

**CAMPUS VÉTÉRINAIRE DE LYON**

Année 2022 - Thèse n° 037

**ETUDE DE L'EXPRESSION FACIALE DE LA VACHE LAITIÈRE  
DANS DIFFÉRENTES SITUATIONS DOULOUREUSES**

**THÈSE**

Présentée à l'Université Claude Bernard Lyon 1  
(Médecine – Pharmacie)

Et soutenue publiquement le 15 septembre 2022  
Pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire

Par

BOROT Maëliiss



## **CAMPUS VÉTÉRINAIRE DE LYON**

Année 2022 - Thèse n° 037

# **ETUDE DE L'EXPRESSION FACIALE DE LA VACHE LAITIÈRE DANS DIFFÉRENTES SITUATIONS DOULOUREUSES**

## **THÈSE**

Présentée à l'Université Claude Bernard Lyon 1  
(Médecine – Pharmacie)

Et soutenue publiquement le 15 septembre 2022  
Pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire

Par

**BOROT Maëli**



## LISTE DES ENSEIGNANTS DU CAMPUS VETERINAIRE DE LYON (26-01-2022)

Mme	ABITBOL	Marie	Professeur
M.	ALVES-DE-OLIVEIRA	Laurent	Maître de conférences
Mme	ARCANGIOLI	Marie-Anne	Professeur
Mme	AYRAL	Florence	Maître de conférences
Mme	BECKER	Claire	Maître de conférences
Mme	BELLUCO	Sara	Maître de conférences
Mme	BENAMOU-SMITH	Agnès	Maître de conférences
M.	BENOIT	Etienne	Professeur
M.	BERNY	Philippe	Professeur
Mme	BONNET-GARIN	Jeanne-Marie	Professeur
M.	BOURGOIN	Gilles	Maître de conférences
M.	BRUTO	Maxime	Maître de conférences Stagiaire
M.	BRUYERE	Pierre	Maître de conférences
M.	BUFF	Samuel	Professeur
M.	BURONFOSSE	Thierry	Professeur
M.	CACHON	Thibaut	Maître de conférences
M.	CADORÉ	Jean-Luc	Professeur
Mme	CALLAIT-CARDINAL	Marie-Pierre	Professeur
M.	CHABANNE	Luc	Professeur
Mme	CHALVET-MONFRAY	Karine	Professeur
M.	CHAMEL	Gabriel	Maître de conférences
M.	CHETOT	Thomas	Maître de conférences Stagiaire
Mme	DE BOYER DES ROCHES	Alice	Maître de conférences
Mme	DELIGNETTE-MULLER	Marie-Laure	Professeur
Mme	DJELOUADJI	Zorée	Professeur
Mme	ESCRIOU	Catherine	Maître de conférences
M.	FRIKHA	Mohamed-Ridha	Maître de conférences
M.	GALIA	Wessam	Maître de conférences
M.	GILLET	Benoit	AERC
Mme	GILOT-FROMONT	Emmanuelle	Professeur
M.	GONTHIER	Alain	Maître de conférences
Mme	GREZEL	Delphine	Maître de conférences
Mme	HUGONNARD	Marine	Maître de conférences
Mme	JOSSON-SCHRAMME	Anne	Chargé d'enseignement contractuel
M.	JUNOT	Stéphane	Professeur
M.	KODJO	Angeli	Professeur
Mme	KRAFFT	Emilie	Maître de conférences
Mme	LAABERKI	Maria-Halima	Maître de conférences
Mme	LAMBERT	Véronique	Maître de conférences
Mme	LE GRAND	Dominique	Professeur
Mme	LEBLOND	Agnès	Professeur
Mme	LEDOUX	Dorothee	Maître de conférences
M.	LEFEBVRE	Sébastien	Maître de conférences
Mme	LEFRANC-POHL	Anne-Cécile	Maître de conférences
M.	LEGROS	Vincent	Maître de conférences
M.	LEPAGE	Olivier	Professeur
Mme	LOUZIER	Vanessa	Professeur
M.	LURIER	Thibaut	Maître de conférences Stagiaire
M.	MAGNIN	Mathieu	Maître de conférences Stagiaire
M.	MARCHAL	Thierry	Professeur
Mme	MOSCA	Marion	Maître de conférences
M.	MOUNIER	Luc	Professeur
Mme	PEROZ	Carole	Maître de conférences
M.	PIN	Didier	Professeur
Mme	PONCE	Frédérique	Professeur
Mme	PORTIER	Karine	Professeur
Mme	POUZOT-NEVORET	Céline	Maître de conférences
Mme	PROUILLAC	Caroline	Professeur
Mme	REMY	Denise	Professeur
Mme	RENE MARTELLET	Magalie	Maître de conférences
M.	ROGER	Thierry	Professeur
M.	SAWAYA	Serge	Maître de conférences
M.	SCHRAMME	Michael	Professeur
Mme	SERGENTET	Delphine	Professeur
M.	TORTEREAU	Antonin	Maître de conférences
Mme	VICTONI	Tatiana	Maître de conférences
M.	VIGUIER	Eric	Professeur
Mme	VIRIEUX-WATRELOT	Dorothee	Chargé d'enseignement contractuel
M.	ZENNER	Lionel	Professeur



