheval mais aussi plus globalement sur son comportement et son aptitude à sauter.

Tout ce qui concerne le cavalier à son importance, que ce soit son niveau d'entraînement, son aptitude sportive, sa personnalité, son stress en compétition. Nous avons décidé de nous intéresser plus particulièrement au stress du cavalier en compétition, évaluée physiologiquement par l'hormone du stress : le cortisol.

LE STRESS DU CAVALIER EN COMPÉTITION

LE STRESS EN COMPÉTITION

Chez les athlètes humains, lors d'une compétition, l'émotion induite s'ajoute au stress de l'exercice physique. Les études sur l'impact des émotions sur les performances sont nombreuses et ce depuis les années 1930. Les auteurs se sont concentrés sur les causes et les conséquences de l'anxiété, accusée de diminuer les performances des athlètes (Gonzalez-Bono et al., 1999 ; Salvador et al., 2005 ; Wolframm et al., 2009). Des questionnaires sont utilisés en Psychologie du Sport pour mesurer l'anxiété chez l'homme. De nombreuses études empiriques soutiennent l'idée que l'anxiété du sportif pourrait permettre de prédire les performances futures (Cury et al., 1999). La concentration en cortisol salivaire augmente après compétition, et ce peu importe que l'individu ait gagné ou perdu (Hasegawa et al., 2008). Il semblerait que les facteurs qui ont un impact sur le stress en compétition soient l'importance que la compétition a pour l'individu, son implication personnelle, son expérience passée de la compétition

ou le niveau présumé de l'adversaire. Plus que de gagner ou de perdre, c'est l'attitude du sportif face à la compétition qui déterminera les changements hormonaux (Salvador, 2005).

MESURE DU NIVEAU DE STRESS VIA L'ACTIVITÉ DE L'AXE HPA CHEZ L'HOMME

Chez l'homme, des données provenant d'études réalisées chez des adultes sains montrent que la sécrétion de cortisol suit un rythme circadien (Kelly et al., 2008). Au cours d'une journée, la sécrétion de cortisol peut se diviser en deux phases : la CAR (Cortisol Awakening Response), augmentation qui commence en fin de nuit et atteint son maximum 30-45 minutes après le réveil (Figure 8) (Strahler et al., 2010), généralement entre 4 ou 5h et 8h le matin (Argemi, 1998; Kelly et al., 2008; Oskis et al., 2009). Cette phase est suivie d'un déclin rapide pendant les heures suivant le réveil (Kirschbaum et al., 1989), puis plus progressif et régulier pendant le reste de la journée. Le minimum est atteint généralement aux alentours de minuit. Le cortisol est le principal glucocorticoïde chez l'homme et sa concentration est plus importante chez la femme que chez l'homme. Sa demi-vie biologique est de 80 minutes (Levine et al., 2007).

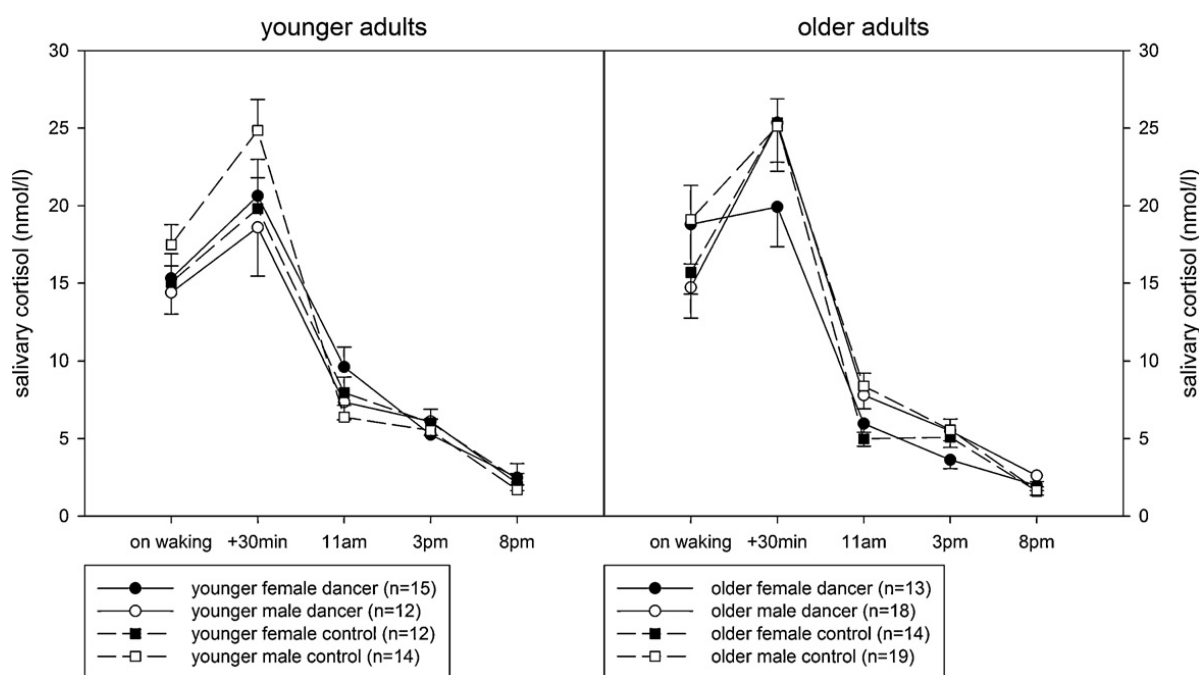


Figure 8 : Mean salivary cortisol response to awakening in dancers (Strahler et al., 2010)

Comme pour le cheval domestique, le dosage des stéroïdes dans la salive a de grands avantages pour l'homme. Ceux-ci sont discutés dans l'étude de Demey-Ponsart et al. (1986). Premièrement, le dosage du cortisol salivaire de l'homme présente une excellente corrélation avec son cortisol libre plasmatique. De plus, les avantages du prélèvement de salive sont identiques à ceux exprimés pour le cheval : facile, non invasif, non douloureux, ne contenant que la forme libre du cortisol.

Ils sont d'ailleurs encore plus aisés chez l'homme que chez le cheval car la personne peut les effectuer elle-même! Les désavantages de ce moyen de prélèvement sont des problèmes liés au manque de rigueur des sujets (lors d'auto-prélèvements planifiés), la quantité insuffisante de salive obtenue, les prélèvements effectués après consommation de substances à pH faible (jus de fruit par ex.) ou en cas de lésion buccale (contamination sanguine) (Levine et al., 2007).

Malgré ces quelques inconvénients mineurs, le dosage du cortisol dans la salive pour déterminer le stress est largement utilisé depuis les années 1980, chez les nouveau-nés, les enfants et les adultes, pour refléter le taux de cortisol sanguin (total et libre) (Kirschbaum et al., 1994; Kirschbaum et al., 2000).

Certains facteurs autres que la présence d'éléments stressants et l'exercice physique influencent le taux de cortisol chez l'homme : l'heure de réveil, facteur influençant peu le cortisol chez le cheval, a cependant beaucoup d'importance chez l'homme, mais également l'âge et le sexe (Hellhammer et al., 2009), l'utilisation de médicaments corticoïdes, la grossesse ou la prise de pilule contraceptive (Kirschbaum et al., 1995), l'alimentation juste avant le prélèvement, la consommation de caféine, les émotions (van Eck et al., 1996a)... Il existerait également un lien entre tabagisme et activation de l'axe HPA. La nicotine est en effet un activateur puissant de l'axe HPA : fumer deux cigarettes augmente fortement l'activité de l'axe HPA, tandis qu' "être fumeur" n'aurait que peu d'effet de manière générale sur l'axe HPA. Toutefois, selon Badrick et al. (2007), le cortisol salivaire est augmenté chez les fumeurs quotidiens, par rapport aux non fumeurs. Fumer atténuerait cependant la réponse de l'axe face à un stress psychologique (Rohleder et al., 2006).

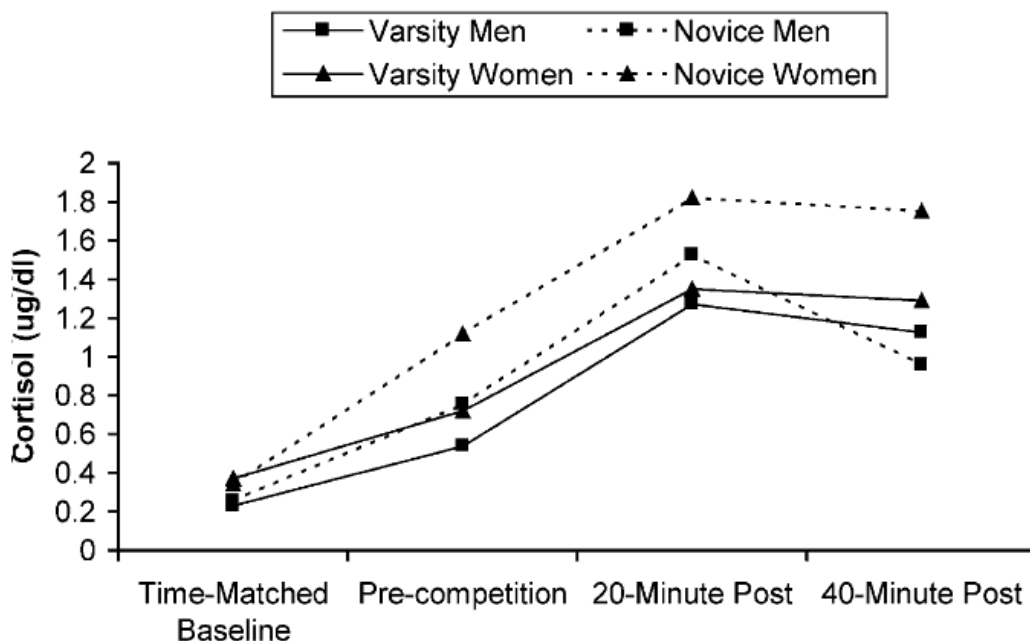


Figure 9 : Cortisol levels (mg/dl) rise in anticipation of, and again in reaction to, competition... (Kivlighan et al., 2005)

Lors de la compétition, le stress peut être évalué à 3 moments: avant, pendant et après la compétition. Selon Kivlighan et al. (2005) les taux de cortisol salivaire augmentent avant la compétition (anticipation) chez les hommes et les femmes, peu importe qu'ils y soient habitués ou non (Figure 9). Cependant, les athlètes novices voient leur concentration augmenter plus fort que ceux ayant plus d'expérience (Kivlighan et al., 2005). Pendant la compétition, le taux de cortisol salivaire augmente pour atteindre un pic 20 minutes après. Ces taux sont d'autant plus élevés que l'expérience du sportif pour la compétition est faible. L'hypothèse est donc que le sportif novice, en gagnant de l'expérience, habitue son axe HPA à la compétition (désensibilisation) (Kivlighan et al., 2005).

L'augmentation du cortisol salivaire avant la compétition pourrait cependant être positive et servir de réponse adaptative pour préparer le sportif au défi physique qui l'attend. D'un autre côté, cette augmentation peut être associée à de l'anxiété et à un *distress* causé par le challenge imminent (Kivlighan et al., 2005). La récupération, ou le niveau de stress après compétition, est également variable selon le sexe et l'expérience de la compétition. Le cortisol salivaire décline chez les hommes à partir de 40 minutes post-compétition, alors que chez les femmes, cela prendra plus de temps. Le cortisol salivaire diminue plus rapidement chez les hommes les moins expérimentés. Kivlighan et al. (2005) émettent l'hypothèse que cette diminution plus rapide soit due au fait que les hommes moins expérimentés portent rapidement leur attention sur autre chose que la compétition, tandis que les plus expérimentés, peut-être plus impliqués dans la compétition, passent plus de temps à ruminer et à analyser les performances réalisées.

12. LE STRESS EN MILIEU HOSPITALIER

LE MILIEU HOSPITALIER

Lors d'une hospitalisation, le cheval est confronté à beaucoup d'éléments stressants. Comme lorsqu'il va en compétition, son environnement physique (hébergement, odeur, bruits, litière, bâtiment,...) et son environnement social (changement de congénères, isolement, humains inconnus,...) changent. Les différences avec la compétition résident dans le fait que lorsqu'il est hospitalisé, le cheval est confronté à de nouvelles manipulations, prodiguées par le personnel soignant. Tous ces changements peuvent provoquer des stress. Il en faut pas non plus négliger le facteur douleur. La douleur ressentie par un animal peut provoquer un état de *distress* (*pain-induced distress*) (Mellor et al., 2000). Diverses méthodes utilisées pour évaluer le *distress* causé par la douleur sont semblables à celles utilisées pour évaluer le niveau de stress (sans douleur) : le cortisol sanguin, la fréquence cardiaque, les vocalisations, la posture de l'animal,... (Mellor et al., 2000). Parce que le stress provoqué par la douleur dépend du type de pathologie, de son développement et de la sensibilité à la douleur de l'individu, et afin d'éviter les confusions, nous n'avons pas suivi de chevaux hospitalisés pour des pathologies douloureuses. Nous nous sommes

plutôt intéressés à des chevaux visitant la clinique équine pour des examens d'admission.

Pour certains chevaux peu habitués à voyager, le transport vers la clinique provoque déjà un premier stress. Même pour des chevaux manipulés régulièrement, certaines manipulations vétérinaires peuvent induire des stress non négligeables (prise de sang, passage d'une sonde nasale, soins dentaires,...). Les interactions entre homme et cheval peuvent provoquer des réactions excessives qui compliquent les manipulations et peuvent entraîner des accidents (Hausberger et al., 2008). Lors de manipulations vétérinaires, les réactions du cheval provoquées par le stress augmentent le risque de blessures pour le personnel soignant (Jäggin et al., 2005).

LES ÉTUDES SUR LE STRESS INDUIT PAR DES MANIPULATIONS

Une étude s'est penchée sur l'évaluation du stress mental de chevaux lors d'un test de manipulation qui consistait à faire reculer le cheval (Rietmann et al., 2004b). Divers comportements ont été notés à cette occasion. Les comportements s'apparentant à des tentatives d'évasion (*flight behaviours*) ou à un manque de respect pour l'homme (*fight behaviours*) sont manifestés par des comportements dits agressifs comme bousculer voire piétiner la personne qui tient le cheval. La hauteur de la tête (haute, normale ou basse) indiquerait l'émotion du cheval : plus la tête est basse et plus le cheval est calme. Les mouvements de queue, hors présence d'insecte, exprimeraient un mécontentement qui peut venir d'une peur ou d'une agression. La fréquence de défécation est associée à une certaine tension et à de la peur.

13. LES OBJECTIFS DE LA THÈSE

Le manque de connaissances concernant le bien-être du cheval et l'appréciation de son niveau de stress contribuent à l'apparition de comportements problématiques survenant lors d'interactions homme-cheval. Le nombre de chevaux en France est passé de 500 000 au début des années 1990 à 800 000 en 2005 (Desbordes, 2006) et jusque 900 000 en 2011 (Haras_Nationaux_Français, 2011). Le nombre de cavaliers (et surtout de cavalières) est en augmentation (nombre de cavaliers licenciés de la Fédération Française d'Équitation : +374% entre 1984 et 2010 et +158% entre 2000 et 2010) (FFE, 2011). Il y a de plus en plus de propriétaires de chevaux et un grand nombre d'entre eux n'ont qu'une connaissance faible de la façon dont ils doivent prendre soin de leur monture. Il en découle une augmentation des problèmes liés au bien-être animal. Ils sont dus à un manque d'information concernant la pratique de l'équitation, les techniques d'apprentissage, d'entraînement, une mauvaise utilisation des équipements, des manipulations non-adaptées au cheval. De plus, les accidents liés au cheval sont un réel problème de santé publique. Le risque d'une blessure mortelle occasionnée par un cheval est estimé à 1 par million d'habitants (McGreevy et al., 2010). En termes de blessures, la pratique de l'équitation est plus dangereuse que la pratique d'un sport moto et aussi dangereuse que le rugby

(McGreevy et al., 2010). C'est pourquoi nous pensons que pour accroître le bien-être du cheval et diminuer les risques pour les personnes l'entourant, il est nécessaire d'améliorer la compréhension des réactions liées au stress chez le cheval. De plus, un stress excessif chez un patient constitue un facteur négatif en termes de pronostic médical : immunité réduite, gaspillage d'énergie, complications à l'anesthésie,... Les études sur le stress sont donc particulièrement importantes en Médecine Vétérinaire. Nous nous sommes penchés sur 2 situations où le cheval est confronté à divers éléments stressants : la compétition et l'hospitalisation. L'appréciation du stress ne peut se contenter d'une seule mesure (Rushen, 1986, 1991 et 2000). Nous avons donc combiné des données physiologiques et comportementales, afin de profiter des avantages reconnus d'une approche multiparamétrique (Mormède et al., 2007).

Les méthodes d'évaluation du stress des chevaux domestiques contribueront au développement de systèmes d'hébergement (en groupe, moments de liberté...) (Heleski et al., 2002; Søndergaard et al., 2004; Harewood et al., 2005; Visser et al., 2008a; Lansade et al., 2011; Werhahn et al., 2011), de méthodes d'élevage (reproduction, sevrage,...) (Malinowski et al., 1990; Jezierski et al., 1999; Lansade et al., 2004; Moons et al., 2005) et d'une équitation plus en accord avec le bien-être de l'animal, mais aussi de leurs partenaires humains (Ödberg et al., 1999; Ligout et al., 2008; Normando et al., 2011).

LES OBJECTIFS CONCERNANT LE CORTISOL SALIVAIRE CHEZ LE CHEVAL

Chez le cheval domestique, le cortisol sanguin est considéré comme une mesure indirecte du stress. Dans beaucoup d'espèces, l'utilisation de la salive, méthode non invasive, a été également validée comme étant le reflet de la concentration en cortisol libre du sang. Les prélèvements de salive sont donc de plus en plus souvent utilisés dans des études sur le stress des animaux domestiques, dont le cheval. La littérature de l'époque (2006-2007) ne nous proposant pas d'étude complète sur la cinétique du cortisol dans le sang et dans la salive chez le cheval, ni de mesure de la relation existant entre ces deux concentrations, nous avons fait de cette validation l'objectif de notre première étude.

LES OBJECTIFS EN COMPÉTITION

Nos objectifs sont de suivre le niveau de stress de couples cavalier-cheval en compétition. Il faut commencer par tester la faisabilité des prélèvements de salive pendant la compétition. Si ces prélèvements réguliers en situations de terrain sont réalisables, nous souhaitons suivre la cinétique du cortisol salivaire tout au long de la compétition, chez le cavalier et chez le cheval. Nous souhaitons également comparer les taux de cortisol du cavalier et du cheval et mettre ceux-ci en perspective avec les valeurs de base. Il serait également intéressant de tester une éventuelle relation entre

niveaux de stress et performances obtenues. Nous testerons également d'éventuels liens entre traits de tempérament, évalués par le propriétaire, et niveau de stress en compétition, ou les performances obtenues.

LES OBJECTIFS EN MILIEU HOSPITALIER

Nos objectifs sont d'améliorer l'évaluation du stress et du tempérament du cheval dans le cadre d'une hospitalisation. Une évaluation rapide et fiable pourrait permettre de prédire les réactions liées au stress et d'anticiper ainsi d'éventuelles difficultés de manipulation, voire d'en tenir compte dans la stratégie médicale à mettre en oeuvre. Le stress a en effet un impact sur la santé, il peut ralentir la vitesse de récupération et affaiblir le système immunitaire (voir chapitre « Les réponses au stress », p.28). Une appréciation plus profonde et évolutive du stress (et donc aussi de la douleur) permettrait donc aussi une meilleure récupération d'un cheval hospitalisé. L'objectif final est donc de diminuer le risque d'accident pour le cheval et le personnel soignant, tout en améliorant la santé et le bien-être du patient cheval.

RÉSULTATS ET DISCUSSION



PARTIE 1

VALIDATION DE L'UTILISATION DE LA
SALIVE POUR MESURER LE TAUX DE
CORTISOL LIBRE CHEZ LE CHEVAL



OBJECTIF DE L'ÉTUDE

Chez le cheval domestique, le cortisol sanguin est considéré comme une mesure indirecte du stress. Dans beaucoup d'espèces, l'utilisation de la salive, méthode non invasive, a été également validée comme étant le reflet de la concentration en cortisol libre du sang. Les prélèvements de salive sont donc de plus en plus souvent utilisés dans des études sur le stress des animaux domestiques, dont le cheval. La littérature de l'époque (2006-2007) ne nous proposant pas d'étude complète sur la cinétique du cortisol dans le sang et dans la salive chez le cheval, ni de mesure de la relation existant entre ces deux concentrations, nous avons fait de cette validation l'objectif de notre première étude. Pour la publication complète : voir p.91.

MÉTHODOLOGIE

Pour comparer les concentrations dans le sang et dans la salive, dans une large gamme de concentrations (allant du repos à celles rencontrées lors de stress aigus), nous avons choisi la méthode consistant à stimuler de façon artificielle l'axe HPA du cheval en lui injectant une dose standard d'ACTH. Nous avons effectué ces tests ACTH sur cinq chevaux sains. Les prélèvements de sang (via un cathéter jugulaire, posé la veille) et de salive (via une « *Salivette* » Sarstedt, Nümbrecht, Germany) ont été effectués selon un timing très précis englobant l'injection d'ACTH. En nous basant sur les résultats d'une étude antérieure, nous avons choisi d'injecter une dose d'ACTH de 1µg/kg de poids vif (Bousquet-Melou et al., 2006). Le cortisol, dans le sang comme dans la salive, a été dosé par RIA (Radio Immuno Assay). Les résultats ont été soumis à une analyse statistique de régression.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Dans les études précédentes chez l'homme (Walker et al., 1978; Lac, 2001) ou le chien (Beerda et al., 1996), les dosages radio immunologiques ont été validés comme méthode de mesure du cortisol dans le sang et dans la salive. Chez le cheval, quelques études proposent l'utilisation du cortisol salivaire comme indicateur de l'activité de l'axe HPA, mais les échantillons prélevés ne se distribuent que sur une étroite gamme de valeur (Pell et al., 1999; Creighton et al., 2004). Et lorsqu'ils ont utilisé un test de stimulation à l'ACTH, les auteurs ont collecté un nombre trop faible d'échantillons pour pouvoir calculer une régression significative (van der Kolk et al., 2001).

Les concentrations moyennes en cortisol sanguin et salivaire obtenues au repos dans notre étude sont respectivement de $188,81 \pm 51,46$ nmol/l et de $1,19 \pm 0,54$ nmol/l. Ces valeurs correspondent à celles obtenues dans d'autres études, pour les dosages effectués dans le sang (Alexander et al., 1991; Anderson et al., 1999; Cavallone et al., 2002) et dans la salive (Pell et al., 1999; van der Kolk et al., 2001). Les concentrations en cortisol augmentent lors de la pose du cathéter dans le sang ($182,98 \pm 31,49$ nmol/l) et dans la salive ($1,27 \pm 0,60$ nmol/l) mais ne diffèrent pas de façon significative des valeurs de repos. Ceci pourrait signifier que la pose du cathéter n'induit pas un stress aussi important que celui provoqué par exemple par un transport (Fazio et al., 2008a; Schmidt et al., 2010b) ou une compétition

[90] RESULTATS ET DISCUSSION/Validation de l'utilisation de la salive

(Cayado et al., 2006). Dans le sang, la réponse au test de stimulation ACTH obtenue est comparable à celles décrites dans de précédentes études chez le cheval. Le timing (pic atteint en moyenne après $96 \pm 16,7$ min) et l'amplitude du pic de sécrétion (pic moyen : $356,98 \pm 55,29$ nmol/l) correspondent également (van der Kolk et al., 2001; Bousquet-Melou et al., 2006).

Plusieurs études ont trouvé une corrélation positive significative entre le cortisol sanguin et salivaire, chez l'homme (Demey-Ponsart et al., 1986), chez le cochon d'Inde (Fenske, 1996) et chez la vache (Negrao et al., 2004). Chez le cheval, une précédente étude ne trouve pas de corrélation (Pell et al., 1999). D'autres études trouvent des corrélations positives mais avec un nombre d'échantillons réduit (Lebelt et al., 1996). Lors d'une étude préliminaire, nous avons également trouvé, chez le cheval, une corrélation positive entre la concentration moyenne en cortisol dans le sang et dans la salive (Peeters et al., 2008). Lors de notre étude, la corrélation sang/salive obtenue est positive et significative (corrélation de Pearson, $r=0.90$). La régression entre ces concentrations a dès lors été calculée et s'exprime selon la formule suivante :

$$\text{Cortisol}_{\text{serum}} = 159 + 56,7 \log_e \text{Cortisol}_{\text{salive}}$$

Cette formule est validée pour des valeurs de cortisol salivaire évoluant entre 0,24 et 34,83 nmol/l.

Les prélèvements de salive sont déjà utilisés comme alternative aux prélèvements de sang chez d'autres espèces, et ce pour des raisons qui sont également validées dans cette étude. Premièrement, le prélèvement de salive est facile à collecter et non invasif. Ensuite, la salive ne contient que du cortisol libre, il ne faut donc pas de séparation avant dosage. Enfin, la concentration en cortisol salivaire est indépendante du flux de salive (Riad-Fahmy et al., 1982). Grâce à cette étude, nous pouvons ajouter que l'augmentation de la concentration en cortisol lors d'un stress est plus importante dans la salive que dans le sang (environ 10x plus) et que la concentration en cortisol revient à la concentration de base plus rapidement que dans le sang (après 280 minutes pour le sang et 180 minutes pour la salive). Ces résultats permettent une meilleure détermination du moment où survient le stress chez l'animal.

CONCLUSION

Le dosage radioimmunologique du cortisol dans un échantillon salivaire constitue donc une technique valide et non invasive chez le cheval. Cette étude appuie le fait que la salive est un milieu de choix pour suivre le niveau de stress chez le cheval domestique.

COMPARISON BETWEEN BLOOD SERUM AND SALIVARY CORTISOL
CONCENTRATIONS IN HORSES USING AN ADRENOCORTICOTROPIC
HORMONE CHALLENGE

M. PEETERS, J. SULON, J-F BECKERS, D. LEDOUX and M. VANDENHEEDE

2011 - *Equine Veterinary Journal* - Vol. 43 (4) p. 487-493

Keywords: horse; cortisol; ACTH challenge; saliva; stress

SUMMARY

Reasons for performing study: In horses, serum cortisol concentration is considered to provide an indirect measurement of stress. However, it includes both free and bound fractions. The sampling method is also invasive and often stressful. This is not the case for salivary cortisol, which is collected using a more welfare-friendly method and represents a part of the free cortisol fraction, which is the biologically active form.

Objectives: To compare salivary and serum cortisol assays in horses, in a wide range of concentrations, using an adrenocorticotrophic hormone (ACTH) stimulation test, in order to validate salivary cortisol for stress assessment in horse.

Methods: In 5 horses, blood samples were drawn using an i.v. catheter. Saliva samples were taken using swabs. Cortisol was assayed by radioimmunoassay. All data were treated with a regression method, which pools and analyses data from multiple subjects for linear analysis.

Results: Mean \pm s.d. cortisol concentrations measured at rest were 188.81 ± 51.46 nmol/l in serum and 1.19 ± 0.54 nmol/l in saliva. They started increasing immediately after ACTH injection and peaks were reached after 96 ± 16.7 min in serum (356.98 ± 55.29 nmol/l) and after 124 ± 8.9 min in saliva (21.79 ± 7.74 nmol/l, $P < 0.05$). Discharge percentages were also different (225 % in serum and 2150 % in saliva, $P < 0.05$). Correlation between serum and salivary cortisol concentrations showed an adjusted $r^2 = 0.80$ ($P < 0.001$). The strong link between serum and salivary cortisol concentrations was also estimated by a regression analysis.

Conclusions: The reliability of both RIAs and regression found between serum and salivary cortisol concentrations permits the validation of saliva-sampling as a noninvasive technique for cortisol level assessment in horses.

INTRODUCTION

Cortisol levels are used in man and in domestic and wild animal research. In main studies, serum cortisol concentration is considered to be an indirect measurement of stress (Mears and Brown 1997; Hennessy et al. 2001; Rushen et al. 2001;

Möstl and Palme 2002; Krawczel et al. 2007). In horses, serum cortisol concentration is often used to assess stress induced by transport (Clark et al. 1993; Cavallone et al. 2002; Fazio et al. 2008), competition (Covalesky et al. 1992) and training (Alexander et al. 1991; Cayado et al. 2006), and stress associated with stereotypies (McGreevy and Nicol 1998). The increase in serum cortisol during acute stress is largely made up of free cortisol. When assessing stress, it is more useful and relevant to measure free cortisol than total cortisol in serum (Alexander and Irvine 1998; Hellhammer et al. 2009). Faecal cortisol metabolites are also used to assess long-term stress, but do not allow detection of minor and transient increases in plasma cortisol (Schmidt et al. 2009).

Salivary cortisol results from passive diffusion into the salivary glands and constantly provides information about free cortisol concentration. This concentration is, therefore, now used by more researchers as an index of serum free cortisol (Francis et al. 1987; Vincent and Michell 1992; Castro et al. 2000; Roy et al. 2001; Mormède et al. 2007; Wolf et al. 2008). Salivary cortisol concentration represents a part of free cortisol concentration. In horses, stress has already been assessed by salivary cortisol concentration during isolation (Harewood and McGowan 2005), weaning (Moons et al. 2005), transport (Schmidt et al. 2010a,b) or during new manipulations (Jongman et al. 2005). However, these researchers were not concerned with the relationship between serum and salivary cortisol concentrations in horses; they based their hypothesis on man or other species studies. The present study is a confirmation of these previous hypotheses.

In the saliva-sampling method, there is no risk of complications, unlike jugular catheterisation or venipuncture. Saliva-sampling is effectively a noninvasive method, painless and stress-free for horses that are used to be manipulated by man. This method is also easier

than blood-sampling (Fell et al. 1985; Vincent and Michell 1992; Bushong et al. 2000; Negrao et al. 2004; Hellhammer et al. 2009). Nowadays, cortisol concentration can be assayed by using immunoassays. A direct radioimmunological method called radioimmunoassay (RIA) was used, based on a competition between unlabelled cortisol and cortisol radiolabelled with ¹²⁵iodide, used in terms of sensitivity against the specific sites of an antibody previously described (Sulon et al. 1978). This technique has been widely validated in man (van Eck et al. 1996; Nicolson et al. 1997; Calixto et al. 2002) and equine studies (Hughes et al. 2006).

A positive correlation between equine serum and salivary cortisol concentrations has been established (Lebelt et al. 1996; Pell and McGreevy 1999; van der Kolk et al. 2001) or not (Elsaesser et al. 2001). Nevertheless, none of these studies provided a regression model to explain the relationship between serum and salivary cortisol concentrations. To establish this relationship, samples of saliva and blood are taken in parallel and in the present study adrenocorticotrophic hormone (ACTH) administration, inducing a high cortisol secretion was used to extend the range of sample concentrations (Calixto et al. 2002; Bousquet-Mélou et al. 2006).

The first aim of the present study was to develop a sensitive and specific RIA to measure cortisol concentration precisely in serum and saliva. The secondary objectives were to study the kinetics of cortisol in both blood and saliva after an adrenal stimulation and to assess if their relationship could permit the use of saliva sampling instead of blood-sampling to assess hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis activity in horses. The ACTH challenge was chosen in order to standardise an adrenal stimulation.

MATERIALS AND METHODS

The Animal Care and Use Council of the University of Liège (Belgium) approved the use and treatment of animals in this study.

Horses

Five mature horses, 3 mares and 2 geldings, ranging in age from 9–17 years and weighing mean \pm s.d. 486 ± 38 kg, were used. All horses were healthy, not pregnant and accustomed to handling and sampling sessions. They were housed on straw in their usual stable (individual stalls), at the Faculty of Veterinary Medicine of Liège. Water was freely available in automatic drinking troughs. Horses were fed with pellets and hay. Throughout the study, they were always handled by the same experimenter.

Experimental design and sampling

A catheter (large bore i.v. catheter 14 gauge x 13.4 cm)¹ was placed in the jugular vein of each horse on Day 1. This placement was performed by an experienced veterinarian. The standardised dose, 1 μ g/kg of ACTH (Synacthen tetracosactidum 0.25 mg/1 ml)² was chosen according to the work of Bousquet-Mélou et al. (2006). ACTH was injected through the catheter, which was then flushed. During Day 1, 10 samples (5 saliva and 5 blood samples) were collected. First samplings were performed before catheter placement, and the others at 5, 10, 30 and 60 min after. During Day 2, 42 samples (21 blood and 21 saliva samples in parallel) were collected. First samplings were performed 30 and 15 min before ACTH injection and the following at 10, 20, 30, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 280, 320, 260, 400 and 500 min after ACTH injection. At the end of Day 2, the catheter was removed.

Blood and saliva sampling

The first blood sample was collected by venipuncture before catheter placement. All other blood samples were drawn by i.v. catheter. Every blood sampling was followed by a cleaning injection of 1 ml of physiological liquid containing heparin (0.05%). Blood was collected in a clotting tube (Monovette)³ and immediately stored at 4°C. Saliva was sampled using Salivette³. A swab on a metal clamp was maintained in the horse's mouth for 30–40 s, over and under the tongue and replaced in Salivettes and stored at 4°C. At the end of each day, the Salivettes and clotting tubes were centrifuged 10 min at 1 500 *g*. Saliva and serum samples were stored at -20°C until assayed (Garde and Hansen 2005).

Development of salivary cortisol RIA

In saliva, cortisol was assayed by a direct RIA. Minimum detection limits (MDL) were determined in each assay according to the protocol described by Skelley et al. (1973). The precision and reproducibility of the RIAs were calculated by the intra- and interassay coefficients of variation (CV). The buffer (pH 7.0) used throughout the procedure contained $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ (0.206%)⁴, $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ (3.211%)⁵, NaCl (0.9%)⁶ and NaN_3 (0.1%)⁶. The buffer was ready to use after the addition of bovine serum albumin (BSA 0.2%)⁷. Cortisol⁸ was used as standard. Five μg of Cortisol-3CMO-histamine⁹ in 10 μl of phosphate buffer (0.5 mol/l pH 7.5) were labelled with 2 mCi $Na-^{125}I$ ¹⁰ by the usual chloramine-T method (Greenwood et al. 1963). The labelled solution was purified by high performance liquid chromatography (HPLC) on a C-18 reverse phase using an acetonitrile-water gradient. The primary antibody raised against cortisol-3-CMO-BSA was previously described by Sulon et al. (1978). The second antibody precipitation system consisted of a mixture of sheep anti-rabbit IgG (0.83%, v/v), normal rabbit serum (0.17%, v/v), polyethylene glycol 6000 (4%)⁶, BSA 0.4% and microcrystalline cellulose (0.05%)⁶.

