



44^{ème} Journée de la Recherche Équine
Jeudi 15 mars 2018

Que nous indiquent les hormones de stress ? Différentes mesures de cortisol indiquent un niveau plus faible chez des chevaux dont le bien-être est altéré

J. Pawluski¹, P. Rupert², S. Henry³, P. Jegou³, C. Coste⁴, M. Hausberger⁴

¹ Institut de Recherche en santé, environnement et travail (Irset), U1085 INSERM, Université de Rennes 1, Campus Santé, Villejean, 35000 Rennes

² Université de Médecine Vétérinaire, Dept des Sciences biomédicales, Vienne, Autriche

³ Université de Rennes 1, Laboratoire d'Éthologie animale et humaine, UMR 6552, CNRS-Université de Caen-Normandie, Station Biologique, 35380 Paimpont

⁴ CNRS, Laboratoire d'Éthologie animale et humaine, UMR 6552, Université de Rennes 1, Université de Caen-Normandie, Station Biologique, 35380 Paimpont

Résumé

Évaluer l'état de stress d'un cheval est un besoin récurrent, soit pour comparer des individus dans les mêmes situations (caractéristiques individuelles), soit pour évaluer l'impact des situations dans lesquelles l'animal doit évoluer. Le cortisol est généralement considéré comme l'hormone de stress par excellence, car son taux augmente lors de stress aigu. Cependant, le bien-être correspond à un état chronique qui peut être altéré quand l'individu se trouve confronté à des stress de façon répétée. Cinquante neuf chevaux répartis dans trois centres équestres avec un hébergement majoritaire en box isolé ont été observés. Les résultats montrent que les chevaux dont le bien-être était altéré avaient aussi les taux les plus faibles de cortisol, qu'il s'agisse de cortisol sanguin ou fécal (mesure plus intégrative à partir des crottins, mise au point à l'université vétérinaire de Vienne). Ces résultats pourraient s'expliquer par une usure du système face à des conditions de vie amenant à un stress suffisamment long et intense et montrent que l'évaluation du bien-être ne peut pas s'appuyer uniquement sur cette simple mesure physiologique.

Mots clés : cheval, bien-être, cortisol, mesures physiologiques

Summary

Assessment of stress in horses is necessary either for comparing individuals or for evaluating the impact of the situations offered to the animal. Cortisol is generally considered as THE stress hormone as its level clearly increases during acute stress. However the welfare state corresponds to a chronic state. The aim of the present study was to determine how measures of compromised welfare, such as chronic pain and haematological anomalies, related to cortisol levels in domestic horses (*Equus caballus*). The present study used fifty-nine horses from three riding centres with single stall housing. The primary findings show that the horses whose welfare was clearly compromised also had lower levels of both FCM and plasma cortisol. This work extends our previous findings showing that withdrawn postures, indicators of depressive-like state in horses, are associated with lower plasma cortisol levels. This study indicates that cortisol level can not be used as a reliable indicator of chronic stress. Welfare assessment can not be relied only upon this simple physiological measure which may be erroneously interpreted.

Key-words: horse, welfare, cortisol, physiological measurements



Introduction

Le cortisol est généralement considéré comme l'« hormone de stress » par excellence. En effet, un stress aigu (peur soudaine par ex) engendre une activation de l'axe hypothalamo-hypophysaire qui génère une augmentation rapide du cortisol, comme en témoignent les mesures plasmatiques ou salivaires chez diverses espèces dont l'homme. Il s'agit de fait d'un mécanisme d'adaptation qui permet d'avoir les réponses appropriées aux événements et de revenir à un état d'équilibre (ex : Mormède *et al* 2007). Une telle hormone permet donc de rétablir ou maintenir l'homéostasie. On peut cependant se demander si la répétition de stress intenses et/ou prolongés ne peut pas altérer cette capacité d'adaptation de l'organisme, et donc les réponses physiologiques.

De fait, le lien entre cortisol et état de stress chronique ou de mal-être est loin d'être clair. Les études menées jusqu'ici sont souvent contradictoires, y compris chez l'homme. Certaines indiquent qu'il n'y a pas de lien, d'autres indiquent une augmentation ou une baisse des taux de cortisol lors de stress chroniques. Il s'agit cependant le plus souvent d'études expérimentales (où les types de stress et leur durée peuvent varier) et peu d'entre elles font le lien entre les effets des conditions de vie habituelles (incluant des facteurs comme par exemple l'hébergement ou la vie sociale) sur l'état de bien-être des individus et leur taux de cortisol. Le cortisol peut-il toujours être considéré comme un indicateur physiologique fiable dans le cas de stress chronique issu de la vie quotidienne ?