## REMERCIEMENTS AU JURY

**A Monsieur le Professeur Jean-Stéphane DAVID,**

*De l'Université Claude Bernard Lyon 1, Faculté de médecine de Lyon,*

Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter la présidence de mon jury de thèse et pour le temps consacré à l'évaluation de ce travail.

Hommages respectueux.

**A Madame la Docteure Alice DE BOYER DES ROCHES**

*De VetAgroSup, Campus vétérinaire de Lyon,*

Pour m'avoir proposé ce sujet de thèse puis encadrée tout au long de ce travail, pour votre écoute, votre patience et tout le temps que vous m'avez consacré.

Sincères remerciements.

**A Monsieur le Docteur Thibaut LURIER**

*De VetAgroSup, Campus vétérinaire de Lyon,*

Pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse et pour l'intérêt que vous portez à mon travail.

Sincères remerciements.

**A Madame Laure GINGER**

*De VetAgroSup, Campus vétérinaire de Lyon,*

Pour m'avoir encadrée, aidée et encouragée tout au long de ce travail.

Sincères remerciements.

**A Madame la Docteure Dorothée LEDOUX**

*De VetAgroSup, Campus vétérinaire de Lyon,*

Pour avoir accepté mon invitation à cette soutenance, pour l'aide apportée et pour l'intérêt que vous portez à mon travail.

Sincères remerciements.









## TABLE DES MATIERES

TABLE DES ANNEXES.....	13
TABLE DES FIGURES.....	15
TABLE DES TABLEAUX.....	17
LISTE DES ABREVIATIONS.....	19
INTRODUCTION.....	21
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE : LA DOULEUR : DEFINITION, MECANISMES, SOURCES, MANIFESTATION.....	23
<b>I. Définition</b> .....	23
<b>II. Mécanismes et physiopathologie</b> .....	24
1. Elaboration du message nociceptif et transmission au niveau périphérique.....	25
2. Modulation du message.....	26
3. Projection du message et intégration.....	26
4. Les contrôles du message nociceptif.....	26
<b>III. Sources de douleur en élevage bovin</b> .....	27
1. Locale.....	28
2. Systémique.....	30
<b>IV. Manifestation et signes de douleur chez les mammifères</b> .....	31
1. Comportement.....	32
a. Lors d'une douleur locale.....	33
b. Lors d'une douleur systémique.....	36
2. Paramètres physiologiques.....	38
a. Lors d'une douleur locale.....	38
b. Lors d'une douleur systémique.....	39
3. Paramètres zootechniques.....	40
a. Lors d'une douleur locale.....	40
b. Lors d'une douleur systémique.....	41
<b>V. Tête : expressions faciales chez les mammifères : analyse comparée</b> .....	42
1. Définition des expressions faciales.....	42
2. Modifications de ces zones lors d'un stimulus douloureux chez différentes espèces.....	43
a. Modifications des zones selon la présence/l'absence de douleur.....	44
b. Modifications des zones selon le type de douleur : locale ou systémique.....	50
PARTIE EXPERIMENTALE.....	59
<b>I. Introduction de l'étude expérimentale</b> .....	59
<b>II. Expérience 1 : Etude des expressions faciales chez les bovins laitiers lors d'inflammation localisée</b> .....	59
1. Objectif.....	59
2. Matériel et méthodes.....	59