At 300 μl of buffer, 50 μl of saliva were dispensed, in duplicate, in crystal polystyrene (75 x 12 mm) tubes. 100 μl of diluted tracer solution (about 30,000 counts/min) and 100 μl of antiserum (dilution 1/25,000) were added. A standard curve, ranging from 0.22–55.17 nmol/l was prepared in buffer and used in parallel. All tubes were incubated overnight at room temperature. After that, 1 ml of the second antibody precipitation system was added to all tubes and incubated 30 min at room temperature. After addition of 2 ml of buffer, all tubes were centrifuged at 2890 g for 20 min, in order to separate bound (pellet) and free (supernatant) ligands. The radioactivity of the dry pellet was counted using a gamma counter (126 Multigamma counter)¹¹. Logit-log transformation was used to obtain a linear standard curve in order to estimate the salivary cortisol concentration (Banga-Mboko et al. 2003). As no chromatographic testing of the validity of the assay was done, we notice that cortisol concentration assayed is the immunoreactive cortisol concentration.

Development of serum cortisol RIA

In serum, dilutions were necessary before RIA. All the reagents and materials described above were also used for serum cortisol determination. A 1 mg/ml solution of 8-anilino-1-naphthalene sulphonic acid (ANS)¹² prepared in buffer was used to avoid nonspecific binding of cortisol to serum proteins such as cortisol binding globulin (CBG) or albumin (Ronayne and Hynes 1990). Aliquots of 50 μl of diluted (1/40) serum sample, were dispersed in polystyrene tubes in duplicate. A 300 μl aliquot of tracer prepared in ANS solution (30,000 counts/min) and 100 μl of primary antiserum were added. A calibration curve of cortisol, ranging from 8.6–2200 nmol/l, was obtained with a charcoal stripped cortisol free serum. The subsequent steps were as described for saliva samples.

Statistics

Continuous variables are reported as the mean \pm s.d. We used repeated measures ANOVA to analyse cortisol kinetic in serum and saliva. Variable normality was assessed using the Shapiro-Wilk test. Transformation was applied for variable normalisation when necessary. Since the observations available to assess the link between salivary and serum cortisol were data from multiple subjects, i.e. several measures were made per horse, independence of the observation could not be assumed. We therefore had to apply methods for pooling data from multiple subjects for linear analysis. This was done using the standardisation procedure for individual response curves described by Poon (1988). After this standardisation, the classical linear regression model was used to assess the association between salivary and serum cortisol and to propose a prediction model for salivary cortisol concentration.

Statistical analyses were performed using R version 2.8.0¹³. A2-tailed P value < 0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

Characterisation of cortisol RIAs

The MDL were 0.2 and 8 nmol/l, respectively, in saliva and serum. In each case, 3 pools of saliva or serum containing low, moderate and high concentrations of cortisol were tested. Intra- and interassay CV determined at different ranges in the assays were $< 5.55\%$ ($4.04 \pm 1.54\%$) and $< 10.40\%$ ($9.13 \pm 1.33\%$) in saliva and, respectively, $< 6.53\%$ ($4.32 \pm 1.92\%$) and $< 11.27\%$ ($8.22 \pm 2.69\%$) in serum. Parallelism was assessed by serial dilutions (1:1, 1:2, 1:4, 1:8 and 1:16) of saliva (CV 5.91%) or serum (CV 4.43%) samples, selected with a high cortisol concentration.

Physiological validation of salivary and serum cortisol RIAs

Cortisol concentrations at rest: Saliva was collected with the Salivette without any problem. Horses accepted easily the metal clamp in their mouth. No increase in cortisol concentration appeared after saliva sampling (neither in serum nor saliva). Horses stayed calm and learned quickly (after 2 trials) to accept the swab. Horses did not need any special restraint to sample saliva, which was performed in the horse's stable. At 08.55 h on Day 1, before catheter placement, serum cortisol concentration varied from 137.84–256.92 nmol/l (188.81 ± 51.46 nmol/l). At the same time, salivary cortisol concentration varied from 0.58–1.77 nmol/l (1.19 ± 0.54 nmol/l).

During i.v. catheter placement: At 09.00 h on Day 1, the i.v. catheter was placed and serum cortisol concentrations showed no significant variation during the following hour (repeated measures ANOVA). At 10.00 h, serum cortisol concentrations varied from 146–222 nmol/l (182.98 ± 31.49 nmol/l). At the same time, salivary cortisol concentrations varied from 0.59–2.21 nmol/l (1.27 ± 0.60 nmol/l), values that are also not significantly different from those measured before the catheter placement (repeated measures ANOVA).

[96] RESULTATS ET DISCUSSION/Validation de l'utilisation de la salive

During an ACTH stimulation test: Figure 10 illustrates both the serum and the saliva cortisol responses, after ACTH administration. Thirty minutes earlier, the serum cortisol concentration (baseline) varied from 125–224 nmol/l (148.14 ± 42.69 nmol/l). Ten minutes after ACTH administration, the cortisol concentration was higher than baseline (repeated measures ANOVA, $P < 0.01$). In the mean for the 5 horses, the peak was reached in serum after 96 ± 16.7 min; this peak was 356.98 ± 55.29 nmol/l. Thereafter, serum cortisol concentration decreased regularly to return to baseline at 280 min after ACTH injection (repeated measures ANOVA, $P < 0.05$). We noticed that at 400 min after ACTH administration, the serum cortisol concentration dropped below the baseline (repeated measures ANOVA, $P < 0.01$), to reach a concentration of 62.39 ± 16.14 nmol/l, at 500 min after ACTH injection. Thirty minutes before stimulation, salivary cortisol concentrations (baseline) varied from 0.46–3.14 nmol/l (1.23 ± 1.08 nmol/l). In saliva, cortisol concentration was significantly higher than baseline after 30 min (repeated measures ANOVA, $P < 0.05$) and after 40 min ($P < 0.01$), 20–30 min later than in blood. The mean peak was 21.79 ± 7.74 nmol/l, appearing about 124 ± 8.9 min after ACTH administration. The salivary cortisol concentration came back to baseline after 180 min ($P > 0.05$), 100 min earlier than in blood (Figure 10)

On average, the peak was reached in serum after 96 ± 16.7 min and in saliva after 124 ± 8.9 min. Times needed to reach the peak are significantly different (paired Student t test, $P < 0.05$). Times to come back to baseline were also different: about 280 min in serum and 180 min in saliva.

The mean percentage of discharge in serum was 225% (148.14–358.08 nmol/l), while it was 2150% in saliva (1.23–21.79 nmol/l) (significantly different, paired Student t test, $P < 0.05$).

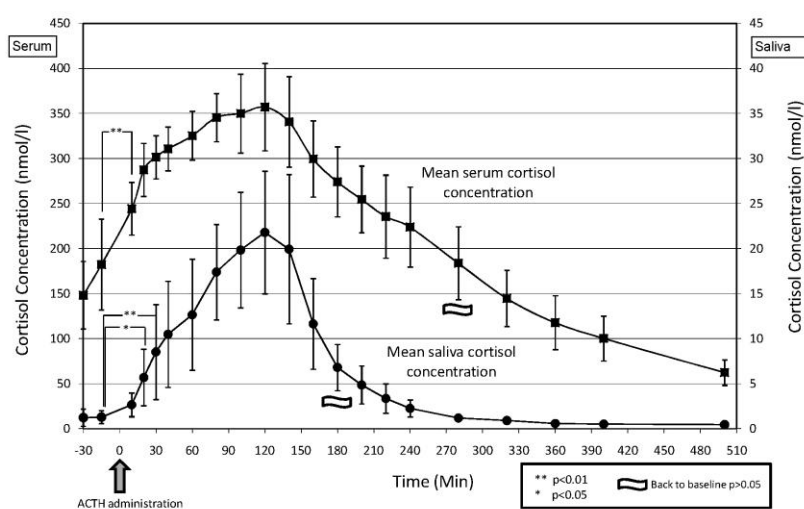


Figure 10 : Means of total serum cortisol concentration and saliva cortisol concentration during an ACTH challenge for the 5 horses.

Regression analysis

During the study, 127 sera and 127 salivas were sampled in parallel on the 5 horses. These results show a time lag between serum cortisol and saliva cortisol variation. As expected, saliva cortisol increasing appears 20–30 min later than in serum. Because this time lag is changeable, depending on intensity and duration of stressor, statistical analysis was based on values gathered simultaneously. There was a strong association between salivary and serum cortisol as shown by a Pearson correlation coefficient of 0.90 and an adjusted r^2 of 0.80 ($P < 0.0001$). This means that 80% of the salivary cortisol concentration variability could be explained by the serum cortisol concentration and reciprocally. The obtained classical linear regression (Figure 11) model is shown below:

$$\text{Cortisol}_{\text{serum}} = 159 + 56.7 \log_e \text{cortisol}_{\text{saliva}}$$

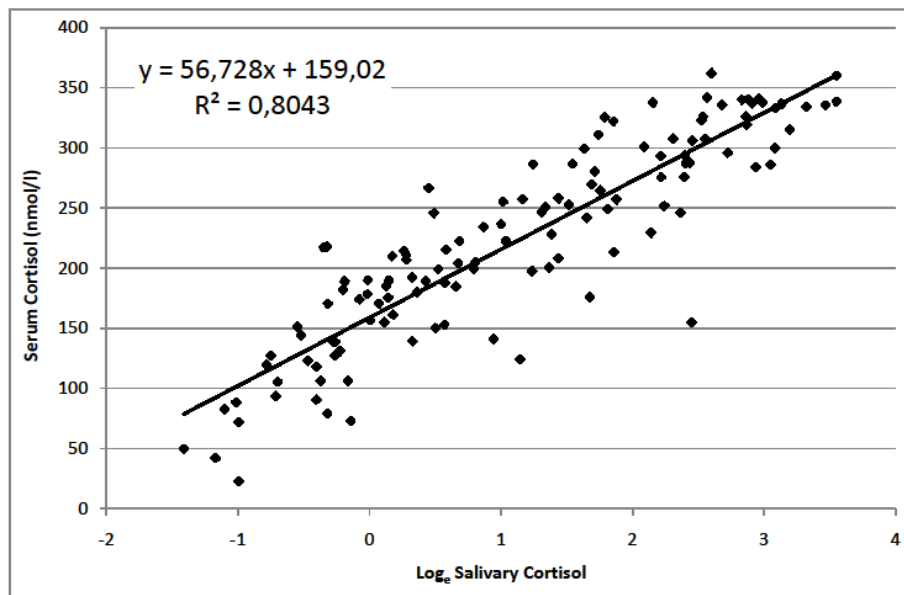


Figure 11 : Linear regression found between total serum cortisol concentration and saliva cortisol concentration, for the 5 horses, during an ACTH challenge.

DISCUSSION

In previous studies in man (Walker et al. 1978; Lac 2001) and in dogs (Beerda et al. 1996), the RIA method was found to be sensitive and reproducible for cortisol concentration determination in both serum and saliva. In horses, there are few studies about the validation of salivary cortisol as an indicator of HPA activity. Saliva and blood samples on a small range of value were collected (Pell and McGreevy 1999; Creighton et al. 2004). If an ACTH stimulation test was used, the authors collected insufficient samples to find a significant regression (van der Kolk et al. 2001). The i.v. injection of ACTH to horses stimulates the HPA axis and induces a wide range of cortisol values in serum and saliva. This technique was used to compare salivary and serum cortisol rises, around a standardised

physiological stress and the physiological response of cortisol after ACTH injection validated this RIA study from low (0.24 nmol/l in saliva and 45 nmol/l in serum) to high values of cortisol (35 nmol/l in saliva and 420 nmol/l in serum). In the present study, RIA was a sensitive and specific method to measure cortisol concentration in horses precisely, in 2 very different fluids, serum and saliva, as previously validated by Hughes et al. (2006) in saliva.

Cortisol concentrations obtained during resting time are in agreement with results from other studies, for both serum (Alexander et al. 1991; Anderson et al. 1999; Cavallone et al. 2002) and saliva (Pell and McGreevy 1999; van der Kolk et al. 2001) concentrations. Cortisol concentrations during venous catheter placement increased, but did not differ significantly from baseline, in both serum and saliva. This means that catheter placement should not involve as high a stress to horses as transport (Fazio et al. 2008; Schmidt et al. 2010b) or competition (Cayado et al. 2006).

In serum, the cortisol response to ACTH challenge was in accordance with previous studies in horses, with the same timing and peak amplitude (van der Kolk et al. 2001; Bousquet-Mélou et al. 2006). Bousquet-Mélou et al. (2006) obtained, for the same ACTH quantity, the same timing and amplitude for serum cortisol concentrations. Van der Kolk et al. (2001) also used an ACTH challenge to compare serum and salivary cortisol concentrations. They took 3 saliva samples and 3 blood samples after ACTH administration (after 2, 4 and 6 h). Their peak on the first sample (ACTH + 2 h) and concentration correspond to our peak (20.40 ± 5.50 and 413.0 ± 91.6 nmol/l in saliva and serum).

Many studies have found a significant positive correlation between serum and salivary cortisol, for example in man (Demey-Ponsart et al. 1986), guinea pigs (Fenske 1996) and cattle (Negrao et al. 2004). In a previous study (Peeters et al., 2008), a positive correlation of 0.55 ($P < 0.05$) was found between mean cortisol concentrations (5 samples/day) in serum and saliva in horses. Some previous studies found no such correlation (Pell and McGreevy 1999) while others found a correlation, but only with a few samples (Lebelt et al. 1996). In the present study, the saliva/serum correlation was positive and significant ($r^2 = 0.90$; $P < 0.001$; $n = 127$) and there was a strong association between salivary and total serum cortisol concentrations as shown by an adjusted r^2 of 0.80 ($P < 0.001$), meaning that 80% of the salivary cortisol concentration variability could be explained by the total serum cortisol concentration and reciprocally. The regression relationship between these concentrations was therefore calculated and the relation can be more precisely illustrated with the following formula: $\text{cortisol}_{\text{serum}} = 159 + 56.7 \log_e \text{cortisol}_{\text{saliva}}$. The total serum cortisol concentration can be deduced from this formula, for salivary cortisol concentrations 0.24–34.83 nmol/l. Bousquet-Mélou et al. (2006) and Dorin et al. (2009) found that free cortisol in serum is not proportional to total serum cortisol. This explains the nonlinearity of the relationship between total serum and salivary cortisol concentrations found in the present study. This nonlinearity might be due to the variable saturation state of CBG and albumin. The maximal binding capacity of CBG is reached during an ACTH test (Bousquet-Mélou et al. 2006). In stress research, a biologically active cortisol form gives us more information about HPA axis activity.

Studies comparing free serum cortisol to salivary cortisol in horses may lead to a linear relation as found for man (Arafah et al. 2007). Under stress conditions, the CBG becomes saturated, leading to an increase in free cortisol. This fact explains why the relative increase of cortisol in saliva is higher than in serum (about 10 times more). This high increase in salivary cortisol has already been found in previous studies on dogs (Vincent and Michell 1992) and horses (van der Kolk et al. 2001).

Cortisol concentrations came back to baseline faster in saliva than in serum (100 min faster). In horses, saliva sampling should therefore be preferred to blood sampling for stress level assessment, as Hellhammer et al. (2009) indicated for human individuals. In human research, le Roux et al. (2003) also found that free cortisol index is a better indication of HPA axis activity than serum total cortisol, all the more in acute stress situation, when CBG fall dramatically (le Roux et al. 2003). However, the time lag varies between serum and saliva cortisol. The regression found does not mean that saliva cortisol concentration can be used to calculate serum cortisol concentration but saliva cortisol concentration can be used to detect HPA axis activity as with serum cortisol. Moreover, salivary cortisol concentration seems to be more expressive and more specific to assess an increase of the HPA axis activity.

In others species, authors have already postulated that saliva sampling is a good alternative to blood sampling for free cortisol measurements. They explain this by various factors endorsed in the present study: 1) saliva is easy and noninvasive to collect; 2) in saliva, there is only free cortisol, so no separation manipulation is needed; 3) salivary cortisol concentration is independent of flow rate (Riad-Fahmy et al. 1982); according to the present results, also 4) cortisol in saliva has a higher increase when stress occurs (10 times more than in serum) and 5) salivary cortisol concentrations come back to baseline faster than serum concentrations; these points permit a better determination of stress occurring. In the present study a regression formula was also calculated to compare results from studies that used serum cortisol concentration to assess HPA axis activity.

In conclusion, as expected, saliva sampling and saliva RIAs are valid and noninvasive techniques for cortisol measurement in horses. The study agrees with Lebelt et al. (1996) that saliva may become the body fluid of choice for monitoring stress. The kinetics of salivary cortisol concentrations around a standardised stress are further revealed and this information is useful to determine good timing for saliva sampling in future stress and/or welfare studies in horses, as reported by Peeters et al. (2010).

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Julie Désirant for assistance with the English translation. We thank the Reproduction Physiology department of the University of Liège (Belgium) for its cordial welcome to its laboratory. We also thank the Physiology department of the Veterinary faculty for practical help. The work was supported by grants from the FRIA-FNRS. No conflicts of interest have been declared.

[100] RESULTATS ET DISCUSSION/Validation de l'utilisation de la salive

MANUFACTURERS' ADDRESSES

¹Jorvet, Loveland, Colorado, USA.

²Novartis, Vilvoorde, Belgium.

³Sarstedt, Nümbrecht, Germany.

⁴Fluka, Bornem, Belgium.

⁵BDH, Leuven, Belgium.

⁶Merck, Leuven, Belgium.

⁷INC Biochemicals, Aurora, Ohio, USA.

⁸Sigma, St Louis, Missouri, USA.

⁹Research Plus, Bayonne, New Jersey, USA.

¹⁰PerkinElmer, Zaventem, Belgium.

¹¹LKB Wallac, Turku, Finland.

¹²Eastman Kodak Co., Rochester, New York, USA.

¹³<http://www.R-project.org>

REFERENCES

Alexander, S.L. and Irvine, C.H. (1998) The effect of social stress on adrenal axis activity in horses: The importance of monitoring corticosteroid-binding globulin capacity. *J. Endocrinol.* **157**, 425-432.

Alexander, S.L., Irvine, C.H., Ellis, M.J. and Donald, R.A. (1991) The effect of acute exercise on the secretion of corticotropin-releasing factor, arginine vasopressin, and adrenocorticotropin as measured in pituitary venous blood from the horse. *Endocrinol.* **128**, 65-72.

Anderson, M.K., Friend, T.H., Evans, J.W. and Bushong, D.M. (1999) Behavioral assessment of horses in therapeutic riding programs. *Appl. anim. behav. Sci.* **63**, 11-24.

Arafah, B.M., Nishiyama, F.J., Tlaygeh, H. and Hejal, R. (2007) Measurement of salivary cortisol concentration in the assessment of adrenal function in critically ill subjects: A surrogate marker of the circulating free cortisol. *J. clin. Endocrinol. Metab.* **92**, 2965-2971.

Banga-Mboko, H., Sulon, J., Closset, J., Remy, B., Youssao, I., De Sousa, N.M., El Amiri, B., Sangild, P.T., Maes, D. and Beckers, J.F. (2003) An improved radioimmunoassay for measurement of pepsinogen in porcine blood samples. *Vet. J.* **165**, 288-295.

Beerda, B., Schilder, M.B.H., Janssen, N.S.C.R.M. and Mol, J.A. (1996) The use of saliva cortisol, urinary cortisol, and catecholamine measurements for a noninvasive assessment of stress responses in dogs. *Horm. Behav.* **30**, 272-279.

Bousquet-Mélou, A., Formentini, E., Picard-Hagen, N., Delage, L., Laroute, V. and Toutain, P.-L. (2006) The adrenocorticotropin stimulation test: Contribution of a physiologically based model developed in horse for its interpretation in different pathophysiological situations encountered in man. *Endocrinol.* **147**, 4281-4291.

Bushong, D.M., Friend, T.H. and Knabe, D.A. (2000) Salivary and plasma cortisol response to adrenocorticotropin administration in pigs. *Lab. Anim.* **34**, 171-181.

Calixto, C., Martinez, F.E., Jorge, S.M., Moreira, A.C. and Martinelli, C.E. (2002) Correlation between plasma and salivary cortisol levels in preterm infants. *J. Pediatr.* **140**, 116-118.

Castro, M., Elias, P.C.L., Martinelli, C.E.J., Antonini, S.R.R., Santiago, L. and Moreira, A.C. (2000) Salivary cortisol as a tool for physiological studies and diagnostic strategies. *Braz. J. med. biol. Res.* **33**, 1171-1175.

Cavallone, E., Giancamillo, M.D., Secchiero, B., Belloli, A., Pravettoni, D. and Rimoldi, E.M. (2002) Variations of serum cortisol in Argentine horses subjected to ship transport and adaptation stress. *J. equine vet. Sci.* **22**, 541-545.

Cayado, P., Munoz-Escassi, B., Dominguez, C., Manley, W., Olabarri, B., Sanchez de la Muela, M., Castejon, F., Maranon, G. and Vara, E. (2006) Hormone response to training and competition in athletic horses. *Equine vet. J., Suppl.* **36**, 274-278.

Clark, D.K., Friend, T.H. and Dellmeier, G. (1993) The effect of orientation during trailer transport on heart rate, cortisol and balance in horses. *Appl. anim. behav. Sci.* **38**, 179-189.

Covalesky, M.E., Russoniello, C.R. and Malinowski, K. (1992) Effects of showjumping performance stress on plasma cortisol and lactate concentrations and heart rate and behavior in horses. *J. equine vet. Sci.* **12**, 244-251.

Creighton, E., Hughes, T. and Coleman, R. (2004) Validation of salivary cortisol as an indicator of stress in horses (*Equus caballus*). In: *Proceedings of the 38th International Congress of the ISAE*, Col. University of Helsinki, Finland. p 186.

Demey-Ponsart, E., Sulon, J., Sodoyer, J.C., Bourque, J., Gaspard, U.J. and van Cauwenberge, H. (1986) Stéroïdes salivaires et hormones plasmiques libres chez la femme. *J. Gynécol. Obstet. Biol. Reprod.* **15**, 615-619.

Dorin, R.I., Pai, H.K., Ho, J.T., Lewis, J.G., Torpy, D.J., Urban Iii, F.K. and Qualls, C.R. (2009) Validation of a simple method of estimating plasma free cortisol: Role of cortisol binding to albumin. *Clin. Biochem.* **42**, 64-71.

Elsaesser, F., Klobasa, F. and Ellendorff, F. (2001) Evaluation of salivary cortisol determination and of cortisol responses to ACTH as markers of the training status/fitness of warmblood sports horses. *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.* **108**,31-36.

Fazio, E., Medica, P., Aronica, V., Grasso, L. and Ferlazzo, A. (2008) Circulating beta-endorphin, adrenocorticotrophic hormone and cortisol levels of stallions before and after short road transport: Stress effect of different distances. *Acta vet. Scand.* **50**, 6.

Fell, L., Shutt, D. and Bentley, C. (1985) Development of a salivary cortisol method for detecting changes in plasma 'free' cortisol arising from acute stress in sheep. *Aust. vet. J.* **62**, 403-406.

Fenske, M. (1996) Saliva cortisol and testosterone in the guinea pig: measures for the endocrine function of adrenals and testes? *Steroids* **61**, 647-650.

Francis, S.J., Walker, R.F., Riad-Fahmy, D., Hughes, D., Murphy, J.F. and Gray, O.P. (1987) Assessment of adrenocortical activity in term newborn infants using salivary cortisol determinations. *J. Pediatr.* **111**, 129-133.

Garde, A.H. and Hansen, A.M. (2005) Long-term stability of salivary cortisol. *Scand. J. clin. Lab. Invest.* **65**, 433-436.

Greenwood, F.C., Hunter, W.M. and Glover, J.S. (1963) The preparation of 131-I-labelled human growth hormone of high specific radioactivity. *Biochem. J.* **89**,14-123.

Harewood, E.J. and McGowan, C.M. (2005) Behavioral and physiological responses to stabling in naive horses. *J. equine vet. Sci.* **25**, 164-170.

Hellhammer, D.H., Wüst, S. and Kudielka, B.M. (2009) Salivary cortisol as a biomarker in stress research. *Psychoneuroendocrinol.* **34**, 163-171.

Hennessy, M.B., Voith, V.L., Mazzei, S.J., Buttram, J., Miller, D.D. and Linden, F. (2001) Behavior and cortisol levels of dogs in a public animal shelter, and an exploration of the ability of these measures to predict problem behavior after adoption. *Appl. anim. behav. Sci.* **73**, 217-233.

Hughes, T., Creighton, E. and Coleman, R. (2006) Validation of salivary cortisol as an indicator of HPAactivity in horses. *Proceedings of the 41st International Congress of the ISAE*, Merida, Mexico. p 157.

[102] RESULTATS ET DISCUSSION/Validation de l'utilisation de la salive

Jongman, E.C., Bidstrup, I. and Hemsworth, P.H. (2005) Behavioural and physiological measures of welfare of pregnant mares fitted with a novel urine collection device. *Appl. anim. behav. Sci.* **93**, 147-163.

Krawczel, P.D., Friend, T.H., Caldwell, D.J., Archer, G. and Ameiss, K. (2007) Effects of continuous versus intermittent transport on plasma constituents and antibody response of lambs. *J. anim. Sci.* **85**, 468-476.

Lac, G. (2001) Saliva assays in clinical and research biology. *Pathol. Biol.* **49**, 660-667.

le Roux, C.W., Chapman, G.A., Kong, W.M., Dhillon, W.S., Jones, J. and Alaghband-Zadeh, J. (2003) Free cortisol index is better than serum total cortisol in determining hypothalamic-pituitary-adrenal status in patients undergoing surgery. *J. clin. Endocrinol. Metab.* **88**, 2045-2048.

Lebelt, D., Schonreiter, S. and Zanella, A.J. (1996) Salivary cortisol in stallions: The relationship with plasma levels, daytime profile and changes in response to semen collection. *Pferdeheilkunde* **12**, 411-414.

McGreevy, P. and Nicol, C. (1998) Physiological and behavioral consequences associated with short-term prevention of crib-biting in horses. *Physiol. Behav.* **65**, 15-23.

Mears, C.J. and Brown, F.A. (1997) Cortisol and b-endorphin responses to physical and physiological stressors in lambs. *Can. J. anim. Sci.* **77**, 689-694.

Moons, C.P.H., Laughlin, K. and Zanella, A.J. (2005) Effects of short-term maternal separations on weaning stress in foals. *Appl. anim. behav. Sci.* **91**, 321-335.

Mormède, P., Andanson, S., Aupérin, B., Beerda, B., Guémené, D., Malmkvist, J., Manteca, X., Manteuffel, G., Prunet, P., van Reenen, C.G., Richard, S. and Veissier, I. (2007) Exploration of the hypothalamic-pituitary-adrenal function as a tool to evaluate animal welfare. *Physiol. Behav.* **92**, 317-339.

Möstl, E. and Palme, R. (2002) Hormones as indicators of stress. *Domest. Anim. Endocrinol.* **23**, 67-74.

Negrao, J.A., Porcionato, M.A., de Passille, A.M. and Rushen, J. (2004) Cortisol in saliva and plasma of cattle after ACTH administration and milking. *J. Dairy Sci.* **87**, 1713-1718.

Nicolson, N., Storms, C., Ponds, R. and Sulon, J. (1997) Salivary cortisol levels and stress reactivity in human aging. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* **52**, M68-M75.

Peeters, M., Péters, F., Sulon, J., Sandersen, C., Poncin, P., Serteyn, D. and Vandenheede, M. (2008) Behavioural and physiological assessment of stress level in hospitalised horses: Correlation between parameters. In: *The 42nd Congress of the International Society for Applied Ethology*, Eds: L. Boyle, N. O'Connell and A. Hanlon, UCD in Dublin, Dublin. p 153.

Peeters, M., Sulon, J., Serteyn, D. and Vandenheede, M. (2010) Assessment of stress level in horses during competition using salivary cortisol: preliminary studies. *J. Vet. Behav. Clin. Appl. Res.* **5**, 216.

Pell, S.M. and McGreevy, P.D. (1999) A study of cortisol and beta-endorphin levels in stereotypic and normal Thoroughbreds. *Appl. anim. behav. Sci.* **64**, 81-90.

Poon, C.-S. (1988) Analysis of linear and mildly nonlinear relationships using pooled subject data. *J. appl. Physiol.* **64**, 854-859.

Riad-Fahmy, D., Read, G.F., Walker, R.F. and Griffiths, K. (1982) Steroids in saliva for assessing endocrine function. *Endocr. Rev.* **3**, 367-395.

Ronayne, E. and Hynes, N. (1990) Measurement of plasma progesterone concentrations by extraction and non-extraction radioimmunoassays. *Irish J. Agric. Res.* **29**, 109-115.

Roy, M.P., Kirschbaum, C. and Steptoe, A. (2001) Psychological, cardiovascular, and metabolic correlates of individual differences in cortisol stress recovery in youngmen. *Psychoneuroendocrinol.* **26**, 375-391.

Rushen, J., Munksgaard, L., Marnet, P.G. and DePassillé, A.M. (2001) Human contact and the effects of acute stress on cows at milking. *Appl. anim. behav. Sci.* **73**, 1-14.

Schmidt, A., Mostl, E., Aurich, J., Neuhauser, S. and Aurich, C. (2009) Comparison of cortisol and cortisone levels in blood plasma and saliva and cortisol metabolite concentrations in faeces for stress analysis in horses. In: *5th International Equitation Science Conference* Eds: P. McGreevy, A. Warren-Smith and C. Oddie, Sydney. p 53.

Schmidt, A., Biau, S., Möstl, E., Becker-Birck, M., Morillon, B., Aurich, J., Faure, J.M. and Aurich, C. (2010a) Changes in cortisol release and heart rate variability in sport horses during long-distance road transport. *Domest. Anim. Endocrinol.* **38**, 179-189.

Schmidt, A., Möstl, E., Wehnert, C., Aurich, J., Müller, J. and Aurich, C. (2010b) Cortisol release and heart rate variability in horses during road transport. *Horm. Behav.* **57**, 209-215.

Skelley, D.S., Brown, L.P. and Besch, P.K. (1973) Radioimmunoassay. *Clin. Chem.* **19**, 146-186.

Sulon, J., Demey-Ponsart, L., Beauduin, P. and Sodoyez, J.C. (1978) Radioimmunoassay of corticosterone, cortisol and cortisone: their application to human cord and maternal plasma. *J. Steroid Biochem.* **9**, 671-676.

Van der Kolk, J.H., Nachreiner, R.F., Schott, H.C., Refsal, K.R. and Zanella, A.J. (2001) Salivary and plasma concentration of cortisol in normal horses and horses with Cushing's disease. *Equine vet. J.* **33**, 211-213.

Van Eck, M., Berkhof, H., Nicolson, N. and Sulon, J. (1996) The effects of perceived stress, traits, mood states, and stressful daily events on salivary cortisol. *Psychosom. Med.* **58**, 447-458.

Vincent, I.C. and Michell, A.R. (1992) Comparison of cortisol concentrations in saliva and plasma of dog. *Res. vet. Sci.* **53**, 342-345.

Walker, R.F., Riad-Fahmy, D. and Read, G.F. (1978) Adrenal status assessed by direct radioimmunoassay of cortisol in whole saliva or parotid saliva. *Clin. Chem.* **24**, 1460-1463.

Wolf, J.M., Nicholls, E. and Chen, E. (2008) Chronic stress, salivary cortisol, and [alpha]-amylase in children with asthma and healthy children. *Biol. Psychol.* **78**, 20-28.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

M.P. and M.V. conducted the study, from the conception and design to the acquisition, analysis and interpretation of data; J.S. and J.-F.B. collaborated for cortisol radioimmunoassay; D.L. gave valuable help with statistical analysis; M.P. and M.V. wrote the article and all the other authors revised it and approved the final version to be submitted.

PARTIE 2

EVALUATION DU NIVEAU DE STRESS EN COMPÉTITION



SITUATION

La compétition équestre est une situation potentiellement stressante pour le cheval. Elle implique des changements de routine (hébergement, alimentation, entraînement...), des changements au niveau des contacts sociaux (chevaux inconnus, cavaliers, juges, vétérinaires...), une mise en présence d'éléments nouveaux (environnement inconnu, bruit) et tout cela surimposé à une demande physique intense (entraînement, compétition, transport...). La qualité de la présence humaine est également différente (agitation, tension, excitation, nervosité...). Les cavaliers comme les chevaux peuvent être affectés par le stress à des degrés divers, que ce soit en termes de santé, de bien-être ou de performances. Les accidents liés à des réactions associées en partie au stress sont nombreux. Pourtant, peu d'études se sont intéressées au stress en sport équestre (voir le chapitre « Le stress et la compétition », p.73).

OBJECTIFS

Nous avons décidé d'explorer les possibilités d'effectuer des mesures du niveau de stress du cheval et ensuite du cavalier en compétition. Les prélèvements de sang pour doser le cortisol n'étant pas toujours bien acceptés par le propriétaire ni par le cheval, nous avons donc voulu tester l'utilisation de la salive comme alternative non invasive au prélèvement sanguin, et ce lors de prélèvements sur un terrain assez mouvementé qu'est la compétition équestre (voir l'étude p.113 et la publication p.121).

À l'objectif principal s'ajoute celui de tenter de voir s'il existe une relation entre le tempérament du cheval et le niveau de stress qu'il manifeste en compétition et donc d'apprécier s'il est possible de définir le profil comportemental « type » d'un cheval stressé en compétition (voir l'étude p.133).

ÉTUDES PRÉLIMINAIRES

SITUATION 1

Nos études préliminaires ont débuté en 2008 lors d'un concours complet d'équitation (CCE) international, organisé à Tongeren (Belgique). Nous avons commencé par un prélèvement de sang et un de salive, juste avant et juste après le passage de l'épreuve de cross-country, chez cinq chevaux. La raison pour laquelle nous avons ici continué à doser le cortisol dans le sang est que ces chevaux étaient également suivis par des vétérinaires pour une autre étude, nécessitant les prélèvements de sang.

SITUATION 2

Lors d'une seconde étude préliminaire, nous avons suivi cinq chevaux et un cavalier à domicile ainsi que pendant toute la journée comprenant les trois épreuves constituant le CCE. Ce CCE s'est déroulé à Theux (Belgique).

Lors de cette étude, nous avons voulu tester en pratique un suivi du cortisol salivaire pendant la totalité d'un CCE. Mais nous avons également voulu comparer le niveau de stress du cheval évalué par le cortisol avec l'appréciation du tempérament du cheval par le cavalier. Nous nous sommes également intéressés au cortisol salivaire d'un cavalier pour évaluer son niveau de stress.