La question de l'évaluation du bien-être est cruciale pour tenter d'identifier les meilleures pratiques de gestion et améliorer les performances des chevaux (ex : Benhajali *et al* 2010, Lesimple *et al.* 2015). Des indicateurs comportementaux et posturaux ont été identifiés mais ils nécessitent un temps minimum d'observation des chevaux (ex : Fureix *et al.* 2010). Il paraît tentant d'utiliser une mesure physiologique simple pour avoir une évaluation rapide à partir d'une simple prise de sang, comme cela a parfois été proposé pour d'autres espèces domestiques. Le cheval domestique est un animal intéressant pour tester une telle question, car il est souvent maintenu dans des conditions de restriction spatiale, sociale (boxes individuels) et alimentaire connues pour en altérer le bien-être (ex : Lesimple *et al* 2015). Il partage aussi avec l'homme le fait de travailler, ce travail quotidien pouvant aussi avoir des conséquences physiques et « psychologiques » (ex : Lesimple *et al* 2011).

1 Méthodes

Les méthodes sont décrites de façon extensive dans Pawluski *et al* (2017).

Cinquante-neuf chevaux (44 hongres et 15 juments, de races variables, âgés de 5 à 20 ans : $\bar{X} = 11,9 \pm 3,5$), répartis dans 3 centres équestres, ont été testés. Les activités et conditions de vie étaient similaires dans les 3 centres: hébergement individuel en boxes paillés de 3x3m, repas de granules 3 fois par jour et foin une fois par jour. Les chevaux travaillaient 4 à 12 heures par semaine et avaient un jour de sortie au moins par semaine. Les leçons d'équitation allaient du niveau débutant à des cavaliers plus confirmés.

Les prélèvements sanguins (printemps-été 2007) ont été réalisés à l'encolure. 7 ml de sang ont été collectés dans des tubes héparinisés (BD Vacutainer®). Les échantillons ont été conservés dans de la glace jusqu'à centrifugation (maximum 15 minutes plus tard), puis le plasma a été placé sur de la glace sèche et conserve à -20°C. Le sang a été prélevé 3 fois pour chaque sujet: 1 fois entre 18:00 et 19:00 après une journée de travail, une fois entre 18:00 et 19:00 après une journée de repos et une fois entre 08:00 et 09:00 (environ une heure après le premier repas de granulés). Les taux de cortisol plasmatique ont été mesurés en utilisant des kits Immunotech (Beckmann and Coulter) et en les adaptant pour les chevaux (cf Fureix *et al* 2012).

Les échantillons fécaux ont été collectés dans la minute suivant la défécation sur la litière par l'expérimentateur portant des gants stériles. Les prélèvements ont été effectués entre 12:00 et 13:00, 3 fois par cheval: 2 fois 24h après une journée de travail et une fois après une journée de repos. Les échantillons ont été congelés à -20°C. Les fèces ont été extraites puis analysées en utilisant un 11-oxoetiocholanolone enzyme immunoassay (EIA) (Palme *et Möstl* 2005). Les augmentations de cortisol plasmatique apparaissent dans les fèces après environ 24h et représentent l'activité intégrée de l'axe HPA. Les deux mesures après travail ont été moyennées.

L'évaluation du bien-être a été basée sur des indicateurs validés, comme la position d'oreilles (en alimentation, Fureix *et al* 2010, Henry *et al.* 2016), les problèmes de dos (ex: Lesimple *et al.* 2010) et la formule sanguine qui peut révéler des problèmes, d'anémie en particulier (Hausberger *et al.* 2016). 1) Les positions d'oreilles ont été mesurées conformément à Lesimple *et al.* (2016a, b): la position était notée toute les 15 minutes sur deux jours de repos au box, alors que le cheval mangeait son foin jusqu'à obtenir 10 données (position en avant ou en arrière: pointe des oreilles vers l'avant ou l'arrière respectivement avec un



angle de plus de 30°/perpendiculaire; sur le côté: perpendiculaire à l'axe tête-croupe). Les observations étaient faites quand les écuries étaient calmes (pas de vent, de personnes...) entre 14:00 et 17:00. 2) les problèmes de dos ont été évalués par examen par deux praticiens (94% agrément), comme dans Lesimple et al (2011) et ont consisté en palpation manuelle réalisée dans le box alors que le cheval était légèrement tenu. 3) les données hématologiques ont été obtenues à partir des prélèvements sanguins réalisés pour le cortisol le matin, puis analysées dans l'heure qui suivait au Laboratoire Vétérinaire Départemental Ille et Vilaine, Rennes, France). Les données (globules rouges et blancs en millions / mm³, plaquettes en mille / mm³, pourcentages de neutrophiles, eosinophiles, basophiles, lymphocytes, monocytes, hématocrites et hémoglobine en g/100ml, et leurs ratios) ont été comparées aux normes fournies par ce laboratoire. 4) une évaluation globale a été mesurée en séparant les chevaux à bien-être altéré (au moins 3 sur 4 des mesures de mal-être) de ceux au bien-être "normal".