a.	Animaux .....	59
b.	Procédures.....	60
c.	Points limites .....	62
d.	Observations .....	63
i.	<i>Paramètres biochimiques et physiologiques</i> .....	63
ii.	<i>Expressions faciales</i> .....	64
e.	Travail préliminaire sur les données brutes.....	70
f.	Analyses statistiques.....	75
i.	<i>Paramètres biochimiques et physiologiques</i> .....	75
ii.	<i>Expressions faciales</i> .....	75
3.	Résultats .....	76
a.	Paramètres biochimiques et physiologiques .....	76
b.	Expressions faciales.....	79
i.	<i>Variation de l'expression faciale avant-après épreuve</i> .....	79
ii.	<i>Résultats de l'analyse discriminante</i> .....	84
4.	Discussion.....	87
a.	Réponse physiologique et clinique .....	87
b.	Variations des expressions faciales lors de douleur .....	88
i.	<i>Région orbitaire</i> .....	88
ii.	<i>Région buccale et péribuccale</i> .....	89
iii.	<i>Région auriculaire</i> .....	90
c.	Bilan et limites de l'étude.....	90
d.	Conclusion .....	92
<b>III.</b>	<b>Expérience 2 : Etude des expressions faciales chez les bovins laitiers lors d'inflammation généralisée</b> .....	<b>93</b>
1.	Objectif .....	93
2.	Matériel et méthodes.....	93
a.	Animaux .....	93
b.	Procédures.....	94
c.	Points limites .....	96
d.	Observations .....	96
i.	<i>Paramètres biochimiques et physiologiques</i> .....	96
ii.	<i>Expressions faciales</i> .....	97
e.	Travail préliminaire sur les données brutes.....	103
f.	Analyses statistiques.....	108
i.	<i>Paramètres biochimiques et physiologiques</i> .....	108
ii.	<i>Expressions faciales</i> .....	108
3.	Résultats .....	109

a.	Paramètres biochimiques et physiologiques .....	109
b.	Expressions faciales.....	112
i.	<i>Variation de l'expression faciale avant-après épreuve</i> .....	112
ii.	<i>Résultats de l'analyse discriminante</i> .....	119
4.	Discussion.....	122
a.	Réponse physiologique et clinique .....	122
b.	Variations des expressions faciales lors de douleur .....	123
i.	<i>Région orbitaire</i> .....	123
ii.	<i>Région buccale et péribuccale</i> .....	124
iii.	<i>Région auriculaire</i> .....	124
c.	Bilan et limites de l'étude.....	124
d.	Conclusion .....	126
<b>IV.</b>	<b>Discussion générale, conclusion et perspectives</b> .....	127
	CONCLUSION .....	129
	BIBLIOGRAPHIE .....	131
	ANNEXES.....	137



## TABLE DES ANNEXES

Annexe 1 : Les trois zones de la tête présentées dans l'éthogramme.....	137
Annexe 2 : Distribution de la durée des états (en secondes) et de la fréquence des évènements (en nombre) pour l'ensemble des vaches PHY (expérience sur la douleur localisée) et pour l'ensemble des temps avant épreuve .....	138
Annexe 3 : Distribution de la durée des états (en secondes) et de la fréquence des évènements (en nombre) pour l'ensemble des vaches (expérience sur la douleur systémique) et pour l'ensemble des temps avant épreuve.....	142
Annexe 4 : Exemples de grilles utilisées chez : A. Les chevaux ; B. Les ovins ; C. Les rats ; D. Les souris ; E. Les bovins .....	147