À domicile, les chevaux ont été échantillonnés toutes les 2 heures, entre 8h et 20h, pour déterminer les valeurs de base pour chaque cheval sur une journée de repos. Lors du CCE, les prélèvements de salive ont été échantillonnés à l'arrivée sur le lieu de la compétition, avant l'échauffement, avant le début de l'épreuve, juste après l'épreuve et 30, 60 et 120 minutes après l'épreuve. Cela a été réalisé pour les trois épreuves, le saut d'obstacles, le dressage et le cross-country, ce qui fait un minimum de 13 prélèvements par cheval, le jour de la compétition.



Figure 12 : Illustration des épreuves composant les CCE

RÉSULTATS 1

La concentration moyenne en cortisol sanguin avant l'épreuve est de $166,73 \pm 27,34$ nmol/L, et après l'épreuve de $232,38 \pm 43,81$ nmol/L. Dans la salive, la concentration moyenne en cortisol est de $1,19 \pm 0,83$ nmol/L avant l'épreuve et de $4,03 \pm 2,41$ nmol/L après l'épreuve. Ces augmentations sont significatives dans le sang ($n = 5$, paired t test, $p < 0,05$) ainsi que dans la salive ($n = 5$, paired t test, $p < 0,05$). Dans le sang l'augmentation est approximativement de 140 %, et dans la salive de 340 %.

RÉSULTATS 2

La concentration en cortisol salivaire moyenne au repos, pour les 5 chevaux, est de $0,59 \pm 0,40$ nmol/L et lors de la journée de compétition de $2,13 \pm 1,49$ nmol/L. Cette moyenne augmente significativement ($n = 5$, t test, $p < 0,001$) et approximativement de 360 %. Un pic de cortisol salivaire est observé juste après l'épreuve de dressage ($3,59 \pm 2,26$ nmol/L), de saut d'obstacles ($2,26 \pm 0,72$ nmol/L) et de cross-country ($2,29 \pm 1,09$ nmol/L). La concentration moyenne en cortisol salivaire du cavalier est de $3,51 \pm 2,42$ nmol/L au repos et de $4,9 \pm 4,99$ nmol/L pendant la journée de CCE (augmentation non significative). On observe un pic juste après le cross-country ($14,50$ nmol/L). Lorsque l'on compare les taux de cortisol salivaire mesurés chez le

cavalier et ceux de son cheval lors de la journée de compétition, on obtient une corrélation positive, significative (corrélation de Pearson $r = 0,54$, $p < 0,01$).

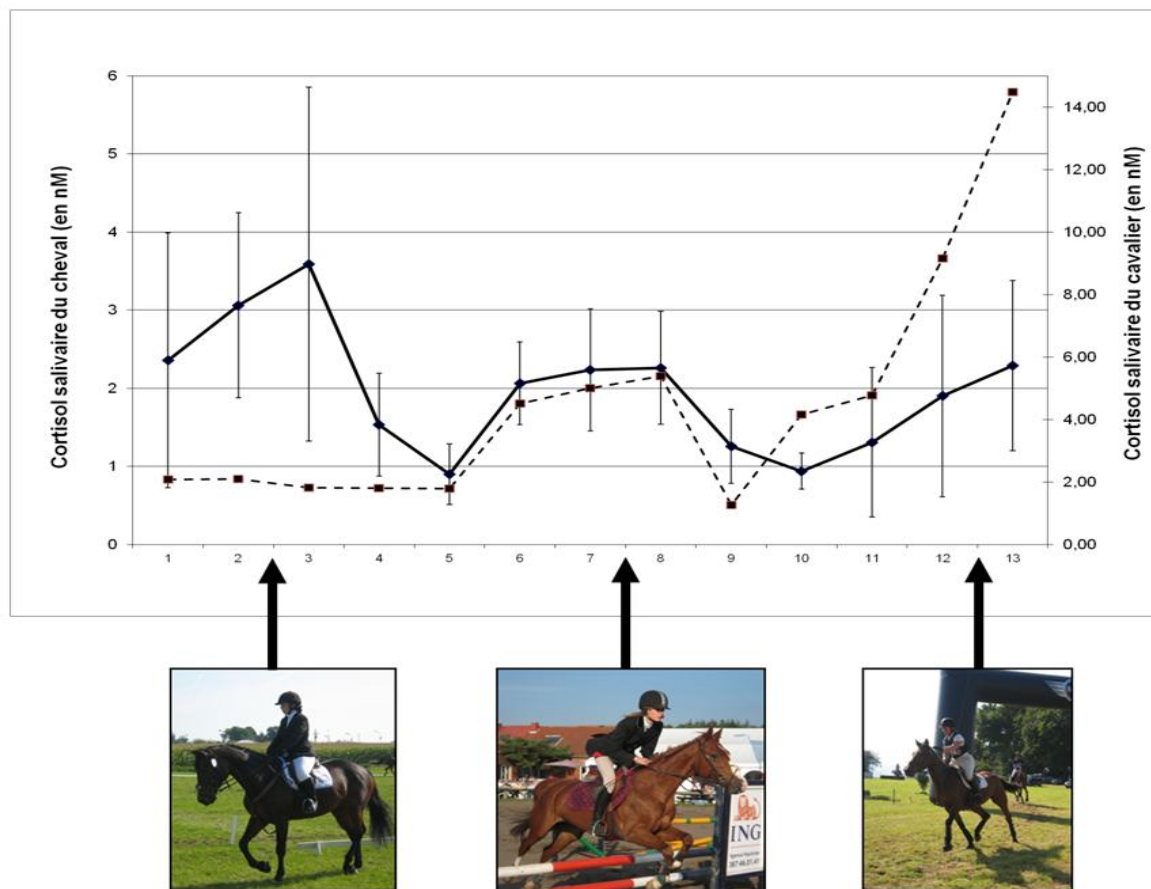


Figure 13 : Evolution du cortisol salivaire sur une journée de compétition Pour le cavalier (trait interrompu) et moyenne pour les cinq chevaux (trait plein). Prélèvement avant échauffement (1), en début (2) et fin (3) de l'épreuve de dressage, 30 min (4) et 60 min (5) après l'épreuve de dressage, avant échauffement (6), au début (7) et en fin (8) de l'épreuve de jumping, 30 min (9) et 60 min (10) après l'épreuve de jumping, avant l'échauffement (11), au début (12) et à la fin (13) de l'épreuve de cross

DISCUSSION 1

Cette première étude nous permet de conclure que :

- (1) les prélèvements de salive sont réalisables lors d'une compétition équestre ;
- (2) les concentrations en cortisol sanguin et salivaire augmentent de façon significative lors de l'épreuve de cross-country d'un CCE ;
- (3) l'augmentation en cortisol dans la salive est plus importante que dans le sang.

Nous devons également signaler que pour les prélèvements de sang, un vétérinaire doit être présent sur le terrain, et les échantillons doivent être directement centrifugés. Cela n'est pas le cas pour les échantillons de salive, qui peuvent être stockés au frais 24h avant centrifugation, et être réalisés par toute personne habituée à manipuler un cheval.

DISCUSSION 2

Cette seconde étude nous confirme qu'il est possible de suivre l'évolution du cortisol salivaire de chevaux mais aussi de cavaliers lors de la totalité d'un CCE. La corrélation positive obtenue entre les taux de cortisol du cavalier et des deux chevaux qu'il a montés nous ouvre une voie d'étude sur le stress du couple cavalier/cheval en compétition. Ces mesures du stress devraient aussi permettre de tester l'effet positif ou négatif de diverses variables en compétition, et notamment d'apprécier l'effet de ce stress sur les performances.

ASSESSMENT OF STRESS LEVEL IN HORSES DURING COMPETITION
USING SALIVARY CORTISOL: PRELIMINARY STUDIES

M. PEETERS, J. SULON, D. SERTEYN, M. VANDENHEEDE

Communication orale lors du "15th International Equitation Science Conference"

Sydney – Australia – 12th-14th July 2009

During a competition period horses are submitted to various sources of stress which could have a negative influence on performance, welfare and human safety. Serum sampling for cortisol (a well-known indirect indicator of stress) is not always well accepted by the owner and can also be stressful for horses. These studies investigate saliva sampling as an alternative non-invasive method for cortisol level measurement in horses. In a first preliminary study, 5 horses were serum and saliva sampled, before and after a cross-country round. In the second study, 5 horses and one rider were saliva sampled at home (7 samples/12h) to assess their cortisol baseline and during a one day eventing competition (15-18 samples during training, around dressage, show-jumping and cross-country). During the first study, mean serum cortisol concentrations were 166.73 ± 27.34 nM before the cross country round and 232.38 ± 43.81 nM after ($n = 5$, paired T test, $p < 0.05$). Before the cross-country round, mean salivary cortisol levels were 1.19 ± 0.83 nM and 4.03 ± 2.41 nM after ($n = 5$, paired t test, $p < 0.05$). During the second study, horses mean salivary cortisol concentration was 0.59 ± 0.40 nM at home, and 2.13 ± 1.49 nM during competition ($n = 5$, T test, $p < 0.001$). Cortisol peaks were observed just after dressage (3.59 ± 2.26 nM), jumping (2.26 ± 0.72 nM) and cross-country (2.29 ± 1.09 nM) rounds. The rider's mean salivary cortisol concentration was 3.51 ± 2.42 nM ($n = 8$) at home and 4.9 ± 4.99 nM ($n = 28$) during competition, rising to 14.50 nM after a crosscountry round. A correlation was found between salivary cortisol levels of the rider and her horses during an eventing (Pearson correlation $r = 0.54$, $p < 0.01$, $n = 28$). Saliva seems thus to be a good alternative to serum to measure cortisol level in horses during competition. Further studies are needed to measure stress in riders, and the relationships with horses' stress.

Implications for the welfare of ridden horses: Equine Stress Management

Measurement of cortisol via saliva samples is suggested as an alternative to blood sampling. Saliva sampling is a less invasive and less 'upsetting' method for horse and rider. A validated measurement of stress of both horses and riders during competition should permit to test the effect of different variables (e.g. nutritional so-called 'stressless' additives, housing, transport, training, interaction rider-horse...) on performance and welfare of both "partners".

LE STRESS DU CAVALIER ET DU CHEVAL EN COMPÉTITION

Cette étude s'est réalisée en 2010 à l'Ecole Provinciale d'Elevage et d'Equitation de Gesves (EPEEG). Elle sera développée en deux temps. Nous commencerons par le suivi du niveau de stress en compétition et son impact sur les performances, pour ensuite étudier l'influence du tempérament du cheval sur son niveau de stress et ses performances.

LE STRESS DU CAVALIER ET DU CHEVAL EN COMPÉTITION : APPRÉCIATION, CINÉTIQUE ET IMPACT SUR LES PERFORMANCES

Stress of riders and horses in competition: assessment, kinetics and effect on performance

M. PEETERS, C. CLOSSON, J-F BECKERS, M. VANDENHEEDE

Communication poster lors de la "37ème Journée de la Recherche Equine"

Paris – Jeudi 24 février 2011

RÉSUMÉ

Lors de compétitions, le stress peut affecter les cavaliers comme les chevaux. Ce stress peut avoir des impacts en termes de santé, de bien-être et/ou de performance. Cette étude a pour objectifs de quantifier le niveau de stress en compétition, chez le cheval et chez le cavalier, et d'étudier son éventuelle relation avec les performances réalisées. 20 cavaliers et 23 chevaux ont été suivis lors d'un concours de saut d'obstacles, au sein d'une école d'équitation (au total, 26 passages en piste). Pendant les journées de compétition, des prélèvements réguliers de salive chez le cavalier et chez le cheval nous ont permis de doser les taux de cortisol (hormone de stress) dans la salive et d'en suivre l'évolution. Nous n'obtenons pas de corrélation significative entre les concentrations instantanées en cortisol salivaire chez le cavalier et chez le cheval. Cependant, l'étude de l'évolution des concentrations en cortisol salivaire nous montre une évolution en courbe chez le cheval comme chez le cavalier, avec un pic moyen qui apparaît 20 minutes après l'entrée en piste. Des corrélations apparaissent entre les concentrations en cortisol salivaire et les performances réalisées. L'étude du stress du cheval et de son cavalier devrait donc permettre d'améliorer les conditions et les performances en compétition.

Mots clés : Stress, Compétition, Cortisol, Cavalier, Chevaux

SUMMARY

During competition, stress may affect riders and horses. This stress can affect health, welfare and/or performance. Our aim is to quantify stress level during competition, on horses and riders. We also searched relationships between this stress level during competition and competition performances. Twenty rider and twenty-three horses have been followed during a jumping event (26 runnings), in an equitation school. Regular saliva samplings from horses and riders were assayed to value cortisol levels (stress hormone). We studied salivary cortisol evolution during the competition days. We didn't find any correlation between instantaneous sampling on horses and their rider. But we found a parallelism between horses and riders salivary cortisol evolution curves, with a similar peak, reached 20 minutes after running. Correlations appear between salivary cortisol concentration and performance. Stress level measurement in rider/horse pairs would thus lead to ameliorate competition conditions and performance, for horses as well as for riders.

Key-words: Stress, Competition, Cortisol, Riders, Horses

INTRODUCTION

Quelle que soit la discipline sportive, la compétition peut être source de stress. Le monde équestre n'y échappe pas. Les cavaliers comme les chevaux peuvent en être affectés à des degrés divers, que ce soit en termes de santé, de bien-être et/ou de performances. Pourtant, peu d'études se sont intéressées au stress en sport équestre. Le niveau de stress que présente un individu, cavalier ou monture, face à une situation dépend de la nature de l'événement, de sa durée, de son intensité (facteurs externes) mais aussi de la façon dont il est perçu par l'individu (facteurs internes).

Le stress n'est pas toujours néfaste. Le stress positif ou *eustress* est nécessaire pour s'adapter à l'environnement, mais aussi pour mobiliser les ressources, pour assurer des performances en compétition par exemple. Le stress devient néfaste lorsqu'il engendre des effets délétères sur la santé et le bien-être : on parle alors de *distress*. Celui-ci peut apparaître lorsque l'individu est en présence d'un stimulus stressant aigu ou chronique, qui dépasse ses capacités d'adaptation.

Dans cette étude, nous avons essayé de standardiser au maximum les facteurs externes pouvant influencer le stress du cavalier et du cheval (même jour, même lieu, même épreuve, même protocole...). Parmi les facteurs internes, propres aux individus, citons la génétique, l'expérience passée et le tempérament. Nous avons choisi la concentration en cortisol salivaire (CCS) pour mesurer l'activité de l'axe hypothalamus-hypophyse-glande surrénale. Ce stéroïde est largement utilisé comme reflet du stress chez l'homme (Kelly et al., 2008) ainsi que chez le cheval (Creighton et al., 2004; Peeters et al., 2010). La salive est le fluide corporel comprenant du cortisol libre le plus simple à utiliser en situation de compétition : les prélèvements sont faciles, ils ne provoquent pas de stress ni de douleur (Peeters et al., 2011). Il est décrit dans la littérature que le cortisol présent dans la

salive est une proportion du cortisol libre présent dans le sang (cortisol biologiquement actif). Cette concentration augmente dans la salive avec un certain décalage, entre 20 et 30 minutes, chez le cheval (Hughes et al., 2006; Peeters et al., 2011), ainsi que chez l'homme (Kirschbaum et al., 1989).

Cette étude a pour objectif de quantifier et d'étudier la cinétique du niveau de stress en compétition, chez le cheval et chez le cavalier, et de le mettre en relation avec les performances obtenues.

MÉTHODOLOGIE DE L'ÉTUDE

Nous avons suivi 20 cavaliers et 23 chevaux avant et pendant un concours de saut d'obstacles, interne à l'Ecole Provinciale d'Élevage et d'Équitation de Gesves (EPEEG), totalisant 26 passages en piste sur 2 jours consécutifs (les 6 cavaliers et les 3 chevaux suivis 2 fois l'ont été sur 2 jours différents). Le groupe de cavaliers est composé de jeunes filles âgées de 17 à 20 ans, toutes élèves à l'EPEEG. Le groupe des chevaux est composé de 12 juments et 11 hongres, âgés de 6 à 11 ans, tous hébergés à l'EPEEG. Les cavaliers sont propriétaires de leur monture et ont l'habitude de travailler ensemble.

Durant les 2 jours de concours, nous avons prélevé des échantillons de salive sur les cavaliers et les chevaux, selon un timing précis (9h le matin, à l'entrée en piste, 20, 40 et 60 minutes après le passage en piste). La salive des chevaux a été prélevée à l'aide d'un tampon monté sur une pince, et placé ensuite dans un tube ("salivette", ©SARSTED). Les cavaliers pouvaient choisir entre humidifier le tampon ou déposer directement de la salive dans la salivette. Les concentrations en cortisol (hormone de stress bien connue chez l'humain comme chez le cheval) ont été mesurées par dosage radio-immunologique (Peeters et al., 2011).

Les taux de cortisol salivaire de base chez des adolescentes sont bien décrits dans la littérature (Kelly et al., 2008). Pour les chevaux, nous avons observé qu'il existe une grande variabilité entre les individus (Peeters et al., 2010). C'est pourquoi nous avons, sur les chevaux, effectué 4 prélèvements de salive lors d'une matinée de repos à l'EPEEG, selon un protocole proposé par Schmidt et al. (2010) (Schmidt et al., 2010a). La moyenne de ces 4 prélèvements nous donne une CCS de base pour chaque cheval. Ces prélèvements n'ont pas pu être réalisés sur un cheval (absenté de l'école pour blessure).

Les performances ont été appréciées par le comptage des pénalités obtenues lors du passage en piste. Les pénalités sont attribuées par le jury lors des fautes suivantes : renversement d'un obstacle, refus ou dépassement du temps accordé.

Les données ont été soumises à une analyse de corrélation. Nous avons choisi le test de corrélation de Spearman (r_s) car la grande majorité de nos variables ne satisfont pas à l'hypothèse de normalité. Le seuil de signification est fixé à 5 % ($p = 0.05$). Lors de l'analyse de l'évolution des CCS, des tests t de Student (pour données appariées) ont été utilisés pour mesurer les différences entre les CCS.

RÉSULTATS OBTENUS ET INTERPRÉTATION

L'évolution de la CCS chez les chevaux en compétition

Au repos, la valeur moyenne de la CCS des chevaux est de $0,99 \pm 0,60$ nmol/l, et atteint un pic de $1,92 \pm 1,33$ nmol/l, 20 minutes après l'entrée en piste ($p = 0,004$). Cette augmentation est malgré tout assez faible (environ 100%) comparée à d'autres augmentations décrites dans la littérature (comme par exemple une augmentation de 600% lors d'un transport (Schmidt et al., 2010a)). La CCS moyenne revient au niveau de départ 60 min après le passage en piste ($1,18 \pm 0,57$ nmol/l). La valeur moyenne des CCS durant la journée de compétition ($1,56 \pm 1,18$ nmol/l) est supérieure à celle de la journée de repos ($p = 0,002$).

La CCS moyenne au moment d'entrer en piste est corrélée positivement à celle au moment du pic ($r_s = 0,53$) et à la CCS moyenne de la journée de compétition ($r_s = 0,69$). Cela implique qu'on pourrait, pour évaluer le taux de stress du cheval, se contenter de quelques prélèvements autour du passage en piste.

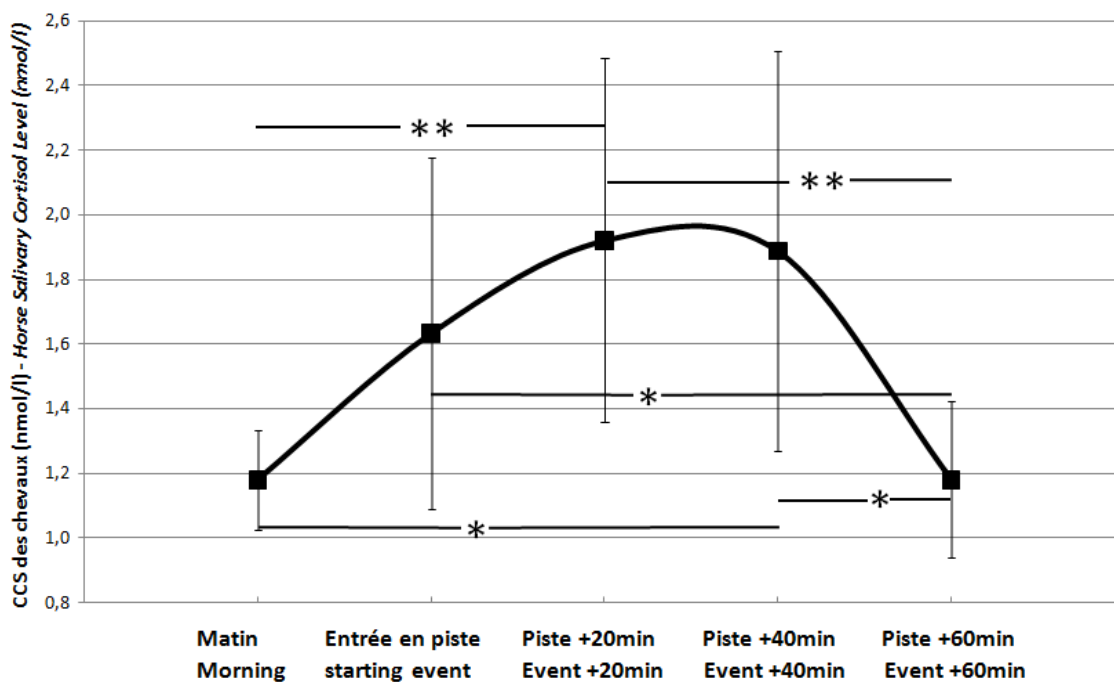


Figure 14 : Evolution des CCS des chevaux en compétition

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

L'évolution de la CCS chez les cavaliers en compétition

La CCS moyenne des cavaliers est de $8,28 \pm 4,99$ nmol/l lors de la compétition. L'augmentation entre les valeurs observées avant échauffement ($5,51 \pm 2,34$ nmol/l) et le pic en compétition 20 min après l'entrée en piste ($12,64 \pm 6,39$ nmol/l) est plus rapide et plus forte que celle des chevaux (environ 230% ; $p < 0,001$). Les CCS moyennes des cavaliers lors d'une journée de compétition sont corrélées à celles mesurées au moment de l'entrée en piste ($r_s = 0,75$), 20 minutes ($r_s = 0,92$),

40 minutes ($r_s = 0,89$) et 60 minutes ($r_s = 0,79$) après l'entrée en piste. Ce résultat nous permet de proposer, pour des études ultérieures, de se concentrer sur un ou 2 prélèvements de salive effectués autour des 20 minutes suivant l'entrée en piste, pour doser le niveau de stress du cavalier. Dans notre étude, les pics de CCS apparaissent 20 minutes après l'entrée en piste dans 90% des cas. 10% des cavaliers montrent un pic de cortisol salivaire au moment de l'entrée en piste, mais leur CCS 20 minutes après l'entrée en piste sont très proches du pic.

Relation entre les CCS des cavaliers et les décharges en CS des chevaux

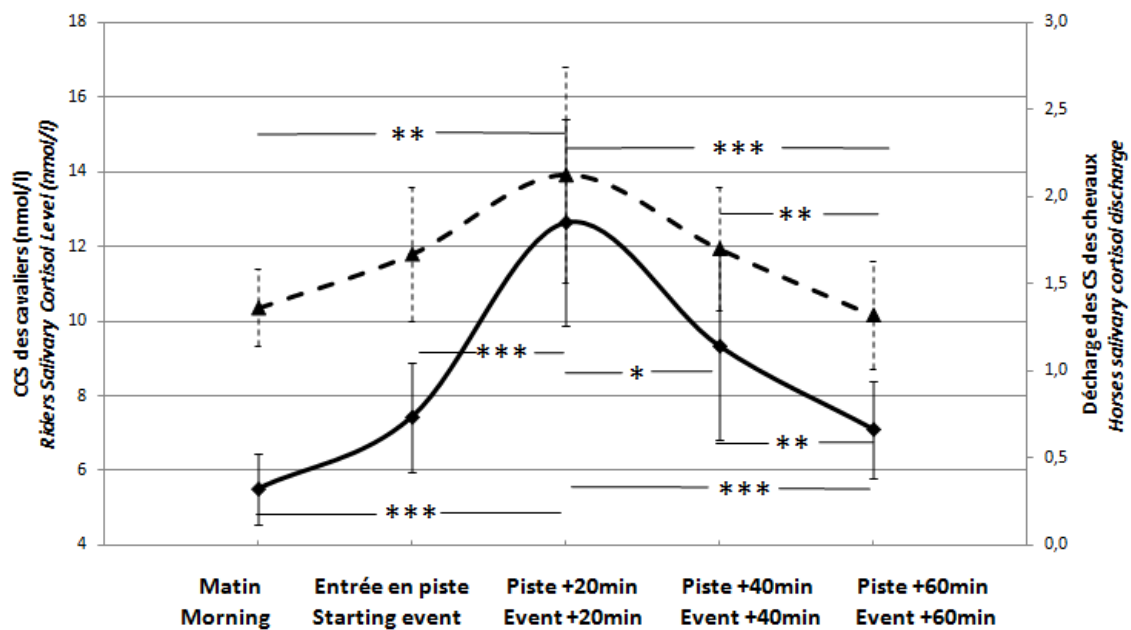


Figure 15 : Evolution des CCS des cavaliers des chevaux (décharges) en compétition. Evolution de la CCS des cavaliers (nmol/l)(trait continu), Evolution de la décharge en CS des chevaux (trait interrompu)

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Ce graphique permet de visualiser le parallélisme entre l'évolution des CCS moyennes chez les cavaliers et chez les chevaux. Toutefois, il n'y a pas de corrélation significative entre les valeurs mesurées sur les chevaux et celles de leur cavalier respectif.

Relation entre les CCS et performances

Le nombre de pénalités obtenues est corrélé de façon significative et positive aux CCS moyennes des cavaliers lors du pic ($r_s = 0,42$), 40 minutes ($r_s = 0,57$) et 60 minutes ($r_s = 0,58$) après le passage en piste. Un niveau de stress élevé chez le cavalier semble donc être lié à de mauvaises performances. Ce stress pourrait avoir été causé par une appréhension de la compétition, mais aussi entretenu par de mauvaises performances.

Le nombre de pénalités obtenues est corrélé de façon significative et négative à la décharge moyenne des CCS des chevaux au moment du pic ($r_s = -0,44$). Contrairement aux cavaliers, le stress du cheval semble ici favorable aux performances. Toutefois, il

faut rappeler que la décharge maximale (pic) observée chez les chevaux de notre étude est modeste par rapport à celles des cavaliers, ou à celles mesurées dans d'autres situations, comme le transport. Les valeurs mesurées refléteraient donc plutôt un effort physique plus important lors du passage en piste, associé à un stress restant dans les limites de l'*eustress*, ou stress positif (décrit ci-dessus).

CONCLUSION

Il est donc possible de mesurer le niveau de stress du couple cavalier/cheval en compétition, en utilisant la technique de dosage du cortisol salivaire. Notre étude a permis de quantifier l'évolution du stress du couple cavalier/cheval, en mettant en lumière un effet plus important chez le cavalier. Aucun lien entre le stress du cavalier et celui de son cheval n'a toutefois pu être mis en évidence. Le stress des deux partenaires apparaît exercer une influence opposée sur leurs performances en compétition, positive dans le cas du cheval mais négative chez le cavalier. Ces observations ont été réalisées lors d'un concours interne, dans un environnement connu et ne nécessitant pas de transport préalable. Elles mériteraient d'être confirmées dans d'autres conditions de compétition. Ces études sur les impacts du facteur "stress" en sports équestres participeront ainsi à l'amélioration des conditions de sa pratique, aussi bien pour le cavalier que pour le cheval.

REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier Mme Duchêne pour son accueil à l'Ecole Provinciale d'Élevage et d'Équitation de Gesves (Belgique), ainsi que leurs élèves qui ont participé avec intérêt et rigueur à cette étude. Nous souhaitons également remercier le Pr F. Farnir et le Dr L. Massart, de la Faculté de Médecine Vétérinaire de Liège (ULg-Belgique), pour leurs conseils avisés en statistiques. Cette étude est financée par une bourse émanant du FNRS-FRIA (Belgique).

RÉFÉRENCES

- Creighton, E., Hughes, T., Coleman, R. 2004. Validation of salivary cortisol as an indicator of stress in horses (*Equus caballus*). Col. University of Helsinki, Finland: 186.
- Hughes, T., Creighton, E., Coleman, R. 2006: Validation of Salivary Cortisol as an indicator of HPA activity in Horses. Proceedings of the 41st International Congress of the ISAE, Merida, Mexico.
- Kelly, S. J., Young, R., Sweeting, H., Fischer, J. E., West, P. 2008. Levels and confounders of morning cortisol collected from adolescents in a naturalistic (school) setting. *Psychoneuroendocrinology* 33, 1257-1268.
- Kirschbaum, C., Hellhammer, D. H. 1989. Salivary cortisol in psychobiological research. An overview. *Neuropsychobiology* 22, 150-169.
- Peeters, M., Sulon, J., Beckers, J. F., Ledoux, D., Vandenheede, M. 2010. Comparison between blood serum and salivary cortisol concentrations in horses using an adrenocorticotrophic hormone challenge. *Equine Veterinary Journal* in press,

Peeters, M., Sulon, J., Serteyn, D., Vandenheede, M. 2010. Assessment of stress level in horses during competition using salivary cortisol: preliminary studies. *Journal of Veterinary Behavior: Clinical Applications and Research* 5, 216-216.

Schmidt, A., Biau, S., Möstl, E., Becker-Birck, M., Morillon, B., Aurich, J., Faure, J. M., Aurich, C. 2010. Changes in cortisol release and heart rate variability in sport horses during long-distance road transport. *Domestic Animal Endocrinology* 38, 179-189.

**RIDER AND HORSE SALIVARY CORTISOL LEVELS DURING COMPETITION
AND IMPACT ON PERFORMANCE**

M. PEETERS, C. CLOSSON, J-F BECKERS, M. VANDENHEEDE

*Accepted for publication in the Journal of Equine Veterinary Science (28/09/2011)***ABSTRACT**

During competition, stress may affect riders and horses. This stress can affect health, welfare and/or performance. Our aim was to quantify stress levels during competition in horses and riders. We also searched relationships between these stress levels and performance. Twenty riders and twenty-three horses were followed up during a show-jumping event (26 courses) held at a riding school. Regular saliva samples taken from horses and riders were assayed to evaluate cortisol (stress hormone) levels. We studied salivary cortisol evolution during the days of competition. We did not find any correlation between instantaneous sampling on horses and their riders. However, we did find a parallel between horse and rider salivary cortisol evolution curves, with a similar peak, reached 20 minutes after the course. The increase was stronger in riders than in horses. Correlations appear between salivary cortisol concentration and performance but stress in both partners seems to have an opposite influence on performance. Riders who showed a higher salivary cortisol increase were awarded more penalties, whereas horses that showed a higher salivary cortisol increase performed better. Stress level measurement in rider/horse pairs would thus lead to improve competition conditions and performance, for horses as well as for riders.

Key-words: Stress, Competition, Cortisol, Riders, Horses**INTRODUCTION**

In every sport, competition induces stress. This also occurs in equestrian sports. Riders and horses can be affected by stress at various levels. Stress is not always harmful. Positive stress, called "*eustress*", is even necessary for environmental adaptation. It is thus important for raising resources, for example, to perform in competition. Stress may become negative when it causes deleterious effects on health, welfare and/or performance. Stress is then called "*distress*". Distress can appear when an individual is confronted with an acute or a chronic stressor, which surpasses his adaptation capacities [1].

Competition is a mix of various stressors (stabling, transport, novelty, rider stress, noisy public and music...). Nevertheless, only few stress studies have been carried out in equestrian sports. One of them examines the effects of show-jumping competition on horse stress levels. Researchers took blood samples at the horse show and at home for plasma cortisol assessment. They found that competition experience had an effect on physiological stress: less experienced horses displayed higher plasmatic cortisol values when at rest at the show than at home [2]. Another study examined the effect

of show-jumping as well as dressage on stress levels by comparing horses' stress response at a horse show and at home. They found that competition induced a significant increase in blood cortisol response in both jumping and dressage horses. They conclude that competition elicits a classic physiological stress response in horses [3].

Other researchers measured plasma cortisol concentrations before and after show-jumping competitions. Horses were separated, according to their competition experience and if they were transported or not just before competition. They found significant increases relative to the basal values in the cortisol concentrations of all groups of horses [4]. In a preliminary study, blood samples were taken before and after an international cross event. Results showed that serum cortisol concentrations were higher after than before the cross event [5].

As is now well known, saliva is a non-invasive alternative technique for cortisol level assessment in horses. This method is more appropriate for physiological stress assessment in horses, even more so in competition. Saliva sampling can be performed anywhere, by every horseman on every domesticated horse, after only short training. Sampling is easy, stress and pain free [6]. Therefore we preferred to collect saliva than blood to measure the activity of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis (HPAA). This salivary corticosteroid is largely used as a stress hormone in humans [7] as well as in horses [5, 8, 9]. Cortisol concentration increase is observed in saliva with a delay of around 20-30 minutes later than observed in blood. This has been observed in horses [6, 10] as well as in humans [11].

Saliva cortisol concentrations have already been used in stress studies in horses. Horses exposed to a new environment [12], to transport [9, 13] and in competition [5]. Horses' salivary cortisol basal values differ largely between individuals [5]. It is recommended to measure basal values for each individual before measuring concentrations during stress events [13].

Salivary cortisol is frequently used as a biomarker in human stress research [14]. As in horses, it reflects HPAA activity. Salivary cortisol level can express stress but it can also be affected by different factors, such as age, gender, oral contraceptive or medical conditions. These variables can affect cortisol binding and HPAA response [14]. To be able to relate salivary cortisol level with stress, we need to control these variables as well as possible.

Basal values for salivary cortisol in humans are well described in the literature [7, 15]. Daily cortisol secretion can be divided into 2 distinct phases: the cortisol awaking response (CAR) and a subsequent period of decline throughout the rest of the day (Edwards et al. 2001 in [15]). Oskis et al. found a cortisol awaking response (CAR) and a subsequent daytime decline period in adolescent females [15]. The mean (\pm SD) cortisol concentration of four saliva samples collected from 3 to 12 hours post-awakening was 4.17 ± 2.05 nmol/l [15].

The essence of the competition model is that to win, the competitor must out-stress the opponent [16]. Stress, measured by cortisol, is important for the preparation of the competition, during and after the stressful situation. Most studies detect an anticipatory rise in cortisol when they collect pre-event samples (15-30 min before competition) [16]. Increasing cortisol level might be important in preparing for mental and physiological demands, and might affect performance. The research indicates that a moderate rise in cortisol helps individuals deal with challenges in competition (Stansbury and Gunnar, 1994 in [16]). 'First, it marshals resources needed for physical activity. Second, it positively affects memory, learning and emotions... Third, cortisol serves a homeostatic function by regulating other stress sensitive systems' [16]. Some studies have found that extreme elevations in cortisol lead to poor performance (Erickson et al. 2003 and Cumming et al. 1983 in [16]). Kivlighan et al. [16] found that endocrine response to stress varied by gender and by experience of competition. Responses were also different depending on when samples are taken: in anticipation, in response to, or after the competitive event. Another study, performed on judoists, shows an anticipatory rise in serum cortisol [17]. They also found significantly higher serum cortisol levels in winners in comparison with losers.