2 Résultats

Comme attendu, les concentrations de cortisol plasmatique étaient plus faibles le soir, sans différence entre jour de travail ou de repos (au box) (N = 55-56, respectivement = 6,91, df=55, and t = 8,7, df =54, p < 0,00001). Les niveaux moyens le soir étaient corrélés avec les mesures fécales (N=55, r=0,66, p<0,0001). Aucun effet de l'âge ou du sexe n'est apparu (p>0,68).

En moyenne, les chevaux avaient les oreilles en arrière 53,4 % (± 24,0, 0-100) des scans et 52% of horses avaient les oreilles en arrière plus de 50% du temps d'observation. Ces chevaux avaient des mesures de cortisol fécal plus faibles que ceux avec une position en avant majoritaire (F(1, 48)=4,48, p=.04, OrAv N=19, OrAr, N=31). Le pourcentage de temps passé par les chevaux les oreilles en arrière était négativement corrélé avec les mesures fécales après travail et les mesures plasmatiques du soir (FCM N = 59, r = -0,29, p = 0,02; plasma cort, N=55, r=-0,28, p=0,04).

Les mesures de l'état du dos ont indiqué, en accord avec la littérature, que la plupart des chevaux étaient sérieusement atteints (n = 40, 73%) (Chi-square test, N = 55, df = 2, χ^2 = 38,44, p < 0,001). Ces chevaux avaient des niveaux de cortisol plasmatique du soir (après travail et repos, mais pas fécal) plus faibles que les chevaux non atteints ou moins sévèrement atteints (F(1,53)=5,34, p=0,02).

Les données hématologiques ont montré que 18% des chevaux souffraient d'anémie et 35% avaient des taux de neutrophils anormaux. Les chevaux anémiés avaient des concentrations de cortisol plasmatique du soir plus faibles que les chevaux non anémiés (F(1,53)=5,8, p=0,02) et une tendance à avoir aussi des mesures fécales plus basses (p=0,06). Les chevaux avec des taux anormalement élevés de neutrophiles avaient également des niveaux de cortisol fécal plus bas (F(1,52)=5,1, p=0,03; Fig. 3C).

Enfin, les chevaux au bien-être globalement plus altéré (sur 3 au moins des 4 indicateurs) avaient un taux de cortisol fécal et plasmatique du soir moyens plus faibles que les autres chevaux (FCM – F(1,27)=5,02, p=0,03; plasma – F(1,28)=13,1, p=0,001). Ces mesures ne différaient pas après une journée de travail ou de repos au box. Les taux matinaux de cortisol n'étaient corrélés à aucune mesure de bien-être.

3 Discussion

Les résultats montrent 1) que les taux de cortisol sont plus faibles et fiables le soir que le matin, 2) que les taux obtenus par voie sanguine et les mesures fécales sont corrélées, et que donc les variations observées entre individus sont fiables, 3) et surtout qu'il y a un lien direct entre état de mal-être et un taux bas de cortisol. Ainsi, quand on considère les taux de cortisol du soir ainsi que les estimations à partir des fèces, on observe que 1) plus leur taux de cortisol est bas, plus les chevaux passent de temps avec les oreilles en arrière (indicateur d'inconfort); 2) que des taux de cortisol bas s'observent chez les chevaux avec des problèmes sanitaires comme problèmes de dos, anémie, taux anormaux de neutrophiles; 3) que ceci se confirme quand on considère un indice global de mal-être. Ces résultats vont dans le même sens que des observations précédentes qui avaient révélé un taux anormalement bas de cortisol chez des chevaux présentant un syndrome « dépressif » (Fureix et al 2012).

Certains auteurs ont suggéré que des stress chroniques induisent une « surcharge allostatique » (ex : Mc Ewen & Wingfield 2003). Les médiateurs d'allostase, comme le cortisol, sont produits en réponse aux stress occasionnels pour faciliter l'adaptation et sont donc des éléments positifs (ex : Mateo 2008). Mais si le stress est suffisamment long et intense, cette « surcharge » peut amener à une usure du système, amenant à une incapacité des systèmes physiologiques à répondre aux besoins d'adaptation. Cette « usure » s'illustre bien avec les chevaux « dépressifs » qui montrent une attitude apathique, combinant périodes d'immobilité, prostration et absence de réactivité à l'environnement. Un tel mécanisme pourrait expliquer aussi les taux de



cortisol bas observés chez des personnes en burn-out ou présentant des douleurs de dos chroniques. Chez l'homme, on considère qu'il pourrait s'agir d'un mécanisme amenant au développement de pathologies.