## TABLE DES FIGURES

Figure 1 : La pluridimensionnalité de la douleur .....	24
Figure 2 : Les voies de la nociception .....	25
Figure 3 : Principales manifestations comportementales d'une douleur localisée ....	35
Figure 4 : Principales manifestations comportementales d'une douleur systémique	37
Figure 5 : Principales modifications physiologiques en cas de douleur .....	38
Figure 6 : Unités d'action utilisées pour décrire le haut et bas du visage chez l'Homme .....	42
Figure 7 : Les différentes zones étudiées lors de l'analyse des expressions faciales .....	43
Figure 8 : Calendrier des prélèvements et des mesures lors de l'étude sur la douleur mammaire.....	61
Figure 9 : Changements (moyenne $\pm$ ES) au cours du temps de la concentration en cortisol plasmatique en ng/mL .....	76
Figure 10 : Changements (moyenne $\pm$ ES) au cours du temps de la température rectale en degrés celsius.....	77
Figure 11 : Changements (moyenne $\pm$ ES) au cours du temps du comptage en cellules somatiques en cellules/mL .....	77
Figure 12 : Changements au cours du temps de la concentration d'haptoglobine dans le lait en $\mu$ g/mL .....	78
Figure 13 : A. Carte factorielle des variables, B. Carte factorielle des individus* de l'expérience sur l'inflammation localisée.....	86
Figure 14 : Calendrier des prélèvements et des observations lors de l'expérience sur la douleur systémique.....	95
Figure 15 : Changements (moyenne $\pm$ ES) au cours du temps de la concentration en cortisol plasmatique en ng/mL.....	109
Figure 16 : Changements (moyenne $\pm$ ES) au cours du temps de la concentration en haptoglobine plasmatique en $\mu$ g/mL.....	110
Figure 17 : Changements (moyenne $\pm$ ES) au cours du temps de la concentration en cytokines en pg/mL : a pour l'IL1b, b pour l'IL6 et c pour le TNF- $\alpha$ .....	111
Figure 18 : Changements (moyenne $\pm$ ES) au cours du temps de la température rectale en degré celsius.....	112
Figure 19 : A. Carte factorielle des variables, B. Carte factorielle des individus* de l'expérience sur l'inflammation généralisée .....	121



## TABLE DES TABLEAUX

Tableau I : Avantages et inconvénients des différents types de critères pour évaluer la douleur.....	41
Tableau II : Description des unités d'action pour les différentes régions chez les ovins lors de divers épisodes douloureux .....	51
Tableau III : Description des unités d'action pour les différentes régions chez les bovins lors de divers épisodes douloureux.....	52
Tableau IV : Description des unités d'action pour les différentes régions chez les chats lors de divers épisodes douloureux.....	53
Tableau V : Description des unités d'action pour les différentes régions chez les chevaux lors de divers épisodes douloureux.....	54
Tableau VI : Description des unités d'action pour les différentes régions chez les rongeurs lors de divers épisodes douloureux .....	56
Tableau VII : Ethogramme décrivant la zone orbitaire lors de l'étude sur l'inflammation mammaire.....	65
Tableau VIII : Ethogramme décrivant la zone buccale et péribuccale lors de l'étude sur l'inflammation mammaire .....	67
Tableau IX : Ethogramme décrivant la zone auriculaire lors de l'étude sur l'inflammation mammaire.....	68
Tableau X : Ethogramme décrivant les positions d'oreilles finalement utilisées lors de l'étude sur l'inflammation mammaire .....	70
Tableau XI : Seuils et modalités des états codés en durée et des évènements codés en fréquence pour l'étude sur l'inflammation mammaire .....	71
Tableau XII : Nombre de vidéos supprimées par temps et nombre final de vidéos utilisées par temps et par indicateur lors de l'étude sur l'inflammation mammaire ...	73
Tableau XIII : Changements (médiane et 1 <sup>er</sup> -3 <sup>ème</sup> quartiles) des concentrations en IL6, IL1b, IL8 en pg/mL, 7h et 24h après l'épreuve inflammatoire .....	78
Tableau XIV : Table de concordance des vaches du groupe PHY exprimant la modalité m1 et la modalité m2 pour chaque paramètre de l'œil avant (T-21, T-19, T-17, T-12, T0) et après épreuve (T3, T5, T7, T12, T24, T31, T48) et résultats du test de McNemar (K-value et p-value).....	80
Tableau XV : Table de concordance des vaches du groupe PHY exprimant la modalité m1 et la modalité m2 pour chaque paramètre du mufler avant (T-21, T-19, T-17, T-12, T0) et après épreuve (T3, T5, T7, T12, T24, T31, T48) et résultats du test de McNemar (K-value et p-value).....	81
Tableau XVI : Table de concordance des vaches du groupe PHY exprimant la modalité m1 et la modalité m2 pour chaque paramètre de l'oreille avant (T-21, T-19, T-17, T-12, T0) et après épreuve (T3, T5, T7, T12, T24, T31, T48) et résultats du test de McNemar (K-value et p-value).....	82