The neuroendocrine response to competition is thus complex and depends rather on subjective factors related to the cognitive evaluation of the situation than on the outcome itself [18]. Exercise leads to an increase in cortisol, in humans as well as in horses [19-24]. However, by taking saliva samples during a board game competition in Japan, researchers found that changes in salivary cortisol after competition are found to be associated with winning and losing even if this game does not need physical exercise [25]. Some studies have found that salivary cortisol is increased in current smokers, compared with non-smokers [26]. Other studies also found that smoking a cigarette activates the HPA axis in habitual smokers [27, 28].

Our aims are to quantify stress levels in competition using salivary cortisol levels, following their kinetics in horses and riders, and comparing these stress levels with the performances achieved.

MATERIAL AND METHODS

In the present study, we have tried to standardize external factors that can influence rider and horse stress. We observed horses and riders at the same place, during the same competition, with the same experimental protocol.

We observed 20 riders and 23 warmblood horses before and during a jumping event, organized by a riding school. The riders' school is the "Ecole provinciale d'élevage et d'équitation de Gesves" (EPEEG) in Belgium. We followed 26 jump courses spread over 2 consecutive days. The 6 riders and 3 horses followed twice were observed on 2 different days.

Riders were young women between 17 and 20 years of age, all students at this school. Participants were thus a relatively homogeneous set of female adolescents; they lived 5 days a week at the school where they followed the same daily routine (horse riding training and classroom lessons). They have ridden 6 days/week for at least 2 years. They all have previous competition experience. They were also all post-menarcheal. Four of them (20%) were regular smokers. All participants provided written informed consent.

Horses were 12 mares and 11 geldings whose ages ranged from 6 to 11 years. Horses had all been stabled at the school for at least one year. They have been trained 6 days/week (jumping and dressage lessons) for at least 2 years. Riders were the horses' owners and pairs were used to working together.

Pairs performed over fences between 90 and 110 cm. During the 2 days of competition, we took saliva samples from riders and horses, following accurate timing: before warm-up (at 9:00 AM), just before entering the competition ring, and 20, 40 and 60 minutes after competition.

Saliva was sampled using Salivettes (Sarstedt, Nümbrecht, Germany). A swab on a metal clamp was maintained in the horse's mouth for 30-40 s, above and below the tongue and placed in Salivettes. Riders could choose between chewing the swab or directly spitting saliva into the Salivette.

Salivary samples were stored at 4°C. After the 2 days, Salivettes were centrifuged for 10 min at 1500 G. Saliva samples were stored at -20°C until assayed. Cortisol concentrations were measured by radioimmunoassay as previously described [6]. All samples were assayed in four replicates. Means of these replicates were used in the analysis. To minimize variation, all samples from one rider or from one horse were tested in the same assay batch.

We took 4 salivary samples from horses during a rest morning at the school, as suggested in [9]. Mean salivary cortisol obtained with these 4 samples was used as the individual horse basal salivary cortisol concentration (SCC). These 4 samples could not be taken from one horse (away from the school due to injury). This horse was included in show jumping measurements but excluded from baseline measurement.

Performances were scored by penalty addition during the jump course. Penalties were given by jump competition judges.

Statistical analysis was performed using correlation analysis. Spearman correlation ($p < 0.05$) was chosen because most variables did not follow a normal distribution. Student's t test (paired data) was used to compare SCC means.

*RESULTS**SCC evolution in horses*

We sampled 23 horses during competition. Three of these horses were sampled during 2 jump courses, on 2 successive days. So, we took saliva samples during 26 jump courses (126 saliva samples). Four samples were missing, due to sampling problems (not enough saliva in the Salivette) or difficulties to find the horse after competition (walking outside). Horses' mean SCCs are resumed in Table 2.

<i>Horse saliva sampling</i>	<i>Baseline</i>	<i>Jumping day</i>					
<i>Timing</i>	at rest	Whole day of competition	Morning	Event start	+20 min	+40 min	+60 min
<i>Number of observations</i>	22 horses	23 horses and 26 jump courses					
<i>Number of saliva samples</i>	88	126	26	26	24	26	24
<i>Mean SCC ± SD (nmol/l)</i>	1.01±0.62	1.56±1.18	1.18±0.38	1.63±1.34	1.92±1.33	1.53±0.62	1.18±0.57

Table 2 : Horse mean SCCs at rest and during show-jumping

Morning SCCs did not differ significantly from baseline SCCs (paired t test; $p = 0.20$).

During the competition, SCC increases from the morning sample to 20 minutes after the start of the jump course, and then decreases until 60 minutes after the start of the jump course. The 20 minutes after start peak is higher than morning SCC (paired t test; $p = 0.009$). SCC was still higher after 40 minutes (paired t test; $p = 0.03$) and it returned to SCC morning levels 60 minutes after the beginning of the course (paired t test; $p = 0.88$). This reversed 'U' evolution is shown in Figure 16. Mean SCC during the whole day of jumping is significantly higher than baseline (paired t test; $p = 0.002$).

SCC measured at the course start is positively correlated to all-day mean SCC ($r_s = 0.69$), to SCC measured 20 min ($r_s = 0.70$), 40 min ($r_s = 0.50$) and 60 min ($r_s = 0.55$) after the start of jumping (Spearman correlation; $p < 0.05$). SCC measured at rest is only correlated to SCC measured 40 minutes after the start of jumping ($r_s = 0.50$).

We can also notice that we did not find any difference between geldings and mares in SCC at rest and during competition (t test, $p < 0.05$).

SCC evolution in riders during competition

Mean rider SCCs are reported in Table 3. A morning sample was taken at least 3 hours after waking time in our study. Morning SCC thus agrees with 'post-menarcheal adolescent female' SCC found by Oskis et al. (2009) (4.17 ± 2.05 nmol/l), calculated on 4 samples collected from 3hours to 12 hours post-awakening. The increase between

morning SCC and +20min SCC is faster and stronger (around 230%) than observed in horses (around 60%) (t test, $p < 0.001$).

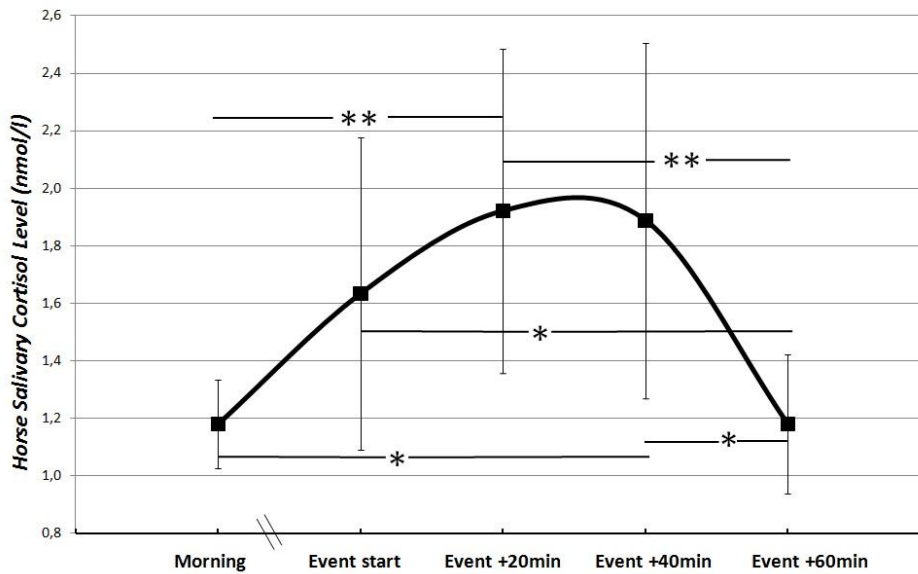


Figure 16 : Mean horse salivary cortisol level evolution in competition
 * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

Mean SCC for the day of competition was correlated to the start of the jump course SCC ($r_s = 0.75$), +20min ($r_s = 0.92$), +40min ($r_s = 0.89$) and +60min ($r_s = 0.79$).

Rider saliva sampling	Jumping day					
Timing	Whole day of competition	Morning	Event start	+20 min	+40 min	+60 min
Number of observations	20 riders and 26 jump courses					
Number of saliva samples	120	26	26	23	21	24
Mean SCC \pm SD (nmol/l)	8.28 \pm 4.99	5.51 \pm 2.34	7.43 \pm 3.61	12.64 \pm 6.39	9.33 \pm 5.50	7.10 \pm 3.06

Table 3 : Riders mean SCCs during show-jumping

Smoker riders ($n = 4$, 5 jump courses) showed a significantly higher SCC than non-smoker riders ($n = 16$, 21 jump courses) at +20 min (unpaired t test, $p = 0.005$), +40 min ($p = 0.002$) and +60 min ($p = 0.038$), as well as for mean SCC during the whole day of jumping ($p = 0.002$). But they do not necessarily have more penalties ($p = 0.099$) during CSO.

Relationship between rider SCC and horse SCC discharges

Figure 17 shows the parallels between mean SCC kinetics of riders and horses. Horses' mean SCCs are strongly correlated to riders' mean SCCs during show jumping (Spearman correlation; $r_s = 0.96$). However, we found no significant correlation between SCCs of each rider and her own horse.

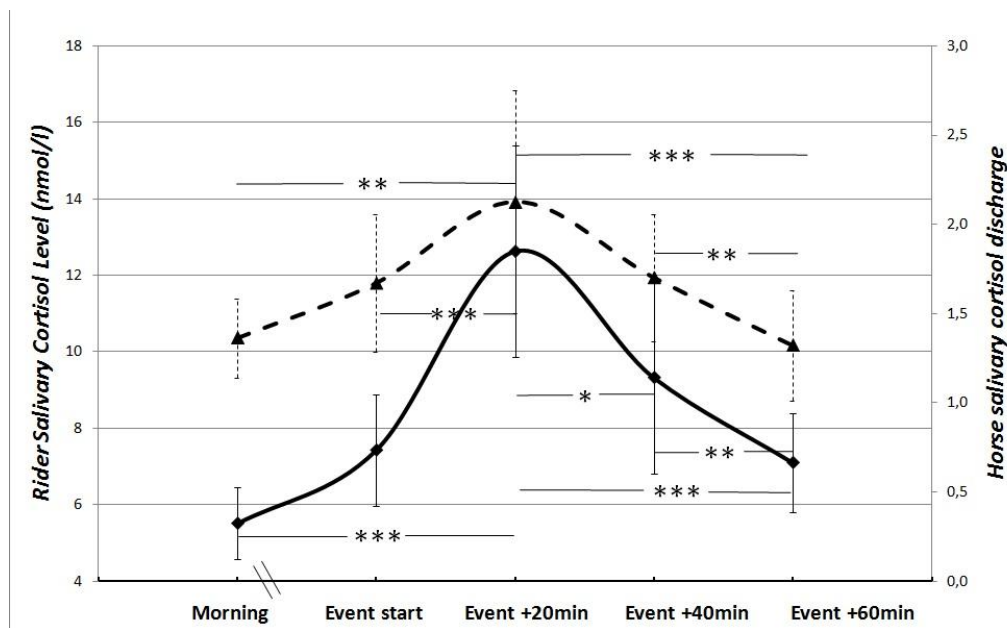


Figure 17 : Mean rider salivary cortisol levels and horse salivary cortisol discharge evolution- Mean rider SCC (nmol/l) (solid line) - Mean discharge of horse SC (dashed line) * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.001$**

Relationship between SCC and performances

The number of penalties is positively correlated to mean rider SCC at peak ($r_s = 0.42$), after 40 min ($r_s = 0.57$) and after 60 min ($r_s = 0.58$). On the contrary, the number of penalties is negatively correlated to mean horse SCC at peak ($r_s = -0.44$).

DISCUSSION

Evolution in horses

Horses' morning samples did not differ from baselines. This should mean that there is no anticipation by the horse. The fact that it is a competition performed at home could explain this absence of the horses' cortisol rise. The baseline found in this study agrees with previous studies [5, 6, 13, 29].

Mean SCCs found during competition are difficult to compare between studies because sampling protocols differ. However, the peak we observed here was not very high compared to increases found in other stress studies [5, 9, 13]. Our SCC peak measured during competition is around 190 % of baseline and 160 % compared to morning samples. In a preliminary study, Peeters et al. (2010b) found that mean SCC after cross events were more than 3 times higher (340 %) than just before starting, and in another previous study they found a rise of 360 % for horses' mean SCC during competition compared to home SCC. Schmidt et al. [13] found an increase of around 600 % after a trailer trip. Horses' HPA axis seemed not to be stimulated as much as in other competitions. Nevertheless, the results of Covalski et al. suggested that conditioned jumpers that have previously been exposed to horse show environments do not appear stressed during acute show-jumping competition [2]. In our study, the

show jumping was organized in a familiar environment and horses were not transported there.

The fact that cortisol level at the start of the course is positively correlated to different other time sampling after the start of jumping means that we could take only some samples from around the area of competition to assess HPA activity.

Evolution in riders during competition

Correlations between SCC sampled at the start of jump course and sampled after (+20,+40 and +60 minutes) allow us to suggest for future studies to take only 1 or 2 saliva samples around the 20 minutes (peak time) following the start of the jump course to assess rider stress. The effect of smoking on cortisol levels agrees with previous findings [26-28].

Relationship between rider SCC and horse SCC discharges

Regrettably, we found no significant correlation between SCCs of each rider and her own horse. We still assume that rider's stress level could influence horse's stress and vice versa. We suggest continuing to observe these cortisol levels simultaneously in horse and rider for future studies. It would be interesting to test this relation in more professional riders, competing at higher levels of show jumping.

Relationship between SCC and performances

Correlations between penalties and rider SCC are moderate but even lead to substantial relationships, according to Martin and Bateson [30]. A high rider stress level seems to be linked to poor performances. This stress can arise from apprehension towards competition but it can also be maintained (+60 min) by bad results obtained. Compared to riders, horse stress seems to lead to better results. However, we have to remember that horses' SCC increase (160 %) was low compared to riders' SCC increase (230 %). Horses' SCC increase observed in this study is lower than that observed in other stress studies, such as transport studies. The stress induced during this competition (without any transport or any change in stabling...) may be under the limit where stress should become distress (see "Introduction", p.121), negatively influencing performance.

CONCLUSION

During a competition period, horses and riders are subjected to various sources of stress which could have a negative influence on health, welfare or safety. Stress can also affect cognitive performance [31]. Assessing when and why these stresses occur is therefore important. Cayado et al. suggested that equestrian competition can provide a good model to study the exercise-induced stress response [3].

It is now possible to easily measure stress levels in horse and rider couple during competition, by assessing HPA axis activity through cortisol measurement. Validation

of this stress-free method, saliva sampling, in show-jumping was also important. We showed that horse and rider free cortisol increases at the same time, the increase here being stronger in riders than in horses. However, no correlation between the stress levels of the rider and her own horse has been found. Stress of both partners seems to have an opposite influence on performance during competition. Riders who showed a higher salivary cortisol increase get more penalties, whereas horses that showed a higher salivary cortisol increase performed better. These observations were made during an internal competition, in a well-known environment, requiring no transport. This may be the reason for such a low increase in horse salivary cortisol. According to the hypothesis that the stress/performance relationship follows the inverted U-shaped curve, called Yerkes-Dodson law (1908, in [31]), we suggest the possibility that during this home competition, horses were on the left-hand side of the curve (more stress leading to enhanced performance) and riders on the right-hand side (more stress leading to reduced performance).

These results need to be confirmed by future studies, especially in an unfamiliar competition environment. We should also study stress during sporting events of longer duration in which the relationship between horse and rider is longer in time, as is the case of endurance. Studying stress levels in equestrian sports will lead to improving the performance and welfare of both riders and horses.

SOURCE OF FUNDING

The work has been supported by grants from the FRIA-FNRS, without any other involvements.

CONFLICT OF INTEREST

No conflicts of interest have been declared.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Mrs Duchêne for her cordial welcome at the riding school "Ecole Provinciale d'Élevage et d'Équitation de Gesves" (EPEEG - Belgium). We thank riders and horses for their good swap chewing. We thank the Reproductive Physiology department of the University of Liège (Belgium). We also thank Andrew Clark, our Native English reviewer.

REFERENCES

- [1] Moberg, G.P., Biological Response to Stress: Implications for Animal Welfare, in *The Biology of Animal Stress*, G.P. Moberg and J.A. Mench, Editors. 2000, CAB International. p.1-21.
- [2] Covalesky, M.E., C.R. Russoniello, and K. Malinowski, Effects of show-jumping performance stress on plasma cortisol and lactate concentrations and heart rate and behavior in horses. *Journal of Equine Veterinary Science*, 1992.12(4): p. 244-51.

[130] RESULTATS ET DISCUSSION / Stress en Compétition

- [3] Cayado, P., B. Munoz-Escassi, C. Dominguez, W. Manley, B. Olabarri, M. Sanchez de la Muela, et al., Hormone response to training and competition in athletic horses. *Equine Vet J Suppl*, 2006.(36): p. 274-8.
- [4] Fazio, E., P. Medica, C. Cravana, and A. Ferlazzo, Effects of competition experience and transportation on the adrenocortical and thyroid responses of horses. *Vet Rec*, 2008.163(24): p. 713-6.
- [5] Peeters, M., J. Sulon, D. Serteyn, and M. Vandenheede, Assessment of stress level in horses during competition using salivary cortisol: preliminary studies. *Journal of Veterinary Behavior: Clinical Applications and Research*, 2010.5(4): p. 216.
- [6] Peeters, M., J. Sulon, J.F. Beckers, D. Ledoux, and M. Vandenheede, Comparison between blood serum and salivary cortisol concentrations in horses using an adrenocorticotrophic hormone challenge. *Equine Veterinary Journal*, 2011.43(4): p. 487-93.
- [7] Kelly, S.J., R. Young, H. Sweeting, J.E. Fischer, and P. West, Levels and confounders of morning cortisol collected from adolescents in a naturalistic (school) setting. *Psychoneuroendocrinology*, 2008.33(9): p. 1257-68.
- [8] Creighton, E., T. Hughes, and R. Coleman, Validation of salivary cortisol as an indicator of stress in horses (*Equus caballus*), in *Proceeding of the 38th International Congress of the ISAE (2004)*2004: Col. University of Helsinki, Finland. p. 186.
- [9] Schmidt, A., E. Möstl, C. Wehnert, J. Aurich, J. Müller, and C. Aurich, Cortisol release and heart rate variability in horses during road transport. *Hormones and Behavior*, 2010.57(2): p. 209-15.
- [10] Hughes, T., E. Creighton, and R. Coleman. Validation of Salivary Cortisol as an indicator of HPA activity in Horses. in *Proceedings of the 41st International Congress of the ISAE*. 2006. Merida, Mexico.
- [11] Kirschbaum, C. and D.H. Hellhammer, Salivary cortisol in psychobiological research. An overview. *Neuropsychobiology*, 1989.22: p. 150-69.
- [12] Peeters, M., F. Péters, J. Sulon, C. Sandersen, P. Poncin, D. Serteyn, et al. Behavioural and physiological assessment of stress level in hospitalised horses: correlation between parameters. in *The 42nd Congress of the International Society for Applied Ethology*. 2008. UCD in Dublin.
- [13] Schmidt, A., S. Biau, E. Möstl, M. Becker-Birck, B. Morillon, J. Aurich, et al., Changes in cortisol release and heart rate variability in sport horses during long-distance road transport. *Domestic Animal Endocrinology*, 2010.38(3): p. 179-89.
- [14] Hellhammer, D.H., S. Wüst, and B.M. Kudielka, Salivary cortisol as a biomarker in stress research. *Psychoneuroendocrinology*, 2009.34(2): p. 163-71.
- [15] Oskis, A., C. Loveday, F. Hucklebridge, L. Thorn, and A. Clow, Diurnal patterns of salivary cortisol across the adolescent period in healthy females. *Psychoneuroendocrinology*, 2009.34(3): p. 307-16.
- [16] Kivlighan, K.T., D.A. Granger, and A. Booth, Gender differences in testosterone and cortisol response to competition. *Psychoneuroendocrinology*, 2005.30(1): p. 58-71.
- [17] Suay, F., A. Salvador, E. González-Bono, C. Sanchís, M. Martínez, S. Martínez-Sanchis, et al., Effects of competition and its outcome on serum testosterone, cortisol and prolactin. *Psychoneuroendocrinology*, 1999.24(5): p. 551-66.
- [18] Salvador, A., Coping with competitive situations in humans. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 2005.29(1): p. 195-205.
- [19] Art, T. and P. Lekeux, Physiological responses to extreme heat and relative humidity - studies on the effects of exercise. *Pratique Veterinaire Equine*, 1996.28(1): p. 3-8.

- [20] Colborn, D.R., D.L. Thompson, Jr., M.S. Rahmanian, and T.L. Roth, Plasma concentrations of cortisol, prolactin, luteinizing hormone, and follicle-stimulating hormone in stallions after physical exercise and injection of secretagogue before and after sulpiride treatment in winter. *Journal of Animal Science*, 1991.69(9): p. 3724-32.
- [21] Colborn, D.R., D.L. Thompson, Jr., T.L. Roth, J.S. Capehart, and K.L. White, Responses of cortisol and prolactin to sexual excitement and stress in stallions and geldings. *Journal of Animal Science*, 1991.69(6): p. 2556-62.
- [22] Gordon, M.E., K.H. McKeever, C.L. Betros, and H.C. Manso Filho, Exercise-induced alterations in plasma concentrations of ghrelin, adiponectin, leptin, glucose, insulin, and cortisol in horses. *The Veterinary Journal*, 2007.173(3): p. 532-40.
- [23] Malinowski, K., E.J. Shock, P. Rochelle, C.F. Kearns, P.D. Guirnalda, and K.H. McKeever, Plasma beta-endorphin, cortisol and immune responses to acute exercise are altered by age and exercise training in horses. *Equine Vet J Suppl*, 2006.(36): p. 267-73.
- [24] Marc, M., N. Parvizi, F. Ellendorff, E. Kallweit, and F. Elsaesser, Plasma cortisol and ACTH concentrations in the warmblood horse in response to a standardized treadmill exercise test as physiological markers for evaluation of training status. *J. Anim Sci.*, 2000.78(7): p. 1936-46.
- [25] Hasegawa, M., M. Toda, and K. Morimoto, Changes in salivary physiological stress markers associated with winning and losing. *Biomed Res*, 2008.29(1): p. 43-6.
- [26] Badrick, E., C. Kirschbaum, and M. Kumari, The Relationship between Smoking Status and Cortisol Secretion. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2007.92(3): p. 819-24.
- [27] Rohleder, N. and C. Kirschbaum, The hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis in habitual smokers. *International Journal of Psychophysiology*, 2006.59(3): p. 236-43.
- [28] Kirschbaum, C., S. Wüst, and C.J. Strasburger, 'Normal' cigarette smoking increases free cortisol in habitual smokers. *Life Sciences*, 1992.50(6): p. 435-42.
- [29] Moons, C.P.H., K. Laughlin, and A.J. Zanella, Effects of short-term maternal separations on weaning stress in foals. *Applied Animal Behaviour Science*, 2005.91(3-4): p. 321-35.
- [30] Martin, P. and P. Bateson, eds. *Measuring Behaviour - An introductory guide*. 1993.
- [31] Mendl, M., *Performing under pressure: stress and cognitive function*. *Applied Animal Behaviour Science*, 1999.65(3): p. 221-44.

INFLUENCE DU TEMPÉRAMENT DU CHEVAL SUR LEUR NIVEAU DE STRESS ET LES PERFORMANCES EN COMPÉTITION ÉQUESTRE

Travaux réalisés dans le cadre du mémoire de fin d'études en Sciences (Master en biologie des organismes et écologie, 2009-2010) par C. Closson sous la direction de Marie Peeters et des professeurs J.F. Beckers et M. Vandenheede

OBJECTIFS

À l'objectif principal qu'était le suivi du stress des chevaux et de leur cavalier pendant la compétition s'ajoute celui de tenter de voir s'il existe une relation entre le tempérament du cheval et le niveau de stress qu'il manifeste en compétition et donc d'apprécier s'il est possible de définir le profil comportemental « type » d'un cheval stressé en compétition. L'hypothèse de cette partie de l'étude est que les chevaux qui obtiennent des scores élevés pour la composante 'anxiété' et la composante 'excitabilité' du questionnaire de tempérament, et/ou qui exhibent des comportements associés à une réactivité émotionnelle forte lors de tests comportementaux sont ceux qui présentent une concentration en cortisol salivaire élevée lors d'une journée de compétition. À cette hypothèse s'ajoute celle que les chevaux qui obtiennent un score élevé pour les composantes 'anxiété' et 'excitabilité' au questionnaire de tempérament sont ceux qui présenteront des comportements associés à une forte propension à la peur ou à une forte réactivité émotionnelle, lors des tests comportementaux.

MÉTHODE

Nous avons suivi 27 couples cavalier-cheval, composés à partir de 27 chevaux et de 23 cavaliers. Les 23 cavaliers étaient tous élèves de 5^{ème} ou 6^{ème} année, à l'École Provinciale d'Élevage et d'Équitation de Gesves (EPEEG). Ils avaient entre 17 et 20 ans, et le groupe était composé de 22 filles et d'un garçon. Les élèves étaient la semaine en internat à l'école et alternaient cours théoriques et leçons d'élevage et d'équitation.

Nous avons suivi les couples lors de deux concours de saut d'obstacles et un concours de dressage. Ces compétitions étaient organisées par l'EPEEG et ont eu lieu dans l'école même, au mois de mars 2010.

Ces compétitions à domicile nous ont permis d'étudier le stress des couples cavalier-cheval dans des conditions un minimum standardisées : les chevaux étaient tous hébergés à l'EPEEG, et y suivaient la même routine (hébergement, soins, exercice,...), les cavaliers avaient également des rythmes de vie proches, du moins en semaine et leurs expériences de la compétition étaient également fort semblables, les concours ayant lieu à domicile, les facteurs de stress liés au transport ainsi qu'au

changement d'environnement physique étaient éliminés, ce qui nous permettait de mesurer le stress provoqué par la compétition en elle-même.

Le fait que les compétitions se déroulent à domicile avait également des avantages pratiques (connaissance des lieux et de l'organisation interne, possibilité d'aménagement des horaires pour aider au respect du timing du protocole). Les cavaliers étant des élèves avides d'apprendre sur le stress de leur monture, ils étaient motivés et ont participé de façon rigoureuse à notre expérimentation.

L'évaluation du tempérament du cheval a été réalisée à l'aide des HPQ, remplis par les cavaliers, un jour hors compétition. Le tempérament des chevaux a également été apprécié via la réalisation de tests comportementaux, réalisés à l'EPEEG : le test de l'*open-field* et le test de l'objet nouveau. Malheureusement ces tests n'ont pu être réalisés que sur 17 chevaux. Ils ont été filmés et analysés ultérieurement par l'intermédiaire du logiciel « The Observer »® © Noldus Information Technology.

L'évaluation du niveau de stress s'est faite selon la méthode décrite précédemment (voir l'article p.121).

RÉSULTATS

Il existe une corrélation positive entre les scores obtenus via le HPQ, liés aux adjectifs comportementaux 'protection' (maternel, protecteur, compréhensif), 'sociabilité' (taquin, populaire, social) et 'niveau d'éducation'. 'Protection', 'sociabilité' et 'niveau d'éducation' se corrént tous les trois négativement à 'dominance' (agressif, excentrique, irritable, obstiné, peu fiable,...). 'Anxiété' (craintif, peureux, manque d'assurance, crispé, méfiant) et 'sociabilité' se corrént positivement à 'curiosité' (curieux, opportuniste).

Corrélation de rangs de Spearman ($p < 0,05$)	Dominance	Anxiété	Protection	Sociabilité
Protection	-0,80			
Sociabilité	-0,50		0,70	
Curiosité		0,39		0,40
Niveau d'éducation	-0,47		0,47	0,41

Table 4 : Corrélations entre les dimensions obtenues via le HPQ

Lors du test de l'objet nouveau, les variables 'tête basse', 'dans le cercle' (proche de l'objet) et 'contact avec l'objet' se corrént positivement. On pourrait les associer à la curiosité, à l'attrait pour l'objet. Les variables 'tête haute', 'queue haute', 'trot/galop', 'hors du cercle' (loin de l'objet) et 'regards objets' se corrént positivement et semblent expliquer un certain niveau d'émotivité, de tendance à fuir (*flight response*), de réactivité émotionnelle.

Corrélations de rangs de Spearman (p < 0,05)	OF-Trot/galop (D)	OF-Vocalisation (F)	OF- Tête Haute (D)
	OF-Défécation (F)		0,57
OF- Tête Haute (D)	0,64		
OF-Tête Basse (D)			-0,69
OF-Queue Haute (D)	0,57		
OF-Queue Basse (D)	-0,54		

Table 5 : Corrélations entre les variables du test de l'open-field
OF=test open-field, (D)=durée, (F)=fréquence, (L)=latence

Corrélations de rangs de Spearman (p < 0,05)	ON-Trot/galop (D)	ON-Vocalisation (F)	ON-Tête Haute (D)	ON-Tête Basse (D)	ON-Queue Haute (D)	ON-Queue Basse (D)	ON-Dans cercle (D)	ON-Contact objet (F)
	ON-Défécation (F)		0,68					
ON-Tête Haute (D)	0,63							
ON-Queue Haute (D)	0,49		0,65					
ON-Queue Basse (D)	-0,77		-0,71		-0,70			
ON-Dans cercle (D)				0,73				
ON-Hors cercle (D)			0,65					
ON-Regard objet (F)			0,56		0,74	-0,56		
ON-Contact objet (F)				0,72			0,91	
ON-Touche objet (L)				-0,72			-0,94	-0,93

Table 6 : Corrélations entre les variables du test de l'objet nouveau
ON=test objet nouveau, (D)=durée, (F)=fréquence, (L)=latence

Certaines variables se corrélaient positivement d'un test à l'autre. C'est le cas de la fréquence de 'défécation' et le 'temps passé la tête haute'. Les variables 'temps passé la tête haute' et le 'temps passé à trotter-galoper' de l'open-field se corrélaient négativement aux variables 'temps passé dans le cercle' et 'temps passé à toucher l'objet'.

Corrélations de rangs de Spearman ($p < 0,05$)	ON-Trot/galop (D)	ON-Défécation (F)	ON-Tête Haute (D)	ON-Tête Basse (D)	ON-Dans cercle (D)	ON-Contact objet (F)	ON-Touche objet (L)
OF-Trot/galop (D)					-0,52	-0,48	0,61
OF-Vocalisation (F)		0,49					
OF-Défécation (F)		0,58					
OF-Tête Haute (D)	0,54		0,53	-0,52	-0,72	-0,71	0,73
OF-Tête Basse (D)	-0,53						
OF-Queue Haute (D)			0,60				
OF-Queue Basse (D)			-0,61				

Table 7 : Corrélations entre les variables du test de l'open-field et celles du test de l'objet nouveau, OF=test open-field, ON=test objet nouveau, (D)=durée, (F)=fréquence, (L)=latence

Pour étudier la présence d'une relation entre tempérament apprécié par les tests comportementaux et par les questionnaires, nous avons réalisé un test de corrélation de rangs de Spearman ($p < 0.05$). Nous avons utilisé les variables relatives au test de l'open-field, au test de l'objet nouveau ainsi que les scores obtenus pour les différents traits de tempérament de l'HPQ.

Il n'y a qu'une seule corrélation qui soit significative entre les variables de l'open-field et du questionnaire. Il s'agit de la corrélation entre le 'temps passé à trotter et/ou galoper' et le score de 'dominance' ($r_s = -0.55$). L'adjectif comportemental 'anxiété' se corrèle positivement au 'temps passé la queue haute' ($r_s = 0.50$) et au 'temps passé hors du cercle' ($r_s = 0.53$) lors du test de l'objet nouveau. La dimension 'dominance' du questionnaire se corrèle positivement au 'temps passé dans le cercle' ($r_s = 0.56$) et au 'temps passé à toucher et/ou manipuler l'objet' ($r_s = 0.49$), mais négativement à la 'latence pour toucher l'objet' ($r_s = -0.53$). La dimension 'curiosité' se corrèle positivement au 'temps passé la queue haute' ($r_s = 0.52$) lors du test de l'objet nouveau.

La décharge moyenne de cortisol en compétition (voir l'étude p.121) se corrèle positivement au 'temps passé dans le cercle' ($r_s = 0,61$) et au 'temps passé à toucher et/ou manipuler l'objet' ($r_s = 0,57$) lors du test de l'objet nouveau. Elle se corrèle aussi positivement au 'temps passé la tête basse' ($r_s = 0,55$) et négativement au 'temps passé la tête haute' ($r_s = -0,72$) lors du test de l'open-field. La décharge de cortisol au pic en compétition se corrèle positivement à la dimension de tempérament 'curiosité' du HPQ ($r_s = 0,57$).

DISCUSSION

Les tests comportementaux

Selon divers auteurs, les comportements locomoteurs tels que 'trotter' et/ou 'galoper' reflètent un certain niveau de '*flightiness*' ou une tendance à la fuite, associée à la '*fearfulness*', propension à manifester des réactions de peur (réactivité émotionnelle) (Visser et al., 2001; Seaman et al., 2002). Les postures telles que 'la tête haute' et 'la queue haute' sont des postures de vigilance, également liées à la peur, la réactivité émotionnelle (Kiley-Worthington, 1999; Welp et al., 2004).

Les fréquences de défécation et de hennissement que nous obtenons se corrèlent. C'est également le cas dans d'autres études. Ces comportements y sont également associés à ceux de vigilance (Seaman et al., 2002; Lansade et al., 2008b) ou à l'anxiété (Momozawa et al., 2003). Les vocalisations sont associées à la '*fearfulness*' mais elles ont également, chez les espèces grégaires, un rôle social important.

Lors du test de l'objet nouveau, nous avons pu mettre en évidence deux tendances, ou stratégies adoptées par les chevaux. Certains chevaux ont exprimé une motivation forte envers l'objet, déterminée par des comportements d'exploration, de curiosité (proximité de l'objet, toucher, flairage, manipulation de l'objet). D'autres chevaux exhibent des comportements liés à une forte réactivité émotionnelle ou à la peur (trot/galop, queue et tête haute). La fréquence et la durée de ces comportements sont corrélées au temps que le cheval passe à regarder l'objet nouveau. Regarder un objet sans s'en approcher est souvent considéré comme une expression de la peur.