En conclusion, le cortisol : hormone de stress ou de bien-être ? Les deux bien sûr puisque le stress, quand il est modéré et ponctuel, stimule l'adaptation. Par contre, il est urgent de revisiter ce concept du cortisol comme indicateur absolu de stress. La relation entre cortisol et bien-être n'est pas linéaire : comme pour beaucoup d'autres indicateurs, c'est l'équilibre qui compte. C'est donc un potentiel « faux-ami » : beaucoup de cortisol ne signifie pas mal-être, peu de cortisol ne signifie pas bien-être et pourrait même au contraire indiquer un état dont il faut s'inquiéter...

Remerciements

Les auteurs remercient les responsables des centres équestres et leur personnel pour l'accès aux chevaux et leur aide, C. Fureix, A. Bruchet, L. Dupont et C. Lavertue de l'Université de Rennes 1 et E Klobetz-Rassam de l'University of Veterinary Medicine, Vienna, pour leur importante contribution et la Caisse Centrale de la Mutualité Sociale Agricole pour avoir financé cette étude.

Références

- Benhajali, H., Richard-Yris, M.-A., Ezzaouia, M., Charfi, F., Gautier, E., Hausberger, M. (2010). Stéréotypies chez les chevaux domestiques : des corrélats inattendus avec la reproduction, les capacités cognitives et les conditions de travail. In : 36^{ème} Journée de la Recherche Equine. Paris : Institut français du cheval et de l'équitation, 133-139.
- Fureix, C., Jegou, P., Coste, C., Hausberger, M. (2010). Indicateurs de bien-être/mal-être chez le cheval : une synthèse. In : 36^e Journée de la Recherche Equine. Paris : Institut Français du Cheval et de l'Equitation, 1-11.
- Fureix C, Jegou P, Henry S, Lansade L, Hausberger M. (2012). Towards an ethological animal model of depression? A study on horses. PLoS One, 7, e39280.
- Hausberger, M., Fureix C, Lesimple C. (2016) Detecting horses' sickness: in search of visible signs. Applied Animal Behaviour Science 175, 41-9.
- Hausberger, M., Rochais, C., Henry, S., Stomp, C., Lesimple, C., Cousillas, H. (2016). Quand le cheval va bien : état des lieux sur les indicateurs de bien-être. In : 42^{ème} journées de la Recherche Equine. Paris : Institut Français du Cheval et de l'Equitation. Journées de la Recherche Equine, 69-78.
- Lesimple, C., Fureix, C., Menguy, H., Richard-Yris, M.-A., Hausberger, M. (2011). Relations entre attitude au travail, problèmes vertébraux et relation à l'homme chez le cheval. In : 37^e Journée de la Recherche Equine. Paris : Institut Français du Cheval et de l'Equitation, 23-32.
- Lesimple, C., Poissonnet, A., Hausberger, M. (2015). Bien-être et facteurs d'influence : une étude épidémiologique. In : 41^e Journée de la Recherche Equine. Paris : Les Haras Nationaux/INRA/Institut français du cheval et de l'équitation, 5-14.
- Lesimple C, Poissonnet A, Hausberger M. (2016). How to keep your horse safe? An epidemiological study about management practices. Applied Animal Behaviour Science.
- Mateo JM. (2008). Inverted-U shape relationship between cortisol and learning in ground squirrels. Neurobiology of Learning and Memory, 89, 582-90.
- McEwen BS, Wingfield JC. (2003). The concept of allostasis in biology and biomedicine. Hormones and Behavior, 43, 2-15.
- Mormede P, Andanson S, Auperin B, Beerda B, Guemene D, Malmkvist J, *et al.* (2007). Exploration of the hypothalamic-pituitary-adrenal function as a tool to evaluate animal welfare. Physiology & Behavior, 92, 317-39.
- Palme R, Rettenbacher S, Touma C, El-Bahr S, Möstl E. (2005). Stress hormones in mammals and birds: Comparative aspects regarding metabolism, excretion and noninvasive measurement in fecal samples. Annals New York Acad Sci., 1040, 162-71.
- Pawluski J, Jegou P, Henry S, Bruchet A, Palme R., Coste, C., Hausberger, M. (2017). Low plasma cortisol and fecal cortisol metabolite measures as indicators of compromised welfare in domestic horses (*Equus caballus*). PLOS ONE 12(9): e0182257. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182257>