Lors de tests de l'objet nouveau, des études mettent également en évidence deux grandes tendances de tempérament du cheval : la '*flightiness*' (tendance à fuir) et la '*sensitiveness*' (sensibilité aux changements de l'environnement) (Visser et al., 2001; Visser et al., 2003a). Ces tendances sont plus marquées chez les jeunes chevaux que chez les chevaux plus expérimentés, dont l'apprentissage pourrait avoir amoindri la réactivité émotionnelle.

Les corrélations inter-tests mesurées (voir Table 7, p.30) confirment que nous mesurons bien la tendance à fuir (réactivité émotionnelle) et que celle-ci s'oppose aux comportements associés à la curiosité. Un cheval qui aurait un profil plutôt réactif lors du test de l'*open-field* aurait également ce profil plutôt réactif lors du test de l'objet nouveau et n'interagirait pas ou peu avec l'objet nouveau.

L'évaluation du tempérament via le questionnaire HPQ

Il existe une corrélation positive entre les dimensions 'protection' et 'sociabilité' et le niveau d'éducation. Cela suggère que les cavaliers considèrent que des chevaux sociables et protecteurs sont des chevaux bien éduqués. Ces deux dimensions et le niveau d'éducation se corrèlent par contre tous les trois négativement à la dimension 'dominance'. Les cavaliers semblent donc considérer les traits de tempérament relatifs

à la 'protection' et 'sociabilité' comme étant positifs et opposés à ceux relatifs à la 'dominance', qui serait plutôt vue comme un défaut. Les définitions de ces traits de tempérament liés à ces dimensions sont développées dans le chapitre « Le tempérament » (p.39).

Relations entre le tempérament obtenu via les questionnaires et les comportements observés lors des tests

Notre hypothèse de départ : les chevaux qui obtiennent un score élevé pour les composantes 'anxiété' et 'excitabilité' au questionnaire de tempérament sont ceux qui présenteront des comportements associés à une forte propension à la peur ou à une forte réactivité émotionnelle, lors des tests comportementaux, est en partie vérifiée. Des corrélations entre les questionnaires de tempérament et les tests comportementaux nous apportent quelques informations intéressantes, notamment la corrélation positive entre la dimension 'anxiété' et le 'temps passé la queue haute' et le 'temps passé hors du cercle' du test de l'objet nouveau. Par contre, la dimension 'dominance' se corrèle positivement au 'temps passé dans le cercle' et au 'temps passé toucher et/ou manipuler l'objet' et négativement à la 'latence de toucher de l'objet'.

Un cheval qualifié d'anxieux exhibera donc plutôt des comportements liés à la vigilance, à la propension à avoir peur ou à une forte réactivité émotionnelle, tandis qu'un cheval qualifié de 'dominant' sera plus franc, moins hésitant et portera plus facilement son attention sur l'objet nouveau.

Selon les études, l'existence d'une relation entre le tempérament défini par les questionnaires et par les tests comportementaux est vérifiée ou pas. Momazawa et al. (2003) ont utilisé un questionnaire et un test de l'objet nouveau pour évaluer le tempérament de chevaux. Ils ont observé que des chevaux considérés comme hautement anxieux par leurs propriétaires étaient ceux qui déféquaient le plus souvent lors du test et qui montraient une augmentation plus élevée du rythme cardiaque. Ceux qui étaient jugés comme 'nécessitant un long temps d'adaptation à la nouveauté' étaient ceux qui ne touchaient pas l'objet lors du test. Les comportements exhibés lors de leur test étaient cohérents avec les résultats obtenus par questionnaires (Momozawa et al., 2003). Le Scolan et al. (1997), ont montré que les chevaux qualifiés de 'grégaire' via un questionnaire étaient ceux qui étaient les plus réactifs lors du test de l'*open-field*, alors que les chevaux qualifiés de 'nerveux' sont ceux qui étaient les plus réactifs lors du test de l'objet nouveau (Le Scolan et al., 1997). Par contre, une étude n'a pas révélé de relation entre les réponses comportementales présentées par les chevaux lors de test comportementaux (objet nouveau, *open-field* et test de réactivité à une personne) et les scores obtenus par les questionnaires (Seaman et al., 2002). Une autre étude n'a pas démontré non plus de relation entre les scores obtenus dans des questionnaires destinés à évaluer l'émotivité et les réponses comportementales observées lors de tests (McCall et al., 2006). Ces divergences peuvent s'expliquer par le fait que les différents auteurs n'utilisent pas les mêmes questionnaires, les font remplir par des personnes différentes (cavaliers,

propriétaires, groom) et/ou n'observent pas les mêmes variables lors des tests comportementaux.

Influence du tempérament sur le niveau de stress du cheval en compétition (apprécié via le cortisol salivaire)

Notre hypothèse de départ était que les chevaux qui obtiennent des scores élevés pour la composante 'anxiété' et la composante 'excitabilité' du questionnaire de tempérament, et/ou qui exhibent des comportements associés à une réactivité émotionnelle forte lors de tests comportementaux sont ceux qui présentent une concentration en cortisol salivaire élevée lors d'une journée de compétition.

Les résultats que nous obtenons sont assez surprenants. En effet, nous observons que la décharge moyenne de cortisol en compétition, c'est-à-dire la variation relative de la concentration en cortisol salivaire par rapport à la valeur de repos, est corrélée positivement au 'temps passé dans le cercle' et au 'temps passé à toucher l'objet' dans le test de l'objet nouveau. C'est étonnant car ces réponses comportementales sont plutôt associées à la curiosité, à la 'franchise' et non à la réactivité, la peur,... De même, cette décharge moyenne se corrèle positivement au 'temps passé la tête basse' du test de l'*open-field*. Nous obtenons également une corrélation positive entre la décharge de cortisol au pic en compétition et la dimension 'curiosité' obtenue via le HPQ. Les animaux considérés donc comme curieux, selon les comportements observés dans les tests et le score obtenu pour la dimension 'curiosité' du HPQ sont ceux qui ont montré de fortes décharges de cortisol en compétition.

La compétition suivie lors de notre étude n'a peut-être pas généré autant de stress que nous l'aurions pensé. Celle-ci se déroulant dans un endroit familier et ne nécessitant pas de transport, l'augmentation du cortisol pourrait être liée à une certaine excitation, plutôt qu'à de l'anxiété, et être donc surtout présente chez des animaux curieux, motivés et actifs. Le stress généré, exprimé par une augmentation de cortisol, resterait dans un ordre de grandeur associé à de l'*eustress* ou stress positif.

L'hypothèse que nous avons émise selon laquelle les chevaux qui obtiennent des scores élevés pour la dimension 'anxiété' et 'excitabilité' du HPQ et/ou qui exhibent des comportements associés à la réactivité émotionnelle lors des tests comportementaux sont ceux qui présentent une concentration en cortisol salivaire élevée lors d'une journée de compétition n'est donc pas vérifiée dans notre étude.

Cette compétition ayant généré un stress qui n'a pas dépassé la limite du stress négatif ou *distress* (voir article p.121), il serait intéressant de comparer le tempérament de chevaux et leur niveau de stress lors de compétitions plus stressantes, impliquant par exemple un transport et un changement d'environnement physique et social.

PARTIE 3

EVALUATION DU NIVEAU DE STRESS EN CLINIQUE



APPRÉCIATION COMPORTEMENTALE ET PHYSIOLOGIQUE DU NIVEAU
DE STRESS CHEZ LES CHEVAUX DOMESTIQUES (*Equus caballus*)
HOSPITALISÉS- IMPACT SUR LA QUALITÉ DE L'INDUCTION ET DU
RÉVEIL, ÉTAPES BALISANT UNE ANESTHÉSIE GÉNÉRALE

Travaux réalisés dans le cadre du mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme de Licenciée en Sciences biologiques (ULg 2006-2007) par Marie Peeters sous la direction du Dr Fabrice Péters et des Professeurs P. Poncin et M. Vandenheede

Nous nous sommes intéressés au bien-être du cheval hospitalisé. Notre premier objectif était de tenter d'évaluer le niveau de stress de chevaux hospitalisés pour une intervention chirurgicale bénigne. À cet effet, nous avons effectué des mesures comportementales et physiologiques, et avons également fait remplir des questionnaires au personnel soignant. Un autre objectif était de voir si cette évaluation du niveau de stress pouvait aider à prédire la qualité de deux manipulations vétérinaires risquées que sont l'induction et le réveil d'une anesthésie générale.

Nous avons suivi 13 chevaux en clinique pendant 3 jours (la veille, le jour de l'intervention et le lendemain). Les observations comportementales se sont faites durant deux fois 24h à l'aide d'une caméra filmant et enregistrant le cheval au box (24h avant intervention et 24h suivant le retour au box après intervention). Nous avons également effectué pour chaque cheval un test d'objet nouveau ainsi qu'une manipulation standardisée, à savoir la pose d'un cathéter jugulaire. Nous avons prélevé des échantillons de sang et de salive, avant, pendant et après l'intervention chirurgicale. Lors de cette étude, nous avons également enregistré la fréquence cardiaque des chevaux au repos et lors des manipulations vétérinaires (induction, réveil et pose du cathéter).

Les résultats obtenus ont été soumis à une analyse de corrélation. Celle-ci nous a permis de sélectionner les mesures les plus pertinentes pour apprécier le niveau de stress du cheval hospitalisé (voir p.145). Le niveau de stress attribué aux chevaux n'a pas démontré de valeur prédictive par rapport à l'appréciation par l'anesthésiste de la qualité de l'induction et du réveil, balisant l'anesthésie générale.

Cette étude nous a permis de placer les premiers jalons menant à l'appréciation du stress des chevaux domestiques en milieu hospitalier. Elle nous a également permis de nous familiariser avec les techniques de dosage du cortisol sanguin et salive.

BEHAVIOURAL AND PHYSIOLOGICAL ASSESSMENT OF STRESS LEVEL IN HOSPITALIZED HORSES: CORRELATION BETWEEN PARAMETERS

M. PEETERS, F. PETERS, J. SULON, C. SANDERSEN, P. PONCIN, D. SERTEYN,
M.VANDENHEEDE

The "42nd Congress of the International Society for Applied Ethology"

Dublin – Ireland - 5th-9th August 2008

Hospitalization of highly reactive big animals, like horses, involves important stress reactions that complicate the medical care and disturb the healing process. The aims of this study were to assess stress levels in hospitalised horses, and to determine relationships between different physiological and behavioural stress measures, by using a Spearman correlation analysis.

Thirteen horses requiring an elective surgery were housed in the Equine Clinic of Liège (Belgium) for 1 week. All measurements were collected during the 24 hours preceding surgery:

- plasmatic (PC) and salivary (SC) cortisol concentrations (sampling every two hours between 9:00 and 17:00);
- spontaneous behaviour (24h continuous video recording of the horses, alone in a box);
- behavioural reactions during a "novel object test (NOT)" and during a "handling test" (venous catheter placement);
- heart rate (HR) before and during the handling test;
- horse's reactivity, assessed by the nursing staff (questionnaire, scales from 1 to 10).

The mean plasmatic cortisol concentration was 50.3 ± 10.3 ng/ml. The mean concentrations obtained for each horse, were significantly correlated with the:

- mean salivary cortisol concentrations (79.9 ± 38.1 ng/100ml, $r_s = 0.88$, $p < 0.001$);
- standing duration in front of the box door (6.38 ± 2.6 h/24h, $r_s = 0.72$, $p < 0.01$);
- moving duration during the venous catheter placement (5.42 ± 7.03 %, $r_s = 0.61$, $p < 0.05$);
- mean HR during resting time (36.8 ± 5.7 beats/min, $r_s = 0.63$, $p < 0.05$);
- maximal HR during catheter placement (77.9 ± 19.1 beats/min, $r_s = 0.76$, $p < 0.01$);
- touching frequency (2.8 ± 2.0 , $r_s = -0.66$, $p < 0.05$) and duration (151 ± 238 sec, $r_s = -0.68$, $p < 0.05$) during NOT;
- excitability (4.9 ± 2.0 , $r_s = 0.65$, $p < 0.05$) and nervousness (5.0 ± 1.4 , $r_s = 0.65$, $p < 0.05$) evaluation (questionnaire).

Interpretation of these variables in terms of stress will have to be confirmed by measurements in controlled stress conditions. This study puts the first bases leading to stress level appreciation of hospitalized horses



Figure 18 : Cheval sur la table d'opération

SUIVI DES COMPORTEMENTS LIÉS AU STRESS LORS D'UNE HOSPITALISATION ET PRÉDICTION DE CEUX-CI VIA UN TEST SIMPLE, RÉALISABLE EN CLINIQUE

L'objectif principal de cette étude est de déterminer, chez le cheval hospitalisé, les comportements liés au stress qui diminuent la qualité des manipulations. L'objectif secondaire est de prédire l'apparition de ces comportements via un test simple, réalisable en clinique.

Nous avons suivi dix chevaux sains hospitalisés deux jours en clinique. L'âge de ces chevaux variait entre 3 et 26 ans ($12,30 \pm 6,44$) et leur poids entre 290 et 605 kg ($498,90 \pm 84,78$). Les observations comportementales se sont déroulées lors de divers tests (test du passage sur la balance (Figure 19), test de l'*open-field*, test de l'objet nouveau), lors de la descente du van, lors de moments de repos au box et lors de deux manipulations vétérinaires standardisées : un parage des pieds par un maréchal ferrant (Figure 20) et des soins dentaires par un vétérinaire.

Des mesures de corrélation de Spearman ont permis de déterminer un profil de cheval stressé, qui posera plus de problèmes lors des manipulations. En effet, certains comportements attribués à des comportements de stress observés lors des tests chez certains chevaux s'avèrent être prédictifs de comportements compliquant les manipulations vétérinaires. Ces chevaux se voient également attribuer des cotes d'éducation plus faibles que les chevaux exhibant moins ces comportements associés au stress (voir communication page suivante).

Cette étude permet de déterminer qu'il est possible d'anticiper certains comportements de stress chez le cheval manipulé en clinique. Nous pourrions anticiper ces comportements à risque lors de tests simples, faciles à effectuer en clinique. Cette anticipation a un grand intérêt pour le bien-être du cheval et la sécurité du personnel soignant.



Figure 19 : Cheval lors du passage sur la balance

CAN WE PREDICT TROUBLES DURING HORSE CLINICAL EXAMINATIONS
BY A SIMPLE TEST?

M. PEETERS, S. GODEFROID, J. SULON, J-F BECKERS, D. SERTEYN, M. VANDENHEEDE

Communication poster lors du "44th Congress of the International Society for Applied Ethology"

Uppsala – Sweden – 31st July – 2nd August 2010

Hospitalization of horses involves important stress reactions that can cause injuries to medical staff and affect animal health and welfare. The aim of this study was to test the potentiality of a behavioural test (the weight-scale test WST) to predict stress reactions in horses during routine manipulations. Ten healthy horses, 7 mares and 3 geldings, from various breeds, aged from 3 to 26 (12.30 ± 6.44) and weighing 498.90 ± 84.78 kg were housed two days in the Equine Clinic of the University of Liege (Belgium) during spring 2009. On day 1, horses were filmed passing on a scale (black rubber flooring) and were observed during a hooves trimming (10'). On day 2, a vet performed a dental check (15'). Horses were scored for locomotion behaviours and body, head and feet movements. During WST, behavioural variables were scored (time, frequency and latency) using The Observer® (Noldus). During trimming and dental check, head and body movements were instantaneous sampled (every 30"). Feet movements were continuously sampled. A 6-items questionnaire about horses' personality and exam quality, with a 5-Likert visual analogue scale, was fulfilled by the



Figure 20 : Maréchal ferrant effectuant un parage

blacksmith and vet after manipulation. Significant Spearman correlations were found between behaviours observed during WST and behaviours observed during clinical examinations. Number of sudden head shaking during the WST are correlated to the number of sudden body moving during trimming (r_s, p) (0.79, 0.004) and to the number of scraping the floor with the foot during dental check (0.67, 0.022). The moving back time (%) during the WST is correlated to the number of scraping the floor during trimming (0.68, 0.016). Number of trials needed to obtain the horse's weight is correlated with a poor handling quality (0.75, 0.01) and a low education score (0.76, 0.007) assessed by the blacksmith. Standardized, common and easy behavioural tests should thus be used to predict horses' handling quality in clinic.

NIVEAU DE STRESS DE JEUNES ÉTALONS EN CLINIQUE

Lors d'expertises, de nombreux jeunes étalons doivent être manipulés plusieurs fois par des vétérinaires. Ces manipulations sont bien standardisées et sont effectuées notamment à la Faculté de Médecine Vétérinaire (FMV) de l'Université de Liège (ULg).

L'objectif principal de cette étude est la comparaison entre l'évaluation par le personnel du tempérament de jeunes étalons en clinique, et celle effectuée par les éleveurs. Un second objectif est d'analyser les comportements associés au stress exprimés par les jeunes étalons lors des manipulations vétérinaires et d'étudier leurs éventuelles relations avec le tempérament de l'étalon ainsi qu'avec la facilité avec laquelle la manipulation s'est déroulée.

L'étude de la relation entre stress, tempérament et qualité des manipulations vétérinaires permettrait aux cliniciens d'anticiper des éventuelles difficultés lors des examens et de prendre ainsi les mesures préventives ad hoc.



Figure 21 : Endoscopie des voies respiratoires supérieures

IMPACT OF THE TEMPERAMENT OF YOUNG STALLIONS ON THEIR
STRESS REACTIONS WHEN SUBJECTED TO A STANDARDISED
VETERINARY EXAMINATION

M. PEETERS, D. VERWILGHEN, D. SERTEYN, J-F BECKERS, M. VANDENHEEDE

Communication poster lors du "16th International Equitation Science Conference"

Uppsala – Sweden – 4th – 7th August 2010

Handling and veterinary examination of horses can induce dangerous stress reactions. It especially occurs in young and non-educated horses, particularly stallions, and makes their manipulation a risk for breeders, grooms and medical staff. Moreover, these stressful situations will affect the animal's health and welfare. As stress reactivity is thought to be partly determined by genetic factors, scientists, vets and breeders are likely to be interested in adding temperament assessments in stallions' selection schemes. The aims of this study were to assess young stallions' temperament and to compare it to their stress reactions (behaviour and cortisol) during a standardised veterinary examination for stud-book admission. It consists in a general examination, a lameness examination including flexion tests, an endoscopy of the upper airway and a standardised radiological exam (performed under sedation). From 2008 to 2009, 92 stallions were evaluated. Owners were asked to fill out a 25-items questionnaire (adapted from Lloyd, Martin et al. 2007) about their horse's temperament. Stallions were observed from the moment they were unloaded from the trailer at the clinic till the end of the veterinary examinations. Their behaviours during these clinical steps were scored by the experimenter: for example, when the animal unloaded from the trailer, the way he went down could be "calm", "quick" or "sudden". The number of trials needed to perform examinations and the head and body movements of horses were also noted during these manipulations. Each vet in charge of the examination fulfilled a short questionnaire about the horse's reactivity and the quality of the performed exams (5-Likert visual analogue scale). Each horse was also blood sampled at their arrival at the clinic, to measure cortisol. During the examinations, we couldn't contain five horses and parts of the examination had to be interrupted or totally abandoned. The medical staff was injured three times and grooms or vets were slightly hurt five times. Accurate analysis of behavioural data, vet's and owner's questionnaires and cortisol RIA assays are still in progress. Different behaviour patterns were observed during the veterinary protocol. Horses showing fear reactions seemed to be a danger to their handlers and examiners. All the examined horses were young and probably not well educated yet, and may therefore not represent the same behavioural patterns as adults. However, it may be important to include personality assessment as a trait in the selection of reproductive stallions - as it's already done in some breeds and some countries.

RELATIONSHIPS BETWEEN YOUNG STALLIONS' TEMPERAMENT AND THEIR BEHAVIORAL REACTIONS DURING STANDARDIZED VETERINARY EXAMINATIONS

M. PEETERS, D. VERWILGHEN, D. SERTEYN and M. VANDENHEEDE

*Accepted for publication (27 oct 2011) in
Journal of Veterinary Behavior: Clinical Applications and Research*

ABSTRACT

Horse handling and veterinary examination can induce hazardous stress reactions. Such reactions occur especially in young and less-trained horses, particularly stallions, and make their handling a risk for breeders, grooms and medical staff. Moreover, these stressful situations will affect the animal's health and welfare. As stress reactivity is thought to be partly determined by genetic factors, scientists, veterinarians and breeders are likely to be interested in adding temperament assessments to stallion selection schemes, as it is already done in some countries. This study assesses young stallions' temperament and to compare it to their stress reactions during a standardized veterinary examination for studbook admission. The assessment consists of a general examination, a lameness examination including flexion tests, an endoscopy of the upper airway and a standardized radiological examination. During the years 2008 and 2009, 93 stallions were evaluated. Stallions were observed from the moment they were unloaded from the trailer at the clinic until the end of veterinary examinations. In addition to the behavioral observations made by the experimenter, each staff member in charge of the examination filled in a short questionnaire about the horse's temperament and the 'easiness of manipulation' for the performed examinations. Breeders were asked to complete a longer questionnaire about their horse's temperament. The assessment of 'aggressiveness', 'sociability' and 'learning level' temperament traits were the most consistent, as shown by the significant Spearman's correlations between judges' assessments. Undesirable behaviors during vet examinations leading to handling difficulties were associated with a low 'easiness of manipulation' score assessed by the clinical staff. These low 'easiness of manipulation' scores were positively correlated to such temperament traits as 'anxiousness' and 'aggressiveness' and negatively correlated to others such as 'sociability' or 'learning level'. Temperament assessment and behavioral observations can, therefore, be used to anticipate behaviors that make a horse difficult to handle during veterinary examinations. Thus, it may be important to include temperament assessment as a feature in the selection of breeding stallions - as already practiced for some breeds in some countries. Such evaluations may promote the welfare of horses and ease of handling as well as safety for the handler.

Keywords: Horses; Stress; Temperament; Behavior; Questionnaire

INTRODUCTION

Stress reactions as a result of handling are associated with an increased risk of handler injury (Jäggin et al., 2005) and may affect the animal's health and welfare. These undesirable stress reactions often occur during young stallion examination.

Young stallion clinical examination is the first step required for studbook admission. Often, this is the first time these young stallions experience a clinic environment. As stress reactivity is thought to be partly determined by genetic factors, scientists, vets and breeders are likely to be interested in adding temperament assessments to stallion selection schemes. Moreover, Lansade et al. (2008b) found that horse temperament can strongly determine the animal's usability. We decided to use the term 'temperament' instead of 'personality' even if it is used by different authors for research on horses. A temperament trait can be defined as "a characteristic of the individual that appears early in life and that is relatively stable across situations and over the course of time" (Goldsmith et al. 1987; Bates 1989 in (Lansade et al., 2010)).

There is a high inter-animal variation in the stress response, depending on genetics, age, early experience, social relationship and human-animal interactions. All these factors can modify stress response and make field stress studies difficult to standardize.

Since the horse is a prey species, predator avoidance behavior is shown (Matteri et al., 2000). Different reactions can be observed, depending on the stressor. Mainly, their natural reaction against acute stress is 'flight' behavior. Before interpreting behavior as stress-related, we must bear in mind that "*the behavioural responses that animals make to any given stressor will reflect a mix of different motivations*" as explained by Rushen (Matteri et al., 2000). For example, a horse showing a lot of activity may be driven by a high level of fearfulness, a high level of exploration or a high level of locomotion, or a mixture of all three, as seen in studies on calves (de Passille et al., 1995). Care is needed when using only locomotion behavior to assess the stress of young stallions in the clinic. The addition of other observations such as physical resistance or head movements, and physiological measurements such as heart rate (Covalesky et al., 1992; Bachmann et al., 2003; Harewood et al., 2005), or cortisol level (Nagy et al., 2009; Peeters et al., 2010; Schmidt et al., 2010b) could be interesting and informative.

Subjective evaluation of stress by humans unfamiliar with the horses is possible if done carefully. McCann et al. (1988) performed a study mixing observed behavior of yearlings and nervousness scores assessed by 4 observers (McCann et al., 1988). Yearlings assessed as '*nervous*' tended to have a higher overall activity index level than the '*normal*' yearlings. Le Scolan et al. (1997) found correlations between reactivity during different tests and horses' score of 'gregariousness', 'nervousness when ridden' or 'general fearfulness' (Le Scolan et al., 1997). Anderson et al. (1999) scored reaction during blood collection by venipuncture (Anderson et al., 1999). They recorded the

time required to obtain the sample and behavioral reactions. Regression analysis indicated a possibility of predicting temperament from the reactivity score (obtained during a test). Horses' undesirable behavior was associated with locomotion patterns (foot movements, head movements and more sudden movements). Momozawa et al. (2007) compared the anxiety score given by a familiar caretaker and behavior observed during a test. They found that it is possible to assess the anxiety of an unfamiliar horse by behavioral observations (Momozawa et al., 2007).

Other studies have found no relation between behavior recorded during tests and subjective questionnaire ratings (Seaman et al., 2002). Morris et al. (2002) tried to determine the factor structure of horse personality by testing a five-factor inventory for human personality on horses (Morris et al., 2002b). The main five human personality dimensions are 'extraversion' (E), 'agreeableness' (A), 'conscientiousness' (C), 'openness to experience' (O) and 'neuroticism' (N) (Gosling et al., 2003). Morris et al. (2002b) compared different factor structures of horse personality from different studies and found that the first and second factors, suggested by principal components analysis, are clearly 'neuroticism' (anxious, nervous, fearful, insecure, not still...) and 'extraversion' (sociable, happy, cooperative, bold, competitive, proud, intelligent, not timid, leader, not lazy...). Other studies agree with Morris et al (2002a) with regard to the fact that horses' 'neuroticism' and 'extraversion' items are well rated by responders in questionnaires (Morris et al., 2002a; Momozawa et al., 2005; McGrogan et al., 2008). 'Openness to experience', 'agreeableness' and 'conscientiousness' seem to be relevant for temperament assessment, but very difficult to assess by an unfamiliar person, especially when the horse's temperament is evaluated in a new environment like a clinic, when a horse is handled and isolated from its stable mates. Lloyd et al. (2007) claims that 'openness' is difficult to assess because terms used are first intended for human questionnaires (daydreams, moral sense and speculation as to the nature of the universe) and applying these terms to horses may be problematic. It is also the case for 'conscientiousness' (keeping the stable clean, well organized, orderly...). 'Agreeableness' problems concern the relationship between scorer and horse (personal judgment).

Lloyd et al. (2007) developed and validated a questionnaire containing 25 items that can be scored reliably by people who handle the horse regularly. This horse personality questionnaire (HPQ) revealed six underlying temperament (personality) components labeled 'dominance', 'anxiousness', 'excitability', 'protection', 'sociability' and 'inquisitiveness' using items derived from Stevenson-Hinde et al. (1980) and Morris et al. (2002a). They found significant correlations between temperament component scores and behavioral observations when horses were grazing. They concluded that *"it may be possible to test the ability of using personality to predict future behavior in horses"* and suggested using temperament assessment in the selection of horses for specific equine disciplines. Lansade et al. (2008b) found that behavioral reactions expressed by horses confronted with particular situations are strongly affected by their temperament (Lansade et al., 2008b).

The aim of our study was to assess young stallions' temperament at the clinic and to compare it to the breeder's assessment. We also wanted to analyze stallion stress reactions during standardized clinical manipulations. In addition, we tried to identify any relationship between temperament traits, stallion stress level and 'easiness of manipulation'. Undesirable behaviors were those that lead to a low 'easiness of manipulation' assessed by the clinical staff. We hypothesized that a stallion's temperament can be used to predict behavior related to stress at the clinic and that the environment can influence horses' behavior during clinical manipulations.

MATERIAL AND METHODS

Ethics

The Animal Care and Use Council of the University of Liège (Belgium) approved the use and treatment of animals in this study.

Experimental animals and management

Ninety-three stallions were observed between September and December 2008 (N = 50) and in 2009 (N = 43), during a one-day veterinary examinations for studbook admission at the Equine Clinic (Veterinary Medicine Faculty – University of Liège – Belgium). The examination consists of a standardized clinical procedure, carried out on a large number of animals of similar breed and sex. All are warmblood stallions between 3 and 6 years of age (3.32 ± 0.62 years/mean \pm SD) and weighed 548 ± 60 kg (mean \pm SD). On their arrival at the clinic, all stallions were unloaded and led to a weigh scale with a non-slip black rubber surface. For half of the horses (50.6 %), this trailer transport was the second or the third they had experienced, 43.8 % of them were used to being transported and only 5.6 % had never experienced trailer transport.

Following this, each stallion went through a series of standardized examinations in the same order and always at the same location. The examinations were performed by experienced veterinarians and technicians (n = 7). The following events are described in the order in which they occurred. Blood samples were taken (venipuncture of the right jugular, in an unfamiliar environment, performed by an unfamiliar person) and subsequently the stallions underwent a lameness examination (for further information concerning lameness examination and flexion test, see Ross, M. and S. Dyson, 2002. *Diagnosis and Management of Lameness in the Horse*), a general examination, an endoscopy of the upper airway (with passage through each nostril), a slight trimming of the fore hooves and a standardized radiological examination (the latter performed under sedation).

Twenty-six percent of the horses were broken in, 61 % had regularly been manipulated (lightly trained and/or daily cared), 11 % had rarely been manipulated and 2 % were not specified. Most of the horses had never been at a clinic and had

never experienced ECG or endoscopic examination. All of these examinations were performed over a period of less than 4 hours. The stallions were then loaded onto the trailer and returned home. The observer asked the breeder to score the stallion's learning state on a scale from 'never manipulated' to 'ridden horse'.

Temperament assessed by the breeder

Each breeder filled in the (26-item) HPQ questionnaire. If the breeder was absent or was not familiar enough with the stallion, the regular handler of the stallion present at the clinic was asked to fill in the questionnaire. This questionnaire was the French/Dutch translation of the English 25-item HPQ validated by Lloyd et al. (2007). All items were scored on a 5-point Likert scale: 'strongly disagree', 'disagree', 'neutral', 'agree' and 'strongly agree'. Scores for each term were from 1 to 5. With this questionnaire, Lloyd et al. (2007) revealed six underlying personality components that were called 'dominance', 'anxiousness', 'excitability', 'protection', 'sociability' and 'inquisitiveness'. The last item concerned subjective learning level (also on a 5-point Likert scale from 'very bad' to 'very good'). Every item of the HPQ was followed by a one-sentence clarifying definition. The HPQ was analyzed as Lloyd et al. (2007) suggest. Personality traits were determined using the eigenvalue criterion and loading charge given by PCA with varimax rotation performed by Lloyd (2007).

Temperament and 'easiness of manipulation' assessment (EMA) at the clinic

The veterinarian and the technician filled in a short clinical questionnaire (SCQ) immediately after their specific manipulations and the experimenter who observed the horse throughout the whole series of manipulations filled in another copy of the same questionnaire. This SCQ consisted of 4 questions about the horse's anxiousness/fearfulness, sociability/friendliness, activity/curiosity and aggressiveness as traits of the horse's temperament. One question subjectively assessed 'easiness of manipulation' (EMA) and another question about the stallion's training level were added to the SCQ. The SCQ can be completed in less than 1 minute. A 5-point Likert scale was used for the 4 temperament traits (from 'strongly disagree' to 'strongly agree'). A linear visual analogue scale (VAS) was used for EMA and learning level assessment at clinic. The VAS consisted of a 10cm horizontal line with 3 vertical lines (one at each end and one in the middle) and surrounded by 2 words: 'not performed' to 'easy to perform' for EMA, and 'bad' to 'best' for learning level assessment. Scores were measured as the distance from the middle ('0' point) in centimeters (from -5 at the left to +5 at the right). This VAS is similar to others used in animal scoring by researchers (Gibbons et al., 2009).

Judge (A) was the lameness examination veterinarian, judge (B) the endoscopic examination technician and judge (C) was the experimenter. All judges were used to working with horses. During the study, lameness examinations were performed by 6 different veterinarians; they were all used to working with horses and familiar with this lameness test. Endoscopies of the upper airway were performed by 2 different veterinarians, but the SCQ were filled in by the technician which remained always the same throughout the 93 endoscopic tests. This technician and the veterinarians had several years experience performing this test. The experimenter was also the same for all 93 stallions.

Stress assessment at the clinic - behavioral observations

Horses were scored for locomotion behavior and body, head and foot movements, but also for specific behaviors (see Table 8 and Table 9). The same female experimenter observed each stallion during unloading, being led onto the weigh scale (reaction to black rubber surface), during blood sampling, during a lameness examination including flexion tests (Ross et al., 2002), general examination, an endoscopy of the upper airway and during a slight trimming of the fore hooves. The scoring scale is provided in Table 8 and Table 9. The time needed to perform manipulations was also noted. Environment scores, based on stimuli from the surrounding during manipulation, were given: '1' for a 'calm' environment (no other horses or humans around), '2' for 'normal' (some other horses or humans, behaving quietly), '3' for 'noisy' (some horse or human disturbances) and '4' for 'very noisy' (horses or humans around, causing lots of noise).

Statistical analysis

Data were processed using Excel 2007, and statistical analyses were carried out using Statistica 9.1 (© Stat soft). The majority of the measurements did not follow a normal distribution and some are ordinal. Therefore we used non-parametric statistics such as Spearman's rank-order coefficients (r_s).

Scores	Behavioral definition
Unloading from the trailer	
1	Stallion unloaded quietly and stood still
2	Stallion unloaded quickly and moved a little
3	Stallion unloaded with force and hard to keep calm
Passage onto the weigh scale (WS)	
1	The handler led the stallion onto the WS and kept him on still without help
2	The handler led the stallion onto the WS but needed 2 attempts to keep him on still without help
3	The handler needed 2 or more attempts to keep him on still, and needed help
4	The handler needed 3 or more attempts to keep him on still, and needed help
5	The handler never kept the stallion still on the WS (only managing to get an approximate weight)
Venipuncture	
1	No foot movement, no head movement except slight neck contractions
2	Some slight foot movements, first attempt is successful
3	Some slight movements, first attempt failed, second one successful
4	More than two attempts, the vet needed helpers
5	Venipuncture impossible to perform
Flexion test	
1	Flexions performed calmly on all 4 legs, with no resistance from the stallion
2	Flexions performed on all 4 legs, with slight resistance
3	Flexions hardly performed on the 4 legs
4	Flexions performed only on the forelimbs
5	Flexions impossible to perform (too dangerous)
General examination	
1	Stallion stayed still, no head, no foot movements
2	Stallion stayed still, with some head movements, no foot movements
3	Stallion stayed quite still, one or two feet moved
4	Stallion stayed quite still, three or all feet moved
5	The stallion could not stay still and did not stop moving
General examination is performed	
1	Very easily
2	Quite easily
3	With some difficulties
4	With great difficulty

Table 8 : Behaviorally-defined rating scale used by the experimenter to determine horse's reaction score for each manipulation performed (1/2)

ECG (scoring 2 times: during placement of electrodes and during ECG recording)	
1	No head movements
2	Few head movements
3	Lots of head movements

1	Stallion stayed still
2	1 foot or 2 feet moved
3	3 or all feet moved
4	Lots of body movements

Endoscopic probe passage (scored 2 times, once for each nostril)	
1	No head movements
2	Few head movements
3	Lots of head movements
4	Lots of vigorous or incessant head movements

Endoscopic probe passage (scored 2 times, once for each nostril)	
1	Still
2	1 or 2 feet moved
3	3 or all feet moved
4	Lots of body movements

During waiting time between 2 manipulations	
1	Stallion stayed still (he is easy to keep calm)
2	Stallion could stay still but with handler's supervision
3	Stallion was a little nervous (few body movements)
4	Stallion was very nervous (lots of body movements)
5	Stallion was hardly kept in place (sudden or dangerous body movements)

When the farrier performed slight trimming	
1	Forelimbs were easy to raise
2	Forelimbs raised with slight resistance
3	Forelimbs raised with much resistance
4	Forelimbs were impossible to raise

Table 9 : Behaviorally-defined rating scale used by the experimenter to determine horse's reaction score for each manipulation performed (2/2)

RESULTS AND DISCUSSION

Temperament assessment by the breeder

Of the 93 stallions surveyed at the clinic, 82 breeders (or familiar handlers) filled in the HPQ. Calculated from the 25 HPQ items scores, analysis gives us six results (see Table 10), for the six-component structure of horse temperament (based on Lloyd et al. (2007)). 'Protection' is the only component that does not follow a normal distribution, a finding likely caused by a misunderstanding of 'protection' terms. Forty-five per cent of 'protection' questions were scored with a '3'. This choice of middle score ('3') could mean that breeders were not sure about the question. In addition to the 6 components (see Table 10), we obtained a learning level assessment (from 1 to 5).

	Mean \pm SE	Minimum	Maximum
Dominance	-0.11 \pm 0.06	-1.27	1.18
Anxiousness	2.03 \pm 0.07	0.88	3.87
Excitability	1.83 \pm 0.07	0.43	3.20
Protection *	2.79 \pm 0.07	1.23	3.96
Sociability	3.07 \pm 0.08	1.52	4.62
Inquisitiveness	2.56 \pm 0.07	0.76	3.80
Learning level *	3.29 \pm 0.10	1.00	5.00

Table 10 : Means, minima and maxima obtained for the HPQ and Learning level assessment, scored by breeders.

*** Non-normal distribution**

Spearman correlation coefficients were calculated between trait scores. Eight significant correlations have been calculated. 'Dominance' is correlated with 'anxiousness' ($r_s = 0.30$, $p < 0.01$) and 'excitability' ($r_s = 0.30$, $p < 0.01$). 'Inquisitiveness' is correlated with 'anxiousness' ($r_s = 0.24$, $p < 0.05$), 'excitability' ($r_s = 0.37$, $p < 0.01$), 'protection' ($r_s = 0.23$, $p < 0.05$) and 'sociability' ($r_s = 0.33$, $p < 0.01$). 'Excitability' is also correlated with 'anxiousness' ($r_s = 0.22$, $p < 0.05$). 'Sociability' is correlated with 'protection' ($r_s = 0.51$, $p < 0.01$). The 'learning level' is negatively correlated with 'dominance' ($r_s = -0.36$, $p < 0.01$). Most of these correlations are low (r_s between 0.2 - 0.4) and express a slight relationship between traits (Martin et al., 1993). Horses assessed as 'dominant' obtained a low 'learning level' score. It could mean that domination-associated behaviors tend to be reduced by education, or that dominant horses are poorer learners.

Influence of stallion age or stallion learning state on temperament

Logically we found a high positive correlation between age and 'stallion learning state' ($r_s = 0.71$, $p < 0.001$), but no significant correlation between stallion's age and other temperament traits.

*Temperament assessment at clinic**Agreement between clinic judges*

It is important to know if judges are conscientious and consistent when assessing a horse's traits. Although we supervised them to fill in the SCQ conscientiously, we tested correlations between the veterinarian, the technician and the experimenter. Judge B was always the same technician and judge C always the same experimenter. Judge A alternated between six different veterinarians. Judge A saw the stallion during the flexion test and judge B saw the stallion during the general examination, ECG and endoscopy. 'Anxious/timid', 'social/friendly' and 'active/curious' trait assessments were not significantly correlated between judges, or they showed only a low correlation (r_s between 0.2 and 0.4), meaning a small relationship (Martin et al., 1993). Significant moderate correlations were found for 'aggressive' and 'learning level' assessment (see Table 11). This would mean that some in-clinic trait assessments are more consistent than others. We found no substantial relationship between scores given by judge A and judge B.

Judge couple	Anxious /timid	Social/ friendly	Active/ curious	Aggressive	Learning level
(A)/(B)	ns	ns	ns	0.24*	ns
(B)/(C)	0.22*	0.35**	ns	0.43**	0.52**
(C)/(A)	ns	0.34**	0.31**	0.53**	0.60**

Table 11 : Spearman's correlation coefficient between pairs of judges for each SCQ trait. No negative correlation has been found.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

Correlations between traits

Spearman's correlation coefficients were calculated between trait scores. The 'active/curious' trait did not show any substantial relationship with any other trait and seems, thus, to be the most independent trait. 'Social/friendly' showed a substantial relationship with 'aggressive' ($r_s = -0.65, -0.75$ and -0.61 for judges A, B and C). 'Learning level' is the trait which shows the most significant correlations with other traits (see Table 12). Horses with the lower 'learning level' scores are those who obtained the highest 'anxious/timid', lower 'social/friendly' and higher 'aggressive' scores. As 'learning level' was also a trait that was more consistently evaluated by judges, it seems to be a relevant question in a short clinical staff questionnaire, at least to assess young stallions at the clinic.

r_s	Anxious/timid	Social/friendly	Aggressive
Judge A	-0.46**	0.62**	-0.63**
Judge B	-0.54**	0.86**	-0.77**
Judge C	-0.22*	0.53**	-0.51**

Table 12 : Spearman's correlations calculated between 'learning level' and other traits of the SCQ for each judge. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

Agreement between clinical judges and breeders

Significant Spearman's correlation coefficients were calculated between HPQs completed by breeders and SCQs filled in by clinical staff, but produced only low correlations (between 0.2 and 0.4). A stallion with a high 'anxiousness' score given by the breeder was awarded a high 'anxious/timid' score by judge A ($r_s = 0.22$, $p < 0.01$) and by judge C ($r_s = 0.37$, $p < 0.05$). A stallion with a high 'excitability' score given by the breeder had a high 'active/curious' score given by judge A ($r_s = 0.24$, $p < 0.01$) and by judge C ($r_s = 0.31$, $p < 0.05$) and a high 'aggressive' score given by judge A ($r_s = 0.30$, $p < 0.05$) and by judge C ($r_s = 0.25$, $p < 0.01$). We can also note that a stallion's learning state is negatively correlated with the 'anxious/timid' trait scored by judge A ($r_s = -0.35$, $p < 0.01$) and judge C ($r_s = -0.23$, $p < 0.05$) and with 'anxiousness' assessed by the breeder ($r_s = -0.23$, $p < 0.05$) and positively correlated with the breeder's 'learning level' assessment ($r_s = 0.29$, $p < 0.01$). Neuroticism items such as 'anxiety', 'activity' and 'aggressiveness' seemed to be the only traits that breeder and clinical staff evaluated consistently, even if it is rather a small relationship. 'Learning level' would perhaps also be evaluated more consistently, but a 'good learning level' is apparently not defined in exactly the same way by breeders and clinical staff.

Behavior observed during clinical manipulations and EMA

The lameness examination

During the lameness examination, the EMA scores were negatively correlated with behavior recorded by the experimenter ($r_s = -0.71$, $p < 0.01$) (for behavior scoring see Table 8 and Table 9 and for correlation see Table 13), and with the environment score ($r_s = -0.38$, $p < 0.01$). This means that the way the examination has been performed, is perceived by the veterinarian in the same way as observed by the experimenter. The more the experimenter perceived a stallion's resistance to flexion, the worse the EMA score. The more disturbing the surroundings, the worse EMA scores for flexion. We can also point out that, for the flexion test, there was no correlation between EMA or behavior observed and stallion learning state.

The general examination, ECG recording and upper airway endoscopy

We found that the more the stallion moved during the general examination (see behavior list in Table 8 and Table 9), the more difficulties the vet had in performing the examination ($r_s = -0.63$, $p < 0.01$). This is a moderate correlation (Martin et al., 1993) which would have been expected to be higher. Foot movements were correlated with head movements during ECG recording ($r_s = 0.49$, $p < 0.01$). The same sort of correlations appeared during endoscopy: head movements and body movements are correlated together (1st and 2nd nostril passage, $r_s = 0.50$, $p < 0.01$) and between first and second nostril passage (head movements $r_s = 0.43$, $p < 0.01$, and body movements $r_s = 0.48$, $p < 0.01$). EMA of upper airway endoscopy, assessed immediately after by the technician, is negatively correlated with head movements (1st nostril $r_s = -0.47$, $p < 0.01$ and 2nd nostril $r_s = 0.40$, $p < 0.01$) and body movements (1st nostril $r_s = -0.53$, $p < 0.01$ and 2nd nostril $r_s = 0.46$, $p < 0.01$). We also obtained a low correlation between environmental state and EMA of the endoscopy ($r_s = -0.34$, $p < 0.01$). The noisier the environment, the lower the EMA, and the more movements were observed (head movements during 1st nostril passage: $r_s = 0.24$, $p < 0.05$ and body movements during 2nd nostril passage: $r_s = 0.25$, $p < 0.05$).

*Relations between clinical manipulations**Significant Spearman's correlations between behavior observed*

We found a low but significant correlation between the way the stallion was unloaded from the trailer and the way he went onto the weigh scale ($r_s = 0.31$, $p < 0.01$). Stallions that were unloaded more quickly were those that were more difficult to handle when being led onto the weigh scale. These stallions also showed more resistance to the flexions test ($r_s = 0.27$, $p < 0.05$). We found a significant positive correlation between undesirable behavior shown during blood sampling (jugular venipuncture) and other undesirable behavior during the general examination (movements: $r_s = 0.39$, $p < 0.01$). Resistance shown during the flexion test was correlated with movements during the general examination ($r_s = 0.32$, $p < 0.01$) and to movements during a waiting period ($r_s = 0.26$, $p < 0.05$). Stallions that moved a lot during general examination were also those that were more nervous during waiting time ($r_s = 0.57$, $p < 0.01$).

Significant Spearman's correlations between EMA given by the clinical staff

We found a low, positive significant Spearman's correlation coefficient between EMA assessed by the vet who performed the flexion test (for lameness examination) and the technician who performed the endoscopy ($r_s = 0.26$, $p < 0.05$). These 2 people did not see test performed by the other and did not have any visual or phone contact throughout the day. We also found a low significant correlation between EMA assessed for the endoscopy (by the technician) and EMA assessed for the general

examination (by the experimenter) ($r_s = -0.31$, $p < 0.01$). The general examination always took place before the endoscopy and the EMA was given before the endoscopy began. The endoscopy technician could not see EMA being given by the experimenter before he gave his own endoscopy EMA. This correlation is negative because the EMA scales for the general examination and endoscopy were reversed.

Some of the stallions' reactions seemed to be stable across situations. Judge A observed a different situation from Judge B. Judge C observed both situations, before and after them. Previous studies found that some temperament traits are stable across situations (Le Scolan et al., 1997; Lansade et al., 2008b, 2008c). In their studies on horses, Lansade et al. (2008a) found that reactivity to humans was also stable across situations.

We tested which manipulation has the better EMA score. Mean EMA given after endoscopic examination was significantly higher than mean EMA given after the flexion test (paired t test, $n = 91$, $p = 0.0005$). Does this mean that endoscopy is less stressful than the flexion test or that judge B was more indulgent than judges A? To measure which veterinary examination is the most aversive, stressful and fear-elicited to horse, EMA should have been given by the same judge. Standardizing behavioral observations between such different manipulations is hard to apply in the field. In future studies, we should take other stress measurements to compare stress-eliciting during different manipulations. It would be interesting to mix physiological measurements, such as cortisol or heart rate, with behavioral observations as already used in other stress studies (Minero et al., 2006; Peeters et al., 2008; Guay et al., 2009; Peeters et al., 2010; Schmidt et al., 2010a; Schmidt et al., 2010b).

We also found that a stallion's behavior was influenced by the environment. We found more undesirable reactions, related to stress, in noisier environments. Further studies are needed to determine which environment (outdoor or indoor, visual contact with other horses or not...) will be less stressful for veterinary handling of young horses.

Relations between EMA, observed behaviors and temperament

In Table 13, we summarize all significant Spearman's correlation coefficients between EMA and behavior observed or temperament traits assessed by breeder or clinical staff. This study set out to demonstrate a link between temperament traits rated in the clinic, measured undesirable behaviors and easiness of manipulation in the clinic. In Table 13 we can see that the main undesirable behaviors observed in the clinic were negatively correlated to EMA assessed by clinical judges. Most personality traits scored in the clinic were also correlated to EMA. Some were negatively correlated to EMA (active/curious, anxious/timid and aggressive) and some were positively correlated to EMA (social/friendly and learning level).

Spearman's correlation coefficient r_s	Flexion test EMA by (A)	Endoscopy EMA by (B)	General examination. EMA by (C)
Undesirable behavior during			
Passage to weigh scale	-0.22 *		
Blood sampling			-0.24 *
Flexion test	-0.71**	-0.23 *	-0.33 **
General examination		-0.25 *	-0.63**
ECG recording		-0.21 *	
Endoscopy		-0.47**	-0.29 *
Endoscopy duration		-0.35**	
Waiting time		-0.28 **	0.57 **
Short Clinical Questionnaire			
(C) Active/Curious			-0.40 **
(A) Anxious/Timid	-0.34 **		
(B) Anxious/Timid		-0.46 **	-0.24 *
(C) Anxious/Timid	-0.30 **	-0.24 *	
(A) Social/Friendly	0.43 **		0.24 *
(B) Social/Friendly		0.77 **	0.45 **
(C) Social/Friendly	0.22 *	0.24 *	0.37 **
(A) Aggressive	-0.43 **		-0.29 *
(B) Aggressive		-0.59 **	-0.37 **
(C) Aggressive	-0.25 *	-0.33 **	-0.51 **
(A) Learning level	0.58 **		
(B) Learning level	0.24 *	0.86 **	0.42 **
(C) Learning level	0.40 **	0.43 **	0.27 *
Horse Personality Questionnaire (filled in by breeder)			
Excitability			0.28 *
Inquisitiveness		-0.23 *	

Table 13 : Significant Spearman's correlation coefficients found between behavior observed, temperament score and easiness of manipulation assessment (EMA). (A) is the vet who performed the lameness examination (B) is the endoscopy technician and (C) is the experimenter. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

Spearman's rank-order correlations were calculated on 16 behaviors with each of the temperament trait assessments (with SCQ and HPQ). We found that all scored behaviors were correlated at least to 1 temperament trait ($p < 0.05$). Behaviors correlated to 8 or more temperament trait scores (assessed by breeder and judges) are represented in Table 14.

	Behaviors during flexion test	Behaviors during general examination	Head movements during the 2 nd nostril passage	Behaviors during waiting time between 2 manip	Behaviors during general examination
SCQ traits (vet and technician)					
(A) Anxious/Timid	0,36**		0,37**		
(B) Anxious/Timid		0,24*	0,23*		
(C) Anxious/Timid	0,37**				
(A) Social/Friendly	-0,54**	-0,24*			
(B) Social/Friendly	-0,25*	-0,44**	-0,28**	-0,40**	-0,36**
(C) Social/Friendly	-0,35**	-0,37**		-0,34**	
(A) Active/Curious			0,25*	0,26*	0,23*
(B) Active/Curious				0,32**	
(C) Active/Curious	0,35**	0,40**	0,32**	0,44**	0,45**
(A) Aggressive	0,57**	0,29**			
(B) Aggressive		0,37**	0,24*	0,28**	
(C) Aggressive	0,45**	0,51**	0,22*	0,40**	0,26*
(A) Learning level	-0,58**				
(B) Learning level	-0,28**	-0,42**	-0,31**	-0,41**	-0,33**
(C) Learning level	-0,59**	-0,27*		-0,28**	-0,28**
HPQ traits (Breeders)					
Dominance	0,43**				
Anxiousness	0,27*				
Excitability	0,25*	0,28**			0,24*
Sociability			0,29**		0,26*

Table 14 : Significant Spearman’s correlation coefficients found between behavior observed and temperament traits. *p<0.05 and **p<0.01

Table 14 shows that most undesirable behaviors were positively correlated to some personality traits (active/curious, anxious/timid and aggressive) and negatively correlated to social/friendly and learning level. This study also demonstrates that there is a link between rated personality and observed behaviors, as found previously in other studies, exploring behaviors and horse’s temperament/personality in other situations (Visser et al., 2003; Lloyd et al., 2007). For example, ‘anxiousness’ and ‘aggressiveness’ were correlated with undesirable behaviors observed during flexion test, general examination and endoscopic examination. We can also observe that ‘learning level’ assessed in the clinic is negatively correlated with undesirable behaviors recorded by the observer (mostly head, feet and body movements during manipulations). This relationship suggests that vets and technicians are influenced by these behaviors for horses’ ‘learning level’ assessment. These conclusions agree with

previous studies (Gosling et al., 2002; Lloyd et al., 2007) and provide evidence that a shorter questionnaire about horse temperament can also be used in clinical studies.

CONCLUSION

Assessing horse temperament seems to be useful in the clinic. Our short questionnaire used in this study needs to be improved. 'Aggressiveness' and 'learning level' assessment by veterinarians and technicians seem to be more consistent than other traits. 'Learning level' should be taken into consideration in future studies, as it seems to summarize other temperament traits. As personality traits assessed by the breeder did not show any interesting correlation with behaviors observed or easiness of manipulation assessed by clinical staff, we have doubts about the interest of asking breeders to fill in horse personality questionnaires for clinical stress assessment. Furthermore, as Gosling (2001) noticed, it has yet to be determined whether observer acquaintance influences the reliability of personality ratings of animals (Gosling, 2001).

Easiness of manipulation assessed by clinical staff was correlated to the number of undesirable reactions occurring during the manipulation and also during, before and after other examinations. Undesirable behavior seemed to include head, foot or body movements. The EMA is also linked to 'learning level' assessed in the clinic. Clinic staff should communicate together, for example with an EMA, or 'learning level' assessment, to anticipate dangerous undesirable reactions from the horse during the next manipulation. This process should warn veterinarians to take more care when conducting the subsequent examination.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the medical staff, horse caretaker, farrier and team of secretaries at the Equine Clinic of the faculty of Veterinary Medicine of Liège (ULg-Belgium) for their precious help. We thank the CeMeSpo (Sportive Medicine Center) team of the faculty of Veterinary Medicine of Liège, for their participation, in particular J-C Bustin, the endoscopic technician.

SOURCE OF FUNDING

The work was supported by grants from the FRIA-FNRS (Belgium).

CONFLICT OF INTEREST

No conflicts of interest have been declared.

REFERENCES

- Anderson, M. K., T. H. Friend, J. W. Evans and D. M. Bushong, 1999. Behavioral assessment of horses in therapeutic riding programs. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 63(1): 11-24.
- Bachmann, I., P. Bernasconi, R. Herrmann, M. A. Weishaupt and M. Stauffacher, 2003. Behavioural and physiological responses to an acute stressor in crib-biting and control horses. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 82(4): 297-311.
- Covalesky, M. E., C. R. Russoniello and K. Malinowski, 1992. Effects of show-jumping performance stress on plasma cortisol and lactate concentrations and heart rate and behavior in horses. *J. Equine Vet. Sci.* 12(4): 244-251.
- de Passille, A. M., J. Rushen and F. Martin, 1995. Interpreting the behaviour of calves in an open-field test: a factor analysis. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 45: 201-213.
- Gibbons, J., A. Lawrence and M. Haskell, 2009. Responsiveness of dairy cows to human approach and novel stimuli. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 116(2-4): 163-173.
- Gosling, S. D., 2001. From Mice to Men: What Can We Learn About Personality From Animal Research? *Psychol. Bull.* 127(1): 45-86.
- Gosling, S. D., P. J. Rentfrow and W. B. Swann, 2003. A very brief measure of the Big-Five personality domains. *Journal of Research in Personality* 37(6): 504-528.
- Gosling, S. D. and S. Vazire, 2002. Are we barking up the right tree? Evaluating a comparative approach to personality. *Journal of Research in Personality* 36(6): 607-614.
- Guay, K., H. Brady, M. Sutherland, K. Pond, L. Janecka and V. Allen, 2009. Effects of a 24-Hour Transport on Stress Response in Horses. *J. Equine Vet. Sci.* 29(5): 424-425.
- Harewood, E. J. and C. M. McGowan, 2005. Behavioral and physiological responses to stabling in naive horses. *J. Equine Vet. Sci.* 25(4): 164-170.
- Jäggin, S., A. Fürst, M. Hässig and J. Auer, 2005. Kick injuries of veterinarians during examination and treatment of horses: a retrospective study in Switzerland. *Schweiz. Arch. Tierheilkd.* 147(7): 289-295.
- Lansade, L. and M.-F. Bouissou, 2008a. Reactivity to humans: A temperament trait of horses which is stable across time and situations. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 114(3-4): 492-508.
- Lansade, L., M.-F. Bouissou and H. W. Erhard, 2008b. Fearfulness in horses: A temperament trait stable across time and situations. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 115(3-4): 182-200.
- Lansade, L., M.-F. Bouissou and H. W. Erhard, 2008c. Reactivity to isolation and association with conspecifics: A temperament trait stable across time and situations. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 109(2-4): 355-373.
- Lansade, L. and F. Simon, 2010. Horses' learning performances are under the influence of several temperamental dimensions. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 125(1-2): 30-37.
- Le Scolan, N., M. Hausberger and A. Wolff, 1997. Stability over situations in temperamental traits of horses as revealed by experimental and scoring approaches. *Behav. Processes* 41(3): 257-266.
- Lloyd, A. S., J. E. Martin, H. L. I. Bornett-Gauci and R. G. Wilkinson, 2007. Evaluation of a novel method of horse personality assessment: Rater-agreement and links to behaviour. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 105(1-3): 205-222.
- Martin, P. and P. Bateson, Eds. (1993). *Measuring Behaviour - An introductory guide.*
- Matteri, R. L., J. A. Carroll and C. J. Dyer, 2000. Neuroendocrine Responses to Stress. *The Biology of Animal Stress.* G. P. Moberg and J. A. Mench, CAB International: pp. 43-76.

- McCann, J. S., J. C. Heird, R. W. Bell and L. O. Lutherer, 1988. Normal and more highly reactive horses. I. Heart rate, respiration rate and behavioral observations. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 19(3-4): 201-214.
- McGrogan, C., M. D. Hutchison and J. E. King, 2008. Dimensions of horse personality based on owner and trainer supplied personality traits. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 113(1-3): 206-214.
- Minero, M., D. Zucca and E. Canali, 2006. A note on reaction to novel stimulus and restraint by therapeutic riding horses. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 97(2-4): 335-342.
- Momozawa, Y., R. Kusunose, T. Kikusui, Y. Takeuchi and Y. Mori, 2005. Assessment of equine temperament questionnaire by comparing factor structure between two separate surveys. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 92(1-2): 77-84.
- Momozawa, Y., M. Terada, F. Sato, T. Kikusui, Y. Takeuchi, R. Kusunose and Y. Mori, 2007. Assessing Equine Anxiety-Related Parameters Using an Isolation Test in Combination with a Questionnaire Survey. *The Journal of Veterinary Medical Science* 69(9): 945-950.
- Morris, P. H., A. Gale and K. Duffy, 2002a. Can judges agree on the personality of horses? *Personality and Individual Differences* 33(1): 67-81.
- Morris, P. H., A. Gale and S. Howe, 2002b. The factor structure of horse personality. *Anthrozoos* 15(4): 300-322.
- Nagy, K., G. Bodó, G. Bárdos, A. Harnos and P. Kabai, 2009. The effect of a feeding stress-test on the behaviour and heart rate variability of control and crib-biting horses (with or without inhibition). *Appl. Anim. Behav. Sci.* 121(2): 140-147.
- Peeters, M., F. Péters, J. Sulon, C. Sandersen, P. Poncin, D. Serteyn and M. Vandenheede (2008). Behavioural and physiological assessment of stress level in hospitalised horses: correlation between parameters. *The 42nd Congress of the International Society for Applied Ethology, UCD in Dublin.*
- Peeters, M., J. Sulon, D. Serteyn and M. Vandenheede, 2010. Assessment of stress level in horses during competition using salivary cortisol: preliminary studies. *Journal of Veterinary Behavior: Clinical Applications and Research* 5(4): 216.
- Ross, M. and S. Dyson, 2002. *Diagnosis and Management of Lameness in the Horse.*
- Schmidt, A., S. Biau, E. Möstl, M. Becker-Birck, B. Morillon, J. Aurich, J. M. Faure and C. Aurich, 2010a. Changes in cortisol release and heart rate variability in sport horses during long-distance road transport. *Domest. Anim. Endocrinol.* 38(3): 179-189.
- Schmidt, A., E. Möstl, C. Wehnert, J. Aurich, J. Müller and C. Aurich, 2010b. Cortisol release and heart rate variability in horses during road transport. *Horm. Behav.* 57(2): 209-215.
- Seaman, S. C., H. P. B. Davidson and N. K. Waran, 2002. How reliable is temperament assessment in the domestic horse (*Equus caballus*)? *Appl. Anim. Behav. Sci.* 78(2-4): 175-191.
- Visser, E. K., C. G. V. Reenen, M. Rundgren, M. Zetterqvist, K. Morgan and H. J. Blokhuis, 2003. Responses of horses in behavioural tests correlate with temperament assessed by riders. *Equine Vet. J.* 35(2): 176-183.

DISCUSSION GÉNÉRALE, CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES



Nous avons, via un suivi des concentrations en cortisol sanguin et salivaire lors d'un test de stimulation à l'ACTH, décrit la relation qui nous permet maintenant d'utiliser les concentrations en cortisol salivaire pour estimer les concentrations en cortisol sanguin chez le cheval, comme cela a été précédemment validé chez l'homme et chez d'autres espèces animales. Un des avantages non négligeables de l'utilisation de la salive pour mesurer la concentration en cortisol est que son augmentation provoquée par un stress aigu y est plus importante que dans le sang. Son retour à la concentration de base y est également plus rapide que dans le sang. Le dosage du cortisol dans la salive permet donc une meilleure détermination du moment où survient le stress chez l'animal.

D'un point de vue méthodologique, les prélèvements de salive sont plus simples à réaliser que les prélèvements de sang. Contrairement à ces derniers, ils ne nécessitent pas la présence d'un vétérinaire et sont facilement réalisables avec un minimum d'entraînement. Le stockage est également plus simple, le cortisol salivaire étant stable à température ambiante. De plus, les prélèvements de salive n'induisent pas de stress chez un cheval habitué à l'homme. Cette technique d'évaluation du niveau de stress est applicable sur le terrain, comme nous avons pu le vérifier lors de nos diverses études, en compétition et en clinique. Cette technique est également utilisée pour apprécier l'anxiété chez l'homme, et donc chez toute personne entrant en interaction avec un cheval. Cela permet d'ouvrir de nombreuses perspectives en termes d'études sur la transmission du stress dans le cadre de la relation entre l'homme et le cheval.

Les prélèvements de salive n'induisant ni douleur, ni risque de complications, un échantillonnage, même fréquent, n'altère pas le bien-être des chevaux ni celui des cavaliers.

Nos études en compétition nous ont permis de constater qu'il est possible d'évaluer physiologiquement le niveau de stress durant un Concours Complet d'Equitation (CCE) ou lors d'une compétition de jumping. Une évaluation comportementale du niveau de stress pendant la compétition peut sembler délicate. Cependant, une étude s'est dernièrement intéressée aux comportements non désirés en dressage, comportements associés à un degré d'irritation du cheval (Williams et al., 2009). L'identification de ces comportements résultant de conflits entre le cavalier et le cheval permettrait aux cavaliers de reconnaître et d'évaluer ces comportements avant qu'ils n'évoluent vers des comportements plus problématiques. Ceci permettrait alors d'améliorer la communication entre le cavalier et le cheval pour améliorer le bien-être de ce dernier et vraisemblablement aussi les performances du couple.

Une étude récente s'est aussi intéressée à la décharge de cortisol salivaire lors de compétitions et d'évènements équestres divers (démonstrations de dressage, sauts en liberté et ventes aux enchères) (Becker-Birck et al., 2010). Leur protocole est proche

du nôtre : prélèvements de salive effectués avant l'échauffement, avant l'épreuve, et 5, 15, 30, 60 90 et 120 minutes après l'épreuve. Les auteurs obtiennent des résultats semblables aux nôtres, à savoir que l'épreuve provoque une augmentation du cortisol salivaire avec un pic juste après l'épreuve. Les pics obtenus en compétition sont plus élevés que ceux obtenus lors des autres évènements équestres. Toutefois, les augmentations de cortisol salivaire mesurées en compétition restent largement inférieures à celles obtenues dans d'autres études, comme lors d'un stress lié au transport (Schmidt et al., 2010a). Cela est également le cas dans nos études réalisées lors des compétitions. Ces résultats confirment donc l'hypothèse que les compétitions engendrent une augmentation limitée et transitoire de la sécrétion de cortisol, qui permettrait au cheval de faire face aux exigences des sports équestres sans nécessairement lui faire vivre un état de "*distress*" (stress pathologique). Il reste à envisager les cas pour lesquels une compétition implique un transport et/ou d'autres situations potentiellement plus stressantes.

Chez l'homme, le stress du sportif est assez bien étudié; de nombreuses études décrivent un lien entre l'état émotionnel du sportif et les performances réalisées. Il n'y a cependant que peu d'études consacrées au milieu équestre. Ces dernières années toutefois, des scientifiques se sont intéressés à la personnalité des cavaliers, à leur anxiété juste avant l'épreuve, ainsi qu'à la perception qu'ils ont du tempérament de leur cheval. Ces mesures ont également été mises en relation avec les performances en compétition. Les chercheurs observent des différences selon le niveau d'expérience du cavalier : contrairement aux cavaliers novices, les cavaliers les plus expérimentés semblent capables d'utiliser leur colère pour améliorer leur compétitivité (Wolframm et al., 2010b). Ils concluent également que l'anxiété et la perception du tempérament du cheval ont un impact sur les performances : les cavaliers évaluant leur cheval comme 'agréable', sont en moyenne moins anxieux et obtiennent de meilleurs résultats lors d'une épreuve de dressage (Wolframm et al., 2010a). Dans une autre étude, les auteurs se sont également intéressés à l'amélioration de la communication entre le cheval et le cavalier en développant une technique d'entraînement visant à augmenter l'obéissance des chevaux et la confiance en soi des cavaliers (Wolframm et al., 2011a). Une autre étude s'est également intéressée à la compatibilité des couples cavalier/cheval en utilisant la fréquence cardiaque et l'observation des comportements pour mesurer le tempérament du cheval et évaluer son caractère conciliant, coopératif avec le cavalier. Les chevaux évalués comme étant les plus conciliants ont une fréquence cardiaque plus faible lors des tests que les moins conciliants. L'évaluation subjective d'un « bon » ou « mauvais » couple cavalier/cheval par un observateur est validée par des mesures plus objectives comme la fréquence cardiaque et les comportements : les situations nouvelles, suscitant des réactions (comme par exemple le test de l'objet nouveau), sont perçues comme moins stressantes pour les chevaux s'ils ont affaire au cavalier avec lequel ils forment un « bon » couple (Munsters et al., 2011). Une étude a démontré l'effet positif d'une préparation mentale sur les performances réalisées en dressage par des cavaliers avancés et intermédiaires (Wolframm et al., 2011b).

Lors de nos études, nous avons constaté que certaines manipulations peuvent provoquer un stress, et que celui-ci peut être mesuré par des données physiologiques et comportementales. On trouve de plus en plus d'études utilisant cette même approche pluridisciplinaire, comme c'est par exemple le cas de l'étude qui a suivi les réactions comportementales (comportements aversifs) et physiologiques (l'augmentation du cortisol salivaire, de la fréquence cardiaque et de sa variabilité) de jeunes chevaux lors d'un marquage au fer rouge et lors de l'implant de la puce électronique (Erber et al., 2011). Leurs résultats montrent une augmentation du taux de cortisol salivaire lors du marquage ainsi que lors de l'implant, et une augmentation passagère de la fréquence cardiaque et de sa variabilité. Ils observent le même type de comportements aversifs lors des deux manipulations : mouvements de tête, de corps et de pieds. Compte tenu du fait que les deux manipulations induisent des changements physiologiques et comportementaux similaires, ils concluent qu'elles induisent un stress quantitativement comparable. Ce stress non négligeable est cependant plus faible que celui provoqué par un transport. Ils notent que le marquage au fer, contrairement à l'implant de la puce, induit une augmentation générale de la température de la peau et provoque une brûlure qui persiste durant au minimum 7 jours, ce qui indique la présence de dommages tissulaires (Erber et al., 2011). Le marquage au fer a donc un impact plus important sur le bien-être des chevaux. Une étude similaire chez des chevaux adultes montre des résultats différents. Les chercheurs observent significativement plus de comportements associés au stress lors du marquage au fer que lors de l'implant de la puce électronique (Lindegaard et al., 2009, in Erber et al., 2011).

Lors de nos études en clinique, nous avons également pu déterminer qu'il existait une relation entre le niveau de stress, apprécié via des comportements, le tempérament, et la qualité des interventions vétérinaires. Ces résultats signifient qu'il serait possible de comparer l'impact de diverses manipulations sur le bien-être des chevaux mais également de permettre aux cliniciens d'anticiper des éventuelles difficultés lors des examens et de prendre ainsi les mesures préventives *ad hoc*.

Pour effectuer certaines manipulations, les vétérinaires ont recours à une tranquillisation. L'utilisation de produits anesthésiants a pour objectif de calmer le cheval pour faciliter et sécuriser les manipulations. L'étude du tempérament et le suivi du niveau de stress du cheval lors de ces manipulations, permettrait d'étudier l'effet de divers protocoles de tranquillisation sur les réactions de stress du cheval, réactions qui peuvent, malgré la tranquillisation, rester soudaines et potentiellement dangereuses.

Nous nous sommes rendu compte, lors de diverses conférences rassemblant scientifiques, vétérinaires, cavaliers et éleveurs, que les études sur le stress du cheval intéressent fortement le milieu équin. Les personnes travaillant avec les chevaux sont soucieuses de leur bien-être ainsi que des performances qu'ils réalisent. Élever un poulain et le mener à la compétition est un travail long et onéreux, c'est pourquoi les études basées sur l'impact du tempérament sur les performances (Visser et al., 2003b;

[180] DISCUSSION GENERALE, CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Visser et al., 2008b), celles comparant génétique et résultats en compétition (Albertsdóttir et al., 2007; Kearsley et al., 2008; Stewart et al., 2010), ainsi que celles comparant les résultats de tests obtenus chez de jeunes chevaux avec les performances qu'ils réalisent plus tard en compétition (Thorén Hellsten et al., 2006) intéressent les éleveurs.

Le cheval domestique est confronté de manière ponctuelle, lors de la compétition ou lors de diverses manipulations, à divers éléments stressants d'impact variable. Il ne faut toutefois pas oublier que le bien-être peut fortement, et peut-être plus insidieusement, être affecté par la présence de stress chroniques dans des situations d'apparence plus anodine (systèmes d'hébergement, d'entraînement...). Rappelons aussi à ce titre qu'un animal subissant les effets d'un stress chronique sera plus sensible à tout nouvel élément stressant (Moberg, 1999).

Pour reprendre les mots du Dr Jan Ladewig, « *Human safety and horse welfare – two sides of the same coin* » : la sécurité des hommes et le bien-être des chevaux vont de pair. L'utilisation correcte d'équipements de sécurité lors de la pratique de l'équitation est évidemment très importante, mais elle n'empêche pas les chutes. En général, plus le bien-être d'un cheval est élevé, plus il est sécurisant de le manipuler et de le monter (Ladewig, 2010). Cependant, la sélection de chevaux à tempérament calme pour améliorer la sécurité du couple cavalier/cheval, n'est pas, pour diverses raisons, le but premier des éleveurs. La plupart des chevaux étant des animaux de loisir, la sélection d'un tempérament calme pourrait pourtant nettement diminuer le risque d'accidents (Lansade, 2005; Ladewig, 2010).

La majorité des techniques traditionnelles d'équitation et d'hébergement des chevaux sont en décalage avec les adaptations physiques et comportementales des chevaux domestiques ; certains chevaux s'adaptent, d'autres non (McGreevy et al., 2010). L'hébergement en stalle individuelle limite par exemple les comportements naturels du cheval. C'est malheureusement le système d'hébergement le plus répandu, surtout chez les chevaux de compétition.



Figure 22 : Hébergement traditionnel

Pour améliorer le bien-être de ces chevaux, les propriétaires acceptent souvent qu'une sortie en paddock soit bénéfique, mais le risque de blessures lors de ces sorties leur fait peur. Certains considèrent également qu'elles provoquent une diminution de la volonté ou de la motivation du cheval en compétition (Werhahn et al., 2011). Les études mesurant l'impact de facteurs susceptibles de diminuer le bien-être des chevaux, tels que les incohérences lors de la pratique de l'équitation (Ödberg et al., 1999; McGreevy et al., 2009) ou les inadaptations du système d'hébergement, sont de plus en plus nombreuses (Visser et al., 2008a; Lansade et al., 2011). Des scientifiques s'intéressent également de près au phénomène de "détresse acquise" ("*learned helplessness*") (Hall et al., 2008; McGreevy et al., 2009; Wickens et al., 2010) ainsi qu'au développement de troubles du comportement comme les stéréotypies (Normando et al., 2011) chez le cheval domestique. Tous ces sujets de recherche sur le bien-être des chevaux domestiques nous montrent qu'il y a de nombreuses pistes à explorer dans ce domaine.

L'évaluation du niveau de stress est un outil indispensable aux études s'intéressant au bien-être. L'utilisation de mesures physiologiques du stress, comme par exemple l'utilisation de la salive ou des matières fécales pour doser le taux de cortisol, ou encore la mesure de la variabilité de la fréquence cardiaque, sont très utiles et sont d'autant plus fiables qu'elles sont conjointement utilisées avec des méthodes éthologiques d'évaluation du stress.

Nous ne devons pas oublier que nous avons généralement de la chance que le cheval, un animal avec un tel gabarit et une telle force, se laisse manipuler, monter, travailler. Ce fait nous rappelle que cet animal domestique ne doit pas être maîtrisé par la force, mais que notre relation avec lui doit évoluer vers un partenariat respectueux des besoins de chacun. Il est de notre devoir de tenir compte de son bien-être lorsque nous lui imposons un cadre de vie tellement différent de son héritage comportemental.

ABRÉVIATIONS UTILISÉES

ACTH	AdrenoCorticoTropic Hormone
BDAs	Behaviourally Defined Adjectives
CBG	Cortisol Binding Globulin / Transcortine
CCE	Concours Complet d'Equitation
CCS	Concentration en Cortisol Salivaire
CRH	Corticotropin Releasing Hormone
ECG	ElectroCardioGramme
EMA	Easiness of Manipulation Assessment
EPEEG	Ecole Provinciale d'Elevage et d'Equitation de Gesves (Namur, Belgique)
FAWC	Farm Animal Welfare Council
FEI	Fédération Equestre Internationale
FFE	Fédération Française d'Equitation
FFM	Five Factor Model
FSH	Follicle-Stimulating Hormone
HPA axis	Hypothalamic-pituitary-adrenal axis
HPQ	Horse Personality Questionnaire
HR	Heart Rate
HRV	Heart Rate Variability
LH	Luteinizing Hormone
MDL	Minimum detection limits
NOT	Novel Object Test
PC	Plasmatic Cortisol
RIA	RadioImmuno Assay
SC	Salivary Cortisol
SCQ	Short Clinical Questionnaire
SGA	Syndrome Général d'Adaptation
SN	Système nerveux
TOCs	Troubles Obsessionnels Compulsifs
TSH	Thyroid-Stimulating Hormone
VAS	Visual Analogue Scale
VCP	Venous Catheter Placement

TABLES ET FIGURES

Table 1 : Table reprenant les 5 libertés selon le rapport de la FAWC datant du 5 décembre 1979 et celui de 2009	30
Table 2 : Horse mean SCCs at rest and during show-jumping	125
Table 3 : Riders mean SCCs during show-jumping	126
Table 4 : Corrélations entre les dimensions obtenues via le HPQ	134
Table 5 : Corrélations entre les variables du test de l'open-field	135
Table 6 : Corrélations entre les variables du test de l'objet nouveau	135
Table 7 : Corrélations entre les variables du test de l'open-field et celles du test de l'objet nouveau...	136
Table 8 : Behaviorally-defined rating scale used by the experimenter to determine horse's reaction score for each manipulation performed (1/2)	161
Table 9 : Behaviorally-defined rating scale used by the experimenter to determine horse's reaction score for each manipulation performed (2/2)	162
Table 10 : Means, minima and maxima obtained for the HPQ and Learning level assessment, scored by breeders.	163
Table 11 : Spearman's correlation coefficient between pairs of judges for each SCQ trait. No negative correlation has been found.	164
Table 12 : Spearman's correlations calculated between 'learning level' and other traits of the SCQ for each judge.	165
Table 13 : Significant Spearman's correlation coefficients found between behavior observed, temperament score and easiness of manipulation assessment (EMA).	168
Table 14 : Significant Spearman's correlation coefficients found between behavior observed and temperament traits.	169
Figure 1 : Diagramme schématisant les principales interactions entre les facteurs internes et externes de l'individu et de son environnement...	24
Figure 2 : Graphe théorique de l'influence du contrôle de l'environnement sur l'évolution de la réponse au stress selon son intensité ou sa durée	49
Figure 3 : Souffle, expiration d'air en position d'alerte	56
Figure 4 : Formule développée du cortisol	58
Figure 5 : Schéma de la diffusion passive du cortisol au niveau des glandes salivaires	67
Figure 6 : Éléments composant la 'Salivette' et tube de prélèvement sanguin	68
Figure 7 : Coton de la 'Salivette' sur la pince métallique	68
Figure 8 : Mean salivary cortisol response to awakening in dancers	77
Figure 9 : Cortisol levels rise in anticipation of, and again in reaction to, competition...	78
Figure 10 : Means of total serum cortisol concentration and SCC during an ACTH challenge...	96
Figure 11 : Linear regression found between total serum cortisol concentration and saliva cortisol concentration, for the 5 horses, during an ACTH challenge.	97
Figure 12 : Illustration des épreuves composant les CCE	108
Figure 13 : Evolution du cortisol salivaire sur une journée de compétition	109
Figure 14 : Evolution des CCS des chevaux en compétition	116
Figure 15 : Evolution des CCS des cavaliers des chevaux (décharges) en compétition	117
Figure 16 : Mean horse salivary cortisol level evolution in competition	126
Figure 17 : Mean rider salivary cortisol levels and horse salivary cortisol discharge evolution	127
Figure 18 : Cheval sur la table d'opération	146
Figure 19 : Cheval lors du passage sur la balance	147
Figure 20 : Maréchal ferrant effectuant un parage	149
Figure 21 : Endoscopie des voies respiratoires supérieures	151
Figure 22 : Hébergement traditionnel	180

RÉFÉRENCES

- Accorsi, PA, Carloni, E, Valsecchi, P, Viggiani, R, Gamberoni, M, Tamanini, C and Seren, E (2008). Cortisol determination in hair and faeces from domestic cats and dogs. *Gen. Comp. Endocrinol.* **155**(2): 398-402.
- Ader, R and Cohen, N (1975). Behaviorally conditioned immunosuppression. *Psychosom. Med.* **37**(4): 333-340.
- Albertsdóttir, E, Eriksson, S, Näsholm, A, Strandberg, E and Árnason, T (2007). Genetic analysis of competition data on Icelandic horses. *Livestock Science* **110**(3): 242-250.
- Albright, JD, Mohammed, HO, Heleski, CR, Wickens, CL and Houpt, KA (2009). Crib-biting in US horses: Breed predispositions and owner perceptions of aetiology. *Equine Vet. J.* **41**(5): 455-458.
- Alexander, SL and Irvine, CH (1998). The effect of social stress on adrenal axis activity in horses: the importance of monitoring corticosteroid-binding globulin capacity. *J. Endocrinol.* **157**(3): 425-432.
- Alexander, SL, Irvine, CH, Ellis, MJ and Donald, RA (1991). The effect of acute exercise on the secretion of corticotropin-releasing factor, arginine vasopressin, and adrenocorticotropin as measured in pituitary venous blood from the horse. *Endocrinology* **128**(1): 65-72.
- Alexander, SL, Irvine, CH, Livesey, JH and Donald, RA (1988). Effect of isolation stress on concentrations of arginine vasopressin, alpha-melanocyte-stimulating hormone and ACTH in the pituitary venous effluent of the normal horse. *J. Endocrinol.* **116**(3): 325-334.
- Anderson, MK, Friend, TH, Evans, JW and Bushong, DM (1999). Behavioral assessment of horses in therapeutic riding programs. *Appl. Amin. Behav. Sci.* **63**(1): 11-24.
- Arafah, BM, Nishiyama, FJ, Tlaygeh, H and Hejal, R (2007). Measurement of Salivary Cortisol Concentration in the Assessment of Adrenal Function in Critically Ill Subjects: A Surrogate Marker of the Circulating Free Cortisol. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **92**(8): 2965-2971.
- Argemi, B (1998) Les indicateurs du dosage des hormones stéroïdes. *Revue de l'ACOMEN* **4**, 225-231.
- Bachmann, I, Bernasconi, P, Herrmann, R, Weishaupt, MA and Stauffacher, M (2003). Behavioural and physiological responses to an acute stressor in crib-biting and control horses. *Appl. Amin. Behav. Sci.* **82**(4): 297-311.
- Badrick, E, Kirschbaum, C and Kumari, M (2007). The Relationship between Smoking Status and Cortisol Secretion. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **92**(3): 819-824.
- Bagshaw, CS, Ralston, SL and Fisher, H (1994). Behavioral and physiological effect of orally administered tryptophan on horses subjected to acute isolation stress. *Appl. Amin. Behav. Sci.* **40**(1): 1-12.
- Bartolomé, E, Cervantes, I, Gómez, MD, Molina, A and Valera, M (2008). Influencia de los factores ambientales en el rendimiento deportivo del caballo en pruebas objetivas de rendimiento funcional (Salto de Obstáculos). *XIV Reunion Nacional de Mejora Genetica Animal, Sevilla.*
- Becker-Birck, M, Schmidt, A, Biau, S, Möstl, E, Morillon, B, Aurich, J, Faure, JM and Aurich, C (2010). Cortisol release in sport horses participating in equestrian competition and events. *The 6th international Equitation Science Conference (ISES), Uppsala, Sweden.* .

Beerda, B, Schilder, MBH, Janssen, NSCRM and Mol, JA (1996). The Use of Saliva Cortisol, Urinary Cortisol, and Catecholamine Measurements for a Noninvasive Assessment of Stress Responses in Dogs. *Horm. Behav.* **30**(3): 272-279.

Berger, A, Scheibe, K-M, Eichhorn, K, Scheibe, A and Streich, J (1999). Diurnal and ultradian rhythms of behaviour in a mare group of Przewalski horse (*Equus ferus przewalskii*), measured through one year under semi-reserve conditions. *Appl. Amin. Behav. Sci.* **64**(1): 1-17.

Bernard, C (1865). Introduction à l'étude de la Médecine Expérimentale.

Bernard, C (1878). Les phénomènes de la vie, Librairies J-B Baillière et Fils.

Bigert, C, Bluhm, G and Theorell, T (2005). Saliva cortisol - a new approach in noise research to study stress effects. *Int. J. Hyg. Environ. Health* **208**(3): 227-230.

Blecha, F (2000). Immune System Response to Stress. The Biology of Animal Stress. G. P. Moberg and J. A. Mench, CAB International: pp. 111-122.

Boissy, A and Le Neindre, P (1997). Behavioral, Cardiac and Cortisol Responses to Brief Peer Separation and Reunion in Cattle. *Physiology & Behaviour* **61**(5): 693-699.

Bousquet-Melou, A, Formentini, E, Picard-Hagen, N, Delage, L, Laroute, V and Toutain, P-L (2006). The Adrenocorticotropin Stimulation Test: Contribution of a Physiologically Based Model Developed in Horse for Its Interpretation in Different Pathophysiological Situations Encountered in Man. *Endocrinology* **147**(9): 4281-4291.

Braastad, BO (1998). Effects of prenatal stress on behaviour of offspring of laboratory and farmed mammals. *Appl. Amin. Behav. Sci.* **61**(2): 159-180.

Breuer, K, Hemsworth, PH and Coleman, GJ (2003). The effect of positive or negative handling on the behavioural and physiological responses of nonlactating heifers. *Appl. Amin. Behav. Sci.* **84**(1): 3-22.

Broom, DM (1991). Animal welfare: concepts and measurement. *J. Anim. Sci.* **69**: 4167-4175.

Buijs, S, Keeling, L, Rettenbacher, S, Van Poucke, E and Tuytens, FAM (2009). Stocking density effects on broiler welfare: Identifying sensitive ranges for different indicators. *Poult. Sci.* **88**(8): 1536-1543.

Buijs, S, Keeling, LJ, Rettenbacher, S, Maertens, L and Tuytens, FAM (2011). Glucocorticoid metabolites in rabbit faeces—Influence of environmental enrichment and cage size. *Physiology & Behavior* **104**(3): 469-473.

Burns, VE, Carroll, D, Ring, C and Drayson, M (2003). Antibody response to vaccination and psychosocial stress in humans: relationships and mechanisms. *Vaccine* **21**(19-20): 2523-2534.

Bushong, DM, Friend, TH and Knabe, DA (2000). Salivary and plasma cortisol response to adrenocorticotropin administration in pigs. *Lab. Anim.* **34**(2): 171-181.

Calixto, C, Martinez, FE, Jorge, SM, Moreira, AC and Martinelli, CE (2002). Correlation between plasma and salivary cortisol levels in preterm infants. *J. Pediatrics* **140**(1): 116-118.

Campbell, NN (1995). Biologie.

Cannon, WB (1915). Bodily Changes in Pain, Hunger, Fear and Rage.

Cannon, WB (1932). The Wisdom of the body. *Physiol. Rev.* **9**: 399-431.

Cannon, WB (1935). Stresses and Strain of Homeostasis.

Castro, M, Elias, PCL, Martinelli, CEJ, Antonini, SRR, Santiago, L and Moreira, AC (2000). Salivary cortisol as a tool for physiological studies and diagnostic strategies. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **33**(10): 1171-1175.

- Cavallone, E, Giancamillo, Md, Secchiero, B, Belloli, A, Pravettoni, D and Rimoldi, EM (2002). Variations of serum cortisol in Argentine horses subjected to ship transport and adaptation stress. *J. Equine Vet. Sci.* **22**(12): 541-545.
- Cayado, P, Munoz-Escassi, B, Dominguez, C, Manley, W, Olabarri, B, Sanchez de la Muela, M, Castejon, F, Maranon, G and Vara, E (2006). Hormone response to training and competition in athletic horses. *Equine Vet. J. Suppl.*(36): 274-278.
- Chacon Perez, G, Garcia-Belenguer Laita, S, Illera del Portal, JC and Palacio Liesa, J (2004). Validation of an EIA technique for the determination of salivary cortisol in cattle. *Spanish Journal of Agricultural Research* **2**(1): 45-51.
- Charil, A, Laplante, DP, Vaillancourt, C and King, S (2010). Prenatal stress and brain development. *Brain Research Reviews* **65**(1): 56-79.
- Chiappin, S, Antonelli, G, Gatti, R and De Palo, EF (2007). Saliva specimen: A new laboratory tool for diagnostic and basic investigation. *Clin. Chim. Acta* **383**(1-2): 30-40.
- Clark, DK, Friend, TH and Dellmeier, G (1993). The effect of orientation during trailer transport on heart rate, cortisol and balance in horses. *Appl. Amin. Behav. Sci.* **38**(3-4): 179-189.
- Colborn, DR, Thompson, DL, Jr., Rahmanian, MS and Roth, TL (1991a). Plasma concentrations of cortisol, prolactin, luteinizing hormone, and follicle-stimulating hormone in stallions after physical exercise and injection of secretagogue before and after sulpiride treatment in winter. *J. Anim. Sci.* **69**(9): 3724-3732.
- Colborn, DR, Thompson, DL, Jr., Roth, TL, Capehart, JS and White, KL (1991b). Responses of cortisol and prolactin to sexual excitement and stress in stallions and geldings. *J. Anim. Sci.* **69**(6): 2556-2562.
- Cook, CJ, Mellor, DJ, Harris, PJ, Ingram, JR and Matthews, LR (2000). Hands-on and Hands-off Measurement of Stress. The Biology of Animal Stress. G. P. Moberg and J. A. Mench, CAB International: pp. 123-146.
- Cooper, JJ, McDonald, L and Mills, DS (2000). The effect of increasing visual horizons on stereotypic weaving: implications for the social housing of stabled horses. *Appl. Amin. Behav. Sci.* **69**(1): 67-83.
- Costa, PT (1992). Normal personality assessment in clinical practice: The NEO Personality Inventory. *Psychol. Assess.* **4**(1): 5.
- Costa, PT and McCrae, RR (1992). Four ways five factors are basic. *Personality and Individual Differences* **13**(6): 653-665.
- Covalesky, ME, Russoniello, CR and Malinowski, K (1992). Effects of show-jumping performance stress on plasma cortisol and lactate concentrations and heart rate and behavior in horses. *J. Equine Vet. Sci.* **12**(4): 244-251.
- Creighton, E, Hughes, T and Coleman, R (2004). Validation of salivary cortisol as an indicator of stress in horses (*Equus caballus*). *Proceeding of the 38th International Congress of the ISAE (2004)*, Col. University of Helsinki, Finland.
- Crozatier, C (2005). *Approche environnementale et génétique de la sensibilité comportementale et moléculaire à deux psychotropes : la cocaïne et la fluoxétine*. PhD.
- Cury, F, Sarrazin, P, Pérès, C and Famose, J-P (1999). Mesurer l'anxiété du sportif en compétition: présentation de l'échelle d'état d'anxiété en compétition (EEAC). La gestion du stress. E. R. EPS. Paris. **Dossier EPS n°43**.
- de Passille, AM and Rushen, J (2005). Can we measure human-animal interactions in on-farm animal welfare assessment?: Some unresolved issues. *Appl. Amin. Behav. Sci.* **92**(3): 193-209.

Demey-Ponsart, E, Foidart, JM, Sulon, J and Sodoyez, JC (1982). Serum CBG, free and total cortisol and circadian patterns of adrenal function in normal pregnancy. *J. Steroid Biochem.* **16**(2): 165-169.

Demey-Ponsart, E, Sulon, J, Sodoyer, JC, Bourque, J, Gaspard, UJ and Van Cauwenberge, H (1986). Stéroïdes salivaires et hormones plasmiqes libres chez la femme. *J. Gynécol. Obstet. Biol. Reprod.* **15**: 615-619.

Desbordes, AL (2006). *Vétérinaires équins mixtes : comment répondre à la demande croissante des propriétaires de chevaux de loisir en France ?* Docteur Vétérinaire, Université Paul-Sabatier de Toulouse.

Désiré, L, Boissy, A and Veissier, I (2002). Emotions in farm animals:: a new approach to animal welfare in applied ethology. *Behav. Processes* **60**(2): 165-180.

Donaldson, MT, McDonnell, SM, Schanbacher, BJ, Lamb, SV, McFarlane, D and Beech, J (2005). Variation in Plasma Adrenocorticotrophic Hormone Concentration and Dexamethasone Suppression Test Results with Season, Age, and Sex in Healthy Ponies and Horses. *J. Vet. Intern. Med.* **19**(2): 217-222.

Dorin, RI, Pai, HK, Ho, JT, Lewis, JG, Torpy, DJ, Urban Iii, FK and Qualls, CR (2009). Validation of a simple method of estimating plasma free cortisol: Role of cortisol binding to albumin. *Clin. Biochem.* **42**(1-2): 64-71.

Dorman, C, Barnes, A and Fleming, PT (2009). Measuring the behavioural expression of horses competing in a 160 km endurance ride. *5th Conference of International Society for Equitation Science, Sydney - Australia.*

Dupouy, J-P, Boissin, J, Clos, J, Deschaux, P, Legrand, C and Picon, LO (1992). Hormones et grandes fonctions.

Elsaesser, F, Klobasa, F and Ellendorff, F (2001). Evaluation of salivary cortisol determination and of cortisol responses to ACTH as markers of the training status/fitness of warmblood sports horses. *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.* **108**(1): 31-36.

Elsasser, TH, Klasing, KC, Filipov, N and Thompson, F (2000). The Metabolic Consequences of Stress: Targets for Stress and Priorities of Nutrient Use. The Biology of Animal Stress. G. P. Moberg and J. A. Mench, CAB International: pp. 77-110.

Erber, R, Wulf, M, Becker-Birck, M, Kaps, S, Aurich, JE, Möstl, E and Aurich, C (2011). Physiological and behavioural responses of young horses to hot iron branding and microchip implantation. *The Veterinary Journal* **in Press.**

Espmark, ÅM, Eriksen, MS, Salte, R, Braastad, BO and Bakken, M (2008). A note on pre-spawning maternal cortisol exposure in farmed Atlantic salmon and its impact on the behaviour of offspring in response to a novel environment. *Appl. Amin. Behav. Sci.* **110**(3-4): 404-409.

FAWC, FAWC (1979). Farm Animal Welfare Council - Press Statement.

FAWC, FAWC (2009). Farm Animal Welfare Council - Press Statement.

Fazio, E and Ferlazzo, A (2003). Evaluation of stress during transport. *Veterinary Research Communication* **27**, suppl **1**(Suppl 1): 519-524.

Fazio, E, Medica, P, Aronica, V, Grasso, L and Ferlazzo, A (2008a). Circulating beta-endorphin, adrenocorticotrophic hormone and cortisol levels of stallions before and after short road transport: stress effect of different distances. *Acta Vet. Scand.* **50**(1): 6.

Fazio, E, Medica, P, Cravana, C and Ferlazzo, A (2008b). Effects of competition experience and transportation on the adrenocortical and thyroid responses of horses. *Vet Rec.* **163**(24): 713-716.

- Fell, L, Shutt, D and Bentley, C (1985). Development of a salivary cortisol method for detecting changes in plasma "free" cortisol arising from acute stress in sheep. *Aust. Vet. J.* **62**(12): 403-406.
- Fenske, M (1996). Saliva cortisol and testosterone in the guinea pig: Measures for the endocrine function of adrenals and testes? *Steroids* **61**(11): 647-650.
- FFE. (2011). <http://www.ffe.com/>.
- Flisinska-Bojanowska, A, Komosa, M and Gill, J (1991). Influence of pregnancy on diurnal and seasonal changes in cortisol, T3 and T4 levels in the mare blood serum. *Comp. Biochem. Physiol. A* **98**(1): 23-30.
- Forkman, B, Boissy, A, Meunier-Salaün, MC, Canali, E and Jones, RB (2007). A critical review of fear tests used on cattle, pigs, sheep, poultry and horses. *Physiol. Behav.* **92**(3): 340-374.
- Francis, SJ, Walker, RF, Riad-Fahmy, D, Hughes, D, Murphy, JF and Gray, OP (1987). Assessment of adrenocortical activity in term newborn infants using salivary cortisol determinations. *J. Pediatrics* **111**(1): 129-133.
- Freeman, H and Elmadjian, F (1947). The relationship between blood sugar and lymphocyte levels in normal and psychotic subjects. *Psychosom. Med.* **9**: 364-371.
- French, JM (1993). Assessment of donkey temperament and the influence of home environment. *Appl. Anim. Behav. Sci.* **36**(2-3): 249-257.
- Fukasawa, M and Tsukada, H (2009). The relationship between milk traits and behavioural characteristics of newly calved cows after introduction to new social group. *the 43rd Congress of the International Society for Applied Ethology, Cairns, Queensland, Australia.*
- Fureix, C, Jegou, P, Sankey, C and Hausberger, M (2009a). How horses (*Equus caballus*) see the world: humans as significant "objects". *Anim. Cogn.* **12**(4): 643-654.
- Fureix, C, Jegou, P, Coste, C and Hausberger, M (2010). Indicateurs de bien-être/mal-être chez le cheval : une synthèse. *36ème Journée de la recherche équine, Paris (France).*
- Fureix, C, Pagès, M, Bon, R, Lassalle, J-M, Kuntz, P and Gonzalez, G (2009b). A preliminary study of the effects of handling type on horses' emotional reactivity and the human-horse relationship. *Behav. Processes* **82**(2): 202-210.
- Gaultier, E, Falewee, C, Boureau, V and Pageat, P (2005). Les stéréotypies : revue de littérature I - Définitions et épidémiologie. *Pratique Vétérinaire Equine* **37**(146).
- Gayraud, V, Alvinerie, M and Toutain, PL (1996). Interspecies variations of corticosteroid-binding globulin parameters. *Domest. Anim. Endocrinol.* **13**(1): 35-45.
- Gonzalez-Bono, E, Salvador, A, Serrano, MA and Ricarte, J (1999). Testosterone, Cortisol, and Mood in a Sports Team Competition. *Horm. Behav.* **35**(1): 55-62.
- Górecka-Bruzda, A, Jastrzębska, E, Sosnowska, Z, Jaworski, Z, Jezierski, T and Chruszczewski, MH (2011). Reactivity to humans and fearfulness tests: Field validation in Polish Cold Blood Horses. *Appl. Anim. Behav. Sci.* **133**(3-4): 207-215.
- Górecka, A, Golonka, M, Chruszczewski, M and Jezierski, T (2007). A note on behaviour and heart rate in horses differing in facial hair whorl. *Appl. Anim. Behav. Sci.* **105**(1-3): 244-248.
- Gosling, SD (2001). From Mice to Men: What Can We Learn About Personality From Animal Research? *Psychol. Bull.* **127**(1): 45-86.
- Gosling, SD and Hilliard, SJ (2009). Personality and performance in explosive-detection military working dogs (MWDs). *Journal of Veterinary Behavior: Clinical Applications and Research* **4**(6): 239-240.
- Gosling, SD, Hilliard, SJ, Schapiro, SJ, Vazire, S, Kwan, VSY and John, OP (2007). Assessing personality and temperament in animals. *Journal of Veterinary Behavior: Clinical Applications and Research* **3**(4): 177-177.

Gosling, SD and John, OP (1999). Personality Dimensions in Nonhuman Animals: A cross-Species Review. *Current Directions in Psychological Science* **8**(3): 69-75.

Gosling, SD and Vazire, S (2002). Are we barking up the right tree? Evaluating a comparative approach to personality. *Journal of Research in Personality* **36**(6): 607-614.

Greenwood, PL and Shutt, DA (1992). Salivary and plasma cortisol as an index of stress in goats. *Aust. Vet. J.* **69**: 161-163.

Hall, C, Goodwin, D, Heleski, C, Randle, H and Waran, N (2008). Is There Evidence of Learned Helplessness in Horses? *Journal of Applied Animal Welfare Science* **11**(3): 249-266.

Haras_Nationaux_Français (2011). <http://www.haras-nationaux.fr/>.

Harewood, EJ and McGowan, CM (2005). Behavioral and physiological responses to stabling in naive horses. *J. Equine Vet. Sci.* **25**(4): 164-170.

Hasegawa, M, Toda, M and Morimoto, K (2008). Changes in salivary physiological stress markers associated with winning and losing. *Biomed Res* **29**(1): 43-46.

Hausberger, M and Ricard, A (2002). Génétique et comportement chez le cheval. *INRA Productions Animales* **15**(5): 383-389.

Hausberger, M and Richard, M (1999). Ethologie et cheval : que peut apporter une discipline scientifique à une meilleure approche du cheval ? L'équitation, le cheval et l'éthologie. Belin.

Hausberger, M, Roche, H, Henry, S and Visser, EK (2008). A review of the human-horse relationship. *Appl. Amin. Behav. Sci.* **109**(1): 1-24.

Heleski, CR, Shelle, AC, Nielsen, BD and Zanella, AJ (2002). Influence of housing on weaning horse behavior and subsequent welfare. *Appl. Amin. Behav. Sci.* **78**(2-4): 291-302.

Hellhammer, DH, Wüst, S and Kudielka, BM (2009). Salivary cortisol as a biomarker in stress research. *Psychoneuroendocrinology* **34**(2): 163-171.

Hemsworth, PH and Barnett, JL (2000). Human-Animal Interactions and Animal Stress. The Biology of Animal Stress. G. P. Moberg and J. A. Mench, CAB International: pp. 309-336.

Hemsworth, PH, Barnett, JL and Hansen, C (1987). The influence of inconsistent handling by humans on the behaviour, growth and corticosteroids of young pigs. *Appl. Amin. Behav. Sci.* **17**(3-4): 245-252.

Hennessy, MB, Voith, VL, Mazzei, SJ, Buttram, J, Miller, DD and Linden, F (2001). Behavior and cortisol levels of dogs in a public animal shelter, and an exploration of the ability of these measures to predict problem behavior after adoption. *Appl. Amin. Behav. Sci.* **73**(3): 217-233.

Hjollund, NHI, Jensen, TK, Bonde, JPE, Henriksen, TB, Andersson, A-M, Kolstad, HA, Ernst, E, Giwerzman, A, Skakkebæk, NE and Olsen, J (1999). Distress and reduced fertility: a follow-up study of first-pregnancy planners. *Fertil. Steril.* **72**(1): 47-53.

Houpt, KA and Wolski, TR (1982). Domestic animal behavior for veterinarians and animal scientists, The Iowa State University Press.

Hughes, T, Creighton, E and Coleman, R (2006). Validation of Salivary Cortisol as an indicator of HPA activity in Horses. *Proceedings of the 41st International Congress of the ISAE, Merida, Mexico*.

Irvine, CH and Alexander, SL (1987). Measurement of free cortisol and the capacity and association constant of cortisol-binding proteins in plasma of foals and adult horses. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* **35**: 19-24.

Irvine, CH and Alexander, SL (1994). Factors affecting the circadian rhythm in plasma cortisol concentrations in the horse. *Domest. Anim. Endocrinol.* **11**(2): 227-238.

- Jäggin, S, Fürst, A, Hässig, M and Auer, J (2005). Kick injuries of veterinarians during examination and treatment of horses: a retrospective study in Switzerland. *Schweiz. Arch. Tierheilkd.* **147**(7): 289-295.
- Janet, C (2007). Le bien-être des animaux d'élevage. Mieux comprendre l'actualité - Note de synthèse, INRA.
- Janssens, CJ, Helmond, FA, Loyens, LW, Schouten, WG and Wiegant, VM (1995). Chronic stress increases the opioid-mediated inhibition of the pituitary-adrenocortical response to acute stress in pigs. *Endocrinology* **136**(4): 1468-1473.
- Jensen, KH, Pedersen, LJ, Nielsen, EK, Heller, KE, Ladewig, J and Jørgensen, E (1996). Intermittent stress in pigs: Effects on behavior, pituitary — Adrenocortical axis, growth, and gastric ulceration. *Physiology & Behavior* **59**(4-5): 741-748.
- Jeziarski, T, Jaworski, Z and Gorecka, A (1999). Effects of handling on behaviour and heart rate in Konik horses: comparison of stable and forest reared youngstock. *Appl. Amin. Behav. Sci.* **62**(1): 1-11.
- Jones, AC and Gosling, SD (2005). Temperament and personality in dogs (*Canis familiaris*): A review and evaluation of past research. *Appl. Amin. Behav. Sci.* **95**(1-2): 1-53.
- Jongman, EC, Bidstrup, I and Hemsworth, PH (2005). Behavioural and physiological measures of welfare of pregnant mares fitted with a novel urine collection device. *Appl. Amin. Behav. Sci.* **93**(1-2): 147-163.
- Kay, R and Hall, C (2009). The use of a mirror reduces isolation stress in horses being transported by trailer. *Appl. Amin. Behav. Sci.* **116**(2-4): 237-243.
- Kearsley, CGS, Woolliams, JA, Coffey, MP and Brotherstone, S (2008). Use of competition data for genetic evaluations of eventing horses in Britain: Analysis of the dressage, showjumping and cross country phases of eventing competition. *Livestock Science* **118**(1-2): 72-81.
- Kelly, SJ, Young, R, Sweeting, H, Fischer, JE and West, P (2008). Levels and confounders of morning cortisol collected from adolescents in a naturalistic (school) setting. *Psychoneuroendocrinology* **33**(9): 1257-1268.
- Kiley-Worthington, M, Ed. (1999). Le comportement des chevaux, Zulma.
- Kirschbaum, C and Hellhammer, D (2000). Salivary cortisol — an invaluable tool in studies of HPA function. *Psychoneuroendocrinology* **25**, **Supplement 1**(0): S14.
- Kirschbaum, C and Hellhammer, DH (1989). Salivary cortisol in psychobiological research. An overview. *Neuropsychobiology* **22**: 150-169.
- Kirschbaum, C and Hellhammer, DH (1994). Salivary cortisol in psychoneuroendocrine research: Recent developments and applications. *Psychoneuroendocrinology* **19**(4): 313-333.
- Kirschbaum, C and Hellhammer, DH (2007). Salivary Cortisol. Encyclopedia of Stress. M. George Fink Associate Editors: Bruce, E. R. d. Kloet, R. Robert et al. New York, Academic Press: 405-409.
- Kirschbaum, C, Pirke, K-m and Hellhammer, DH (1995). Preliminary evidence for reduced cortisol responsivity to psychological stress in women using oral contraceptive medication. *Psychoneuroendocrinology* **20**(5): 509-514.
- Kirschbaum, C, Tietze, A, Skoluda, N and Dettenborn, L (2009). Hair as a retrospective calendar of cortisol production--Increased cortisol incorporation into hair in the third trimester of pregnancy. *Psychoneuroendocrinology* **34**(1): 32-37.
- Kivlighan, KT, Granger, DA and Booth, A (2005). Gender differences in testosterone and cortisol response to competition. *Psychoneuroendocrinology* **30**(1): 58-71.

- Krawczel, PD, Friend, TH, Caldwell, DJ, Archer, G and Ameiss, K (2007). Effects of continuous versus intermittent transport on plasma constituents and antibody response of lambs. *J. Anim. Sci.* **85**(2): 468-476.
- Lac, G (2001). Saliva assays in clinical and research biology. *Pathol. Biol.* **49**(8): 660-667.
- Ladewig, J (2000). Chronic Intermittent Stress: A Model for the Study of Long-term Stressors. *The Biology of Animal Stress*. G. P. Moberg and J. A. Mench, CAB International: pp. 159-170.
- Ladewig, J (2010). Human safety and horse welfare - Two sides of the same coin. *The 6th international Equitation Science Conference (ISES), Uppsala, Sweden.* .
- Lansade, L (2005). *Le tempérament du cheval. Etude théorique. Application à la sélection des chevaux destinés à l'équitation*. Thèse de doctorat, Université François Rabelais de Tours.
- Lansade, L, Bertrand, M, Boivin, X and Bouissou, MF (2004). Effects of handling at weaning on manageability and reactivity of foals. *Appl. Amin. Behav. Sci.* **87**(1/2): 131-149.
- Lansade, L, Bertrand, M and Bouissou, MF (2005). Effects of neonatal handling on subsequent manageability, reactivity and learning ability of foals. *Appl. Amin. Behav. Sci.* **92**(1/2): 143-158.
- Lansade, L and Bouissou, M-F (2008a). Reactivity to humans: A temperament trait of horses which is stable across time and situations. *Appl. Amin. Behav. Sci.* **114**(3-4): 492-508.
- Lansade, L, Bouissou, M-F and Erhard, HW (2008b). Reactivity to isolation and association with conspecifics: A temperament trait stable across time and situations. *Appl. Amin. Behav. Sci.* **109**(2-4): 355-373.
- Lansade, L, Neveux, C, Valenchon, M, Moussu, C, Yvon, JM, Pasquier, F and Levy, F (2011). Enrichir l'environnement des chevaux permet d'améliorer leur bien-être, de diminuer leur émotivité et d'augmenter la sécurité des manipulateurs. *37ème journée de la recherche équine, Paris*.
- Lansade, L and Simon, F (2010). Horses' learning performances are under the influence of several temperamental dimensions. *Appl. Amin. Behav. Sci.* **125**(1-2): 30-37.
- Lay, DC, Jr., Friend, TH, Randel, RD, Jenkins, OC, Neuendorff, DA, Kapp, GM and Bushong, DM (1996). Adrenocorticotrophic hormone dose response and some physiological effects of transportation on pregnant Brahman cattle. *J. Anim. Sci.* **74**(8): 1806-1811.
- Lay Jr, DC (2000). Consequences of Stress During Development. *The Biology of Animal Stress*. G. P. Moberg and J. A. Mench, CAB International: pp. 249-268.
- le Roux, CW, Chapman, GA, Kong, WM, Dhillo, WS, Jones, J and Alaghband-Zadeh, J (2003). Free Cortisol Index Is Better Than Serum Total Cortisol in Determining Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Status in Patients Undergoing Surgery. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **88**(5): 2045-2048.
- Le Scolan, N, Hausberger, M and Wolff, A (1997). Stability over situations in temperamental traits of horses as revealed by experimental and scoring approaches. *Behav. Processes* **41**(3): 257-266.
- Lebelt, D, Schonreiter, S and Zanella, AJ (1996). Salivary cortisol in stallions: the relationship with plasma levels, daytime profile and changes in response to semen collection. *Pferdeheilkunde* **12**(4): 411-414.
- Lee, C, Fisher, AD, Reed, MT and Henshall, JM (2008). The effect of low energy electric shock on cortisol, β -endorphin, heart rate and behaviour of cattle. *Appl. Amin. Behav. Sci.* **113**(1-3): 32-42.
- Lesimple, C, Fureix, C, LeScolan, N, Richard-Yris, M-A and Hausberger, M (2011). Housing conditions and breed are associated with emotionality and cognitive abilities in riding school horses. *Appl. Amin. Behav. Sci.* **129**(2-4): 92-99.

- Levine, A, Zagoory-Sharon, O, Feldman, R, Lewis, JG and Weller, A (2007). Measuring cortisol in human psychological studies. *Physiology & Behavior* **90**(1): 43-53.
- Ligout, S, Bouissou, M-F and Boivin, X (2008). Comparison of the effects of two different handling methods on the subsequent behaviour of Anglo-Arabian foals toward humans and handling. *Appl. Anim. Behav. Sci.* **113**(1-3): 175-188.
- Lloyd, AS, Martin, JE, Bornett-Gauci, HLI and Wilkinson, RG (2007). Evaluation of a novel method of horse personality assessment: Rater-agreement and links to behaviour. *Appl. Anim. Behav. Sci.* **105**(1-3): 205-222.
- Lloyd, AS, Martin, JE, Bornett-Gauci, HLI and Wilkinson, RG (2008). Horse personality: Variation between breeds. *Appl. Anim. Behav. Sci.* **112**(3-4): 369-383.
- Mal, ME, Friend, TH, Lay, DC, Vogelsang, SG and Jenkins, OC (1991). Behavioral responses of mares to short-term confinement and social isolation. *Appl. Anim. Behav. Sci.* **31**(1-2): 13-24.
- Malinowski, K, Hallquist, NA, Helyar, L, Sherman, AR and Scanes, CG (1990). Effect of different separation protocols between mares and foals on plasma cortisol and cell-mediated immune response. *J. Equine Vet. Sci.* **10**(5): 363-368.
- Malinowski, K, Shock, EJ, Rochelle, P, Kearns, CF, Guirnalda, PD and McKeever, KH (2006). Plasma beta-endorphin, cortisol and immune responses to acute exercise are altered by age and exercise training in horses. *Equine Vet. J. Suppl.*(36): 267-273.
- Malmkvist, J and Palme, R (2008). Periparturient nest building: Implications for parturition, kit survival, maternal stress and behaviour in farmed mink (*Mustela vison*). *Appl. Anim. Behav. Sci.* **114**(1-2): 270-283.
- Mason, GJ (1991). Stereotypies: a critical review. *Anim. Behav.* **41**(6): 1015-1037.
- Mason, GJ and Latham, NR (2004). Can't stop, won't stop: is stereotypy a reliable animal welfare indicator? *Animal Welfare* **13**(Supplement 1): 57-69.
- Mason, WA (2000). Early Developmental Influences of Experience on Behaviour, Temperament and Stress. The Biology of Animal Stress. G. P. Moberg and J. A. Mench, CAB International: pp. 269-290.
- Matteri, RL, Carroll, JA and Dyer, CJ (2000). Neuroendocrine Responses to Stress. The Biology of Animal Stress. G. P. Moberg and J. A. Mench, CAB International: pp. 43-76.
- May, ML, Nolen-Walston, RD, Utter, ME and Boston, RC (2010). Comparison of Hematologic and Biochemical Results on Blood Obtained by Jugular Venipuncture as Compared with Intravenous Catheter in Adult Horses. *J. Vet. Intern. Med.* **24**(6): 1462-1466.
- Mayes, E and Duncan, P (1986). Temporal Patterns of Feeding Behaviour in Free-Ranging Horses. *Behaviour* **96**(1/2): 105-129.
- McBride, S and Hemmings, A (2009). A Neurologic Perspective of Equine Stereotypy. *J. Equine Vet. Sci.* **29**(1): 10-16.
- McCall, CA, Hall, S, McElhenney, WH and Cummins, KA (2006). Evaluation and comparison of four methods of ranking horses based on reactivity. *Appl. Anim. Behav. Sci.* **96**(1-2): 115-127.
- McCann, JS, Heird, JC, Bell, RW and Lutherer, LO (1988). Normal and more highly reactive horses. I. Heart rate, respiration rate and behavioral observations. *Appl. Anim. Behav. Sci.* **19**(3-4): 201-214.
- McGreevy, P and McLean, AN, Eds. (2010). Equitation Science, Wiley-Blackwell.
- McGreevy, P and Nicol, C (1998). Physiological and behavioral consequences associated with short-term prevention of crib-biting in horses. *Physiol. Behav.* **65**(1): 15-23.
- McGreevy, PD and McLean, AN (2009). Punishment in horse-training and the concept of ethical equitation. *Journal of Veterinary Behavior: Clinical Applications and Research* **4**(5): 193-197.

McGrogan, C, Hutchison, MD and King, JE (2008). Dimensions of horse personality based on owner and trainer supplied personality traits. *Appl. Anim. Behav. Sci.* **113**(1-3): 206-214.

Meagher, R, Hunter, B, Bechard, A and Mason, G (2010). When inactivity predicts poor reproductive success in farmed mink, is poor welfare the link ? *The 44th Congress of the International Society for Applied Ethology, Uppsala, Sweden.*

Mears, CJ and Brown, FA (1997). Cortisol and β -endorphin responses to physical and physiological stressors in lambs. *Can. J. Anim. Sci.* **77**: 689-694.

Mehta, PH and Gosling, SD (2008). Bridging human and animal research: A comparative approach to studies of personality and health. *Brain, Behavior, and Immunity* **22**(5): 651-661.

Mellor, DJ, Cook, CJ and Stafford, KJ (2000). Quantifying Some Responses to Pain as a Stressor. The Biology of Animal Stress. G. P. Moberg and J. A. Mench, CAB International: pp. 171-198.

Melotti, L, Oostindjer, M, Bolhuis, JE, Held, S and Mendl, M (2011). Coping personality type and environmental enrichment affect aggression at weaning in pigs. *Appl. Anim. Behav. Sci.* **133**(3-4): 144-153.

Mesquita, AR, Wegerich, Y, Patchev, AV, Oliveira, M, Leão, P, Sousa, N and Almeida, OFX (2009). Glucocorticoids and neuro- and behavioural development. *Semin. Fetal. Neonatal Med.* **14**(3): 130-135.

Moberg, GP (1999). When does stress become distress? *Lab. Anim.* **28**: 22-26.

Moberg, GP (2000). Biological Response to Stress: Implications for Animal Welfare. The Biology of Animal Stress. G. P. Moberg and J. A. Mench, CAB International: pp. 1-21.

Momozawa, Y, Kusunose, R, Kikusui, T, Takeuchi, Y and Mori, Y (2005). Assessment of equine temperament questionnaire by comparing factor structure between two separate surveys. *Appl. Anim. Behav. Sci.* **92**(1-2): 77-84.

Momozawa, Y, Ono, T, Sato, F, Kikusui, T, Takeuchi, Y, Mori, Y and Kusunose, R (2003). Assessment of equine temperament by a questionnaire survey to caretakers and evaluation of its reliability by simultaneous behavior test. *Appl. Anim. Behav. Sci.* **84**(2): 127-138.

Momozawa, Y, Terada, M, Sato, F, Kikusui, T, Takeuchi, Y, Kusunose, R and Mori, Y (2007). Assessing Equine Anxiety-Related Parameters Using an Isolation Test in Combination with a Questionnaire Survey. *The Journal of Veterinary Medical Science* **69**(9): 945-950.

Moons, C, Heleski, CR, Leece, MC and Zanella, AJ (2002). Conflicting Results in the Association Between Plasma and Salivary Cortisol Levels in Foals, Havemeyer foundation.

Moons, CPH, Laughlin, K and Zanella, AJ (2005). Effects of short-term maternal separations on weaning stress in foals. *Appl. Anim. Behav. Sci.* **91**(3-4): 321-335.

Moreira, N, Brown, JL, Moraes, W, Swanson, WF and Monteiro-Filho, ELA (2007). Effect of housing and environmental enrichment on adrenocortical activity, behavior and reproductive cyclicity in the female tigrina (*Leopardus tigrinus*) and margay (*Leopardus wiedii*). *Zoo Biology* **26**(6): 441-460.

Morgan, KN and Tromborg, CT (2007). Sources of stress in captivity. *Appl. Anim. Behav. Sci.* **102**(3-4): 262-302.

Mormède, P, Andanson, S, Aupérin, B, Beerda, B, Guémené, D, Malmkvist, J, Manteca, X, Manteuffel, G, Prunet, P, van Reenen, CG, Richard, S and Veissier, I (2007). Exploration of the hypothalamic-pituitary-adrenal function as a tool to evaluate animal welfare. *Physiol. Behav.* **92**(3): 317-339.

Mormède, P, Lemaire, V, Castanon, N, Dulluc, J, Laval, M and Le Moal, M (1990). Multiple neuroendocrine responses to chronic social stress: interaction between individual characteristics and situations factors. *Physiol. Behav.* **47**: 1099-1105.

- Morris, PH, Gale, A and Duffy, K (2002a). Can judges agree on the personality of horses? *Personality and Individual Differences* **33**(1): 67-81.
- Morris, PH, Gale, A and Howe, S (2002b). The factor structure of horse personality. *Anthrozoos* **15**(4): 300-322.
- Möstl, E and Palme, R (2002). Hormones as indicators of stress. *Domest. Anim. Endocrinol.* **23**(1-2): 67-74.
- Muller, R and von Keyserlingk, MAG (2006). Consistency of flight speed and its correlation to productivity and to personality in *Bos taurus* beef cattle. *Appl. Amin. Behav. Sci.* **99**(3-4): 193-204.
- Munsters, CCBM, Visser, KEK, van den Broek, J and Sloet van Oldruitenborgh-Oosterbaan, MM (2011). The influence of challenging objects and horse-rider matching on heart rate, heart rate variability and behavioural score in riding horses. *The Veterinary Journal*(In press).
- Nagy, K, Bodó, G, Bárdos, G, Bánszky, N and Kabai, P (2010). Differences in temperament traits between crib-biting and control horses. *Appl. Amin. Behav. Sci.* **122**(1): 41-47.
- Nagy, K, Bodó, G, Bárdos, G, Harnos, A and Kabai, P (2009). The effect of a feeding stress-test on the behaviour and heart rate variability of control and crib-biting horses (with or without inhibition). *Appl. Amin. Behav. Sci.* **121**(2): 140-147.
- Negrao, JA, Porcionato, MA, de Passille, AM and Rushen, J (2004). Cortisol in Saliva and Plasma of Cattle After ACTH Administration and Milking. *J. Dairy Sci.* **87**(6): 1713-1718.
- Nicol, C (2000). Equine Stereotypies. Recent advances in Companion Animal Behavior Problems. K. A. Houpt, IVIS.
- Nicol, CJ, Davidson, HPD, Harris, PA, Waters, AJ and Wilson, AD (2002). Study of crib-biting and gastric inflammation and ulceration in young horses. *Vet. Rec.* **151**(22): 658-662.
- Nicolson, N, Storms, C, Ponds, R and Sulon, J (1997). Salivary cortisol levels and stress reactivity in human aging. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* **52**(2): M68-75.
- Ninomiya, S and Sato, S (2009). Does a picture of a peer's face decrease isolation stress in cows? *the 43rd Congress of the International Society for Applied Ethology, Cairns, Queensland, Australia.*
- Nordmann, EM, Keil, NM, Schmied, C, Graml, C, Aschwanden, J, Palme, R and Waiblinger, S (2010). Feed barrier design affects behaviour and adrenocortical activity of goats. *The 44th Congress of the International Society for Applied Ethology, Uppsala, Sweden.*
- Normando, S, Meers, L, Samuels, WE, Faustini, M and Ödberg, FO (2011). Variables affecting the prevalence of behavioural problems in horses. Can riding style and other management factors be significant? *Appl. Amin. Behav. Sci.* **133**(3-4): 186-198.
- Ödberg, F (1978). Abnormal behaviours (stereotypies), Introduction to the Round Table. *Proceedings of the First World Congress of Ethology Applied to Zootechnics, Madrid.*
- Ödberg, F (1987). Chronic stress in riding horses. *Equine Vet. J.*(18): 268-289.
- Ödberg, F and Bouissou, MF (1999). The development of equestrianism from the baroque period to the present day and its consequences for the welfare of horses. *Equine Vet. J.* **28**: 26-30.
- Oostindjer, M, Bolhuis, JE, van den Brand, H, Roura, E and Kemp, B (2010). Prenatal flavor exposure affects growth, health and behavior of newly weaned piglets. *Physiology & Behavior* **99**(5): 579-586.
- Oostindjer, M, van den Brand, H, Kemp, B and Bolhuis, JE (2011). Effects of environmental enrichment and loose housing of lactating sows on piglet behaviour before and after weaning. *Appl. Amin. Behav. Sci.* **134**(1-2): 31-41.

- Oskis, A, Loveday, C, Hucklebridge, F, Thorn, L and Clow, A (2009). Diurnal patterns of salivary cortisol across the adolescent period in healthy females. *Psychoneuroendocrinology* **34**(3): 307-316.
- Pardon, M-C and Rattray, I (2008). What do we know about the long-term consequences of stress on ageing and the progression of age-related neurodegenerative disorders? *Neurosci. Biobehav. Rev.* **32**(6): 1103-1120.
- Parker, KJ and Maestripieri, D (2011). Identifying key features of early stressful experiences that produce stress vulnerability and resilience in primates. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **35**(7): 1466-1483.
- Peeters, M (2006). *Appréciation comportementale et physiologique du niveau de stress chez les chevaux domestiques (Equus caballus) hospitalisés*. Licence Mémoire de fin de licence, ULG.
- Peeters, M, Péters, F, Sulon, J, Sandersen, C, Poncin, P, Serteyn, D and Vandenheede, M (2008). Behavioural and physiological assessment of stress level in hospitalised horses: correlation between parameters. *The 42nd Congress of the International Society for Applied Ethology, UCD in Dublin*.
- Peeters, M, Sulon, J, Beckers, JF, Ledoux, D and Vandenheede, M (2009). Comparison between blood serum and salivary cortisol levels in horses (*Equus caballus*) using an ACTH challenge. *The 43rd Congress of the International Society for Applied Ethology (ISAE), Cairns - Australia*.
- Peeters, M, Sulon, J, Beckers, JF, Ledoux, D and Vandenheede, M (2011). Comparison between blood serum and salivary cortisol concentrations in horses using an adrenocorticotrophic hormone challenge. *Equine Vet. J.* **43**(4): 487-493.
- Peeters, M, Sulon, J, Serteyn, D and Vandenheede, M (2010). Assessment of stress level in horses during competition using salivary cortisol: preliminary studies. *Journal of Veterinary Behavior: Clinical Applications and Research* **5**(4): 216.
- Pell, SM and McGreevy, PD (1999). A study of cortisol and beta-endorphin levels in stereotypic and normal Thoroughbreds. *Appl. Amin. Behav. Sci.* **64**(2): 81-90.
- Phillips (2009). *The Welfare Of Animal: The Silent Majority*.
- Plaisant, O, Srivastava, S, Mendelsohn, GA, Debray, Q and John, OP (2005). Relations entre le Big Five Inventory français et le manuel diagnostique des troubles mentaux dans un échantillon clinique français. *Annales Médico-psychologiques, revue psychiatrique* **163**(2): 161-167.
- Pottinger, TG (2000). Genetic Selection to Reduce Stress in Animals. The Biology of Animal Stress. G. P. Moberg and J. A. Mench, CAB International: pp. 291-308.
- Ramos, A and Mormède, P (1998). Stress and emotionality: a multidimensional and genetic approach. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **22**(1): 33-57.
- Rehbinder, C and Hau, J (2006). Quantification of cortisol, cortisol immunoreactive metabolites, and immunoglobulin A in serum, saliva, urine, and feces for noninvasive assessment of stress in reindeer. *Can. J. Vet. Res.* **70**(2): 151-154.
- Riad-Fahmy, D, Read, GF, Walker, RF and Griffiths, K (1982). Steroids in Saliva for Assessing Endocrine Function. *Endocr. Rev.* **3**(4): 367-395.
- Rietmann, TR, Stauffacher, M, Bernasconi, P, Auer, JA and Weishaupt, MA (2004a). The Association between Heart Rate, Heart Rate Variability, Endocrine and Behavioural Pain Measures in Horses Suffering from Laminitis*. *Journal of Veterinary Medicine Series A* **51**(5): 218-225.
- Rietmann, TR, Stuart, AEA, Bernasconi, P, Stauffacher, M, Auer, JA and Weishaupt, MA (2004b). Assessment of mental stress in warmblood horses: heart rate variability in comparison to heart rate and selected behavioural parameters. *Appl. Amin. Behav. Sci.* **88**(1-2): 121-136.

- Rohleder, N and Kirschbaum, C (2006). The hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis in habitual smokers. *Int. J. Psychophysiol.* **59**(3): 236-243.
- Roy, MP, Kirschbaum, C and Steptoe, A (2001). Psychological, cardiovascular, and metabolic correlates of individual differences in cortisol stress recovery in young men. *Psychoneuroendocrinology* **26**(4): 375-391.
- Rushen, J (1986). Some problems with the physiological concept of 'stress'. *Aust. Vet. J.* **63**(11): 359-361.
- Rushen, J (1991). Problems associated with the interpretation of physiological data in the assessment of animal welfare. *Appl. Amin. Behav. Sci.* **28**(4): 381-386.
- Rushen, J (2000). Some issues in the Interpretation of Behavioural Responses to Stress. The Biology of Animal Stress. G. P. Moberg and J. A. Mench, CAB International: pp. 23-42.
- Rushen, J, Munksgaard, L, Marnet, PG and DePassillé, AM (2001). Human contact and the effects of acute stress on cows at milking. *Appl. Amin. Behav. Sci.* **73**(1): 1-14.
- Rushen, J, Taylor, AA and de Passille, AM (1999). Domestic animals' fear of humans and its effect on their welfare. *Appl. Amin. Behav. Sci.* **65**(3): 285-303.
- Salvador, A (2005). Coping with competitive situations in humans. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **29**(1): 195-205.
- Sapolsky, RM (2002). Endocrinology of the stress response. Behavioral Endocrinology. J. B. Beckers, M. Breedlove, D. Crews and M. M. McCarthy. London, UK, MIT press.
- Schmidt, A, Biau, S, Möstl, E, Becker-Birck, M, Morillon, B, Aurich, J, Faure, JM and Aurich, C (2010a). Changes in cortisol release and heart rate variability in sport horses during long-distance road transport. *Domest. Anim. Endocrinol.* **38**(3): 179-189.
- Schmidt, A, Mostl, E, Aurich, J, Neuhauser, S and Aurich, C (2009). Comparison of cortisol and cortisone levels in blood plasma and saliva and cortisol metabolite concentrations in feces for stress analysis in horses. *5th International Equitation Science Conference Sydney - Australia*.
- Schmidt, A, Möstl, E, Wehnert, C, Aurich, J, Müller, J and Aurich, C (2010b). Cortisol release and heart rate variability in horses during road transport. *Horm. Behav.* **57**(2): 209-215.
- Seaman, SC, Davidson, HPB and Waran, NK (2002). How reliable is temperament assessment in the domestic horse (*Equus caballus*)? *Appl. Amin. Behav. Sci.* **78**(2-4): 175-191.
- Selye, H (1935). A syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature* **138**: 32-33.
- Selye, H (1956). The stress of life. New York, McGraw-Hill.
- Selye, H (1973). The evolution of stress concept. *Am. Sci.* **61**: 692-699.
- Selye, H (1975). Confusion and controversy in the stress field. *J. Human Stress* **1**: 37-44.
- Siiteri, P, Murai, J, Hammond, G, Nisker, J, Raymoure, W and Kuhn, R (1982). The serum transport of steroid hormones. *Recent Prog. Horm. Res.* **38**: 457-510.
- Solomon, GF and Moos, RH (1964). Emotions, immunity, and disease: a speculative theoretical integration. *Arch. Gen. Psychiatry* **11**: 657-674.
- Søndergaard, E and Ladewig, J (2004). Group housing exerts a positive effect on the behaviour of young horses during training. *Appl. Amin. Behav. Sci.* **87**(1-2): 105-118.
- Spangberg, A and Malmkvist, J (2010). Influence of fibre in diet on mating behaviour and reproductive success in female farmed mink. *The 44th Congress of the International Society for Applied Ethology, Uppsala, Sweden*.
- Sporer, KRB, Xiao, L, Tempelman, RJ, Burton, JL, Earley, B and Crowe, MA (2008). Transportation stress alters the circulating steroid environment and neutrophil gene expression in beef bulls. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **121**(3-4): 300-320.

- Ssewanyana, E, Lincoln, GA, Linton, EA and al., e (1990). Regulation of the seasonal cycle of beta-endorphin and ACTH secretion into the peripheral blood of rams. *J. Endocrinol.* **124**: 443-454.
- Stewart, ID, Woolliams, JA and Brotherstone, S (2010). Genetic evaluation of horses for performance in dressage competitions in Great Britain. *Livestock Science* **128**(1-3): 36-45.
- Strahler, J, Berndt, C, Kirschbaum, C and Rohleder, N (2010). Aging diurnal rhythms and chronic stress: Distinct alteration of diurnal rhythmicity of salivary α -amylase and cortisol. *Biol. Psychol.* **84**(2): 248-256.
- Sulon, J (1981). *Dosage radioimmunologique des principaux corticostéroïdes synthétisés par la zone fasciculées du cortex surrénalien humain. Mise au point et étude critique.* Docteur en Sciences Biomédicales expérimentales, Université de Liège.
- Szabo, S, Barth, K, Graml, C, Futschik, A, Palme, R and Waiblinger, S (2010). Grouping after parturition in presence of kids reduces stress in young dairy goats. *The 44th Congress of the International Society for Applied Ethology, Uppsala, Sweden.*
- Szenci, O, Karen, A, Bajcsy, ÁC, Gáspárdy, A, de Sousa, NM and Beckers, JF (2011). Effect of restraint stress on plasma concentrations of cortisol, progesterone and pregnancy associated-glycoprotein-1 in pregnant heifers during late embryonic development. *Theriogenology* **76**(8): 1380-1385.
- Taylor, PM (1998). Effects of surgery on endocrine and metabolic responses to anaesthesia in horses and ponies. *Res. Vet. Sci.* **64**(2): 133-140.
- Thorén Hellsten, E, Viklund, Å, Koenen, EPC, Ricard, A, Bruns, E and Philipsson, J (2006). Review of genetic parameters estimated at stallion and young horse performance tests and their correlations with later results in dressage and show-jumping competition. *Livestock Science* **103**(1-2): 1-12.
- Toates, F (2000). Multiple Factors Controlling Behaviour: Implication for Stress and Welfare. *The Biology of Animal Stress*. G. P. Moberg and J. A. Mench, CAB International: pp. 199-226.
- Touitou, Y (2006). Synchronisation et désynchronisation de l'horloge biologique chez l'homme. *L'Encéphale* **32**(cahier 2): 834-839.
- Toutain, PL, Oukessou, M, Autefage, A and Alvinerie, M (1988). Diurnal and episodic variations of plasma hydrocortisone concentrations in horses. *Domest. Anim. Endocrinol.* **5**(1): 55-59.
- van der Kolk, JH, Nachreiner, RF, Schott, HC, Refsal, KR and Zanella, AJ (2001). Salivary and plasma concentration of cortisol in normal horses and horses with Cushing's disease. *Equine Vet. J.* **33**(2): 211-213.
- van Eck, M, Berkhof, H, Nicolson, N and Sulon, J (1996a). The effects of perceived stress, traits, mood states, and stressful daily events on salivary cortisol. *Psychosom Med.* **58**(5): 447-458.
- van Eck, M, Nicolson, NA, Berkhof, H and Sulon, J (1996b). Individual differences in cortisol responses to a laboratory speech task and their relationship to responses to stressful daily events. *Biol. Psychol.* **43**(1): 69-84.
- Vandenheede, M (1996). *Les réactions comportementales de peur chez les ovins domestiques: quantification, influence des androgènes et de facteurs environnementaux.* Thèse de doctorat, Université de Liège.
- Vandenheede, M (2003). Bien-être animal : les apports de l'Ethologie. *Ann. Méd. Vét.* **147**: 17-22.
- Vaughan, W, Sullivan, JC and Elmadjian, F (1949). Immunity and schizophrenia. *Psychosom. Med.* **11**: 327-333.
- Veissier, I and Boissy, A (2007). Stress and welfare: Two complementary concepts that are intrinsically related to the animal's point of view. *Physiol. Behav.* **92**(3): 429-433.

- Viérin, M, Bouissou, MF, Vandenheede, M, Trillaud-Geyl, C and Arnaud, G (1998). Développement d'une méthodologie destinée à mesurer les réactions de peur chez le cheval. *24ème journée d'étude de l'Institut du Cheval, Paris (France)*.
- Vincent, IC and Michell, AR (1992). Comparison of cortisol concentrations in saliva and plasma of dog. *Res. Vet. Sci.* **53**: 342-345.
- Visser, EK, Ellis, AD and Van Reenen, CG (2008a). The effect of two different housing conditions on the welfare of young horses stabled for the first time. *Appl. Amin. Behav. Sci.* **114**(3-4): 521-533.
- Visser, EK, Reenen, CGV, Rundgren, M, Zetterqvist, M, Morgan, K and Blokhuis, HJ (2003a). Responses of horses in behavioural tests correlate with temperament assessed by riders. *Equine Vet. J.* **35**(2): 176-183.
- Visser, EK, Van Reenen, CG, Blokhuis, MZ, Morgan, EKM, Hassmén, P, Rundgren, TMM and Blokhuis, HJ (2008b). Does Horse Temperament Influence Horse–Rider Cooperation? *Journal of Applied Animal Welfare Science* **11**(3): 267-284.
- Visser, EK, Van Reenen, CG, Engel, B, Schilder, MBH, Barneveld, A and Blokhuis, HJ (2003b). The association between performance in show-jumping and personality traits earlier in life. *Appl. Amin. Behav. Sci.* **82**(4): 279-295.
- Visser, EK, van Reenen, CG, Hopster, H, Schilder, MBH, Knaap, JH, Barneveld, A and Blokhuis, HJ (2001). Quantifying aspects of young horses' temperament: consistency of behavioural variables. *Appl. Amin. Behav. Sci.* **74**(4): 241-258.
- Visser, EK, van Reenen, CG, van der Werf, JTN, Schilder, MBH, Knaap, JH, Barneveld, A and Blokhuis, HJ (2002). Heart rate and heart rate variability during a novel object test and a handling test in young horses. *Physiol. Behav.* **76**(2): 289-296.
- von Borell, E, Langbein, J, Després, G, Hansen, S, Leterrier, C, Marchant-Forde, J, Marchant-Forde, R, Minero, M, Mohr, E, Prunier, A, Valance, D and Veissier, I (2007). Heart rate variability as a measure of autonomic regulation of cardiac activity for assessing stress and welfare in farm animals -- A review. *Physiol. Behav.* **92**(3): 293-316.
- von Borstel, UU, Duncan, IJH, Shoveller, AK, Merkies, K, Keeling, LJ and Millman, ST (2009). Impact of riding in a coercively obtained Rollkur posture on welfare and fear of performance horses. *Appl. Amin. Behav. Sci.* **116**(2-4): 228-236.
- Walesby, HA and Blackmer, JM (2003). How to Use the Transverse Facial Venous Sinus as an Alternative Location for Blood Collection in the Horse. *49th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners, New Orleans, Louisiana*.
- Walker, RF, Riad-Fahmy, D and Read, GF (1978). Adrenal status assessed by direct radioimmunoassay of cortisol in whole saliva or parotid saliva. *Clin. Chem.* **24**(9): 1460-1463.
- Welp, T, Rushen, J, Kramer, DL, Festa-Bianchet, M and de Passillé, AMB (2004). Vigilance as a measure of fear in dairy cattle. *Appl. Amin. Behav. Sci.* **87**(1-2): 1-13.
- Werhahn, H, Hessel, EF and Van den Weghe, HFA (2011). Competition Horses Housed in Single Stalls (II): Effects of Free Exercise on the Behavior in the Stable, the Behavior during Training, and the Degree of Stress. *J. Equine Vet. Sci.* (in press).
- Wickens, CL and Heleski, CR (2010). Crib-biting behavior in horses: A review. *Appl. Amin. Behav. Sci.* **128**(1-4): 1-9.
- Wiepkema, PR (1993). Stress and animal welfare. *Animal Welfare* **2**(3): 195-218.
- Wikipédia. (2011). <http://en.wikipedia.org/wiki/Wikipedia> (as of November 2011).
- Williams, L and Warren-Smith, A (2009). Conflict responses exhibited by dressage horses during competition. *5th Conference of International Society for Equitation Science, Sydney - Australia*.

[202]

Wolf, JM, Nicholls, E and Chen, E (2008). Chronic stress, salivary cortisol, and [alpha]-amylase in children with asthma and healthy children. *Biol. Psychol.* **78**(1): 20-28.

Wolff, A, Hausberger, M and Le Scolan, N (1997). Experimental tests to assess emotionality in horses. *Behav. Processes* **40**(3): 209-221.

Wolframm, I, Shearman, J and Micklewright, D (2009). A preliminary investigation into the mood states of advanced and novice dressage riders prior to competition. *The 5th International Conference of Equitation Science, Sydney*.

Wolframm, IA, Baars, C and Schuetz, S (2011a). Improving horse-rider communication through groundwork training programs. *Journal of Veterinary Behavior: Clinical Applications and Research* **6**(5): 297-298.

Wolframm, IA, Foshag, JS and Kobbe, C (2011b). The use of psychological skills in novice, intermediate and advanced equestrian riders. *Journal of Veterinary Behavior: Clinical Applications and Research* **6**(5): 299.

Wolframm, IA and Micklewright, D (2010a). Rider anxiety, perception of equine temperament and ridden performance: do they relate? *Journal of Veterinary Behavior: Clinical Applications and Research* **5**(4): 210.

Wolframm, IA, Shearman, J and Micklewright, D (2010b). A preliminary investigation into mood states of advanced and novice dressage riders prior to competition. *Journal of Veterinary Behavior: Clinical Applications and Research* **5**(4): 211.