Tableau XVII : Table de concordance des vaches du groupe PHY exprimant la modalité m1 et la modalité m2 pour chaque évènement codé en absence/présence avant (T-21, T-19, T-17, T-12, T0) et après épreuve (T3, T5, T7, T12, T24, T31, T48) et résultats du test de McNemar (K-value et p-value).....	83
Tableau XVIII : Analyse factorielle discriminante sur les expressions faciales des vaches du groupe PHY : proportion de variance expliquée par chaque composante, et corrélations de chaque variable à la composante.....	85
Tableau XIX : Ethogramme décrivant la zone orbitaire lors de l'étude sur l'inflammation systémique.....	98
Tableau XX : Ethogramme décrivant la zone buccale et péribuccale lors de l'étude sur l'inflammation systémique.....	100
Tableau XXI : Ethogramme décrivant la zone auriculaire lors de l'étude sur l'inflammation systémique.....	101
Tableau XXII : Ethogramme décrivant les positions d'oreilles finalement utilisées lors de l'étude sur l'inflammation systémique .....	103
Tableau XXIII : Seuils et modalités des états codés en durée et des évènements codés en fréquence pour l'étude sur l'inflammation systémique.....	104
Tableau XXIV : Nombre de vidéos supprimées par temps et nombre final de vidéos utilisées par temps et par indicateur lors de l'étude sur l'inflammation généralisée	106
Tableau XXV : Table de concordance des vaches de l'étude sur l'inflammation généralisée exprimant la modalité m1 et la modalité m2 pour chaque paramètre de l'œil avant et après épreuve et résultats du test de McNemar (K-value et p-value)	115
Tableau XXVI : Table de concordance des vaches de l'étude sur l'inflammation généralisée exprimant la modalité m1 et la modalité m2 pour chaque paramètre du muflle avant et après épreuve et résultats du test de McNemar (K-value et p-value) .....	116
Tableau XXVII : Table de concordance des vaches de l'étude sur l'inflammation généralisée exprimant la modalité m1 et la modalité m2 pour chaque position d'oreille avant et après épreuve et résultats du test de McNemar (K-value et p-value) .....	117
Tableau XXVIII : Table de concordance des vaches de l'étude sur l'inflammation généralisée exprimant la modalité m1 et la modalité m2 pour chaque évènement codé en absence/présence avant et après épreuve et résultats du test de McNemar (K-value et p-value) .....	118
Tableau XXIX : Analyse factorielle discriminante sur les expressions faciales des vaches de l'expérience sur l'inflammation généralisée : proportion de variance expliquée par chaque composante, et corrélations de chaque variable à la composante .....	120

## LISTE DES ABREVIATIONS

<b>°C</b>	Degré celsius
<b>µg</b>	Microgramme
<b>ACTH</b>	Adrèno Cortico Trophic Hormone
<b>AINS</b>	Anti-inflammatoire non stéroïdien
<b>AMM</b>	Autorisation de mise sur le marché
<b>ANSES</b>	Agence nationale de sécurité sanitaire, de l'alimentation, de l'environnement et du travail
<b>C</b>	Challenged
<b>CCS</b>	Comptage des cellules somatiques (mL)
<b>CIDN</b>	Contrôles inhibiteurs diffus induits par stimulation nociceptive
<b>dL</b>	Décilitre
<b>eCG</b>	Hormone gonadotropine chorionique équine
<b><i>E.coli</i></b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>ELISA</b>	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (test d'immunoabsorption enzymatique)
<b>ES</b>	Erreur standard
<b>Etc</b>	Et cetera
<b>EU</b>	European Union
<b>FACS</b>	Facial action coding system
<b>G</b>	Gramme
<b>GISA</b>	Gestion Intégrée de la Santé Animale
<b>h</b>	Heures
<b>IC 95%</b>	Intervalle de confiance à 95%
<b>IL1b</b>	Interleukine 1 beta
<b>IL6</b>	Interleukine 6
<b>IL8</b>	Interleukine 8
<b>INRAE</b>	Institut national de recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement
<b>LH</b>	Luteinizing hormone
<b>LPS</b>	Lipopolysaccharide, constituant de la paroi bactérienne
<b>m1</b>	Modalité 1

<b>m2</b>	Modalité 2
<b>mL</b>	Millilitres
<b>min</b>	Minutes
<b>ng</b>	Nanogramme
<b>NA</b>	Non applicable
<b>NB</b>	Nota bene
<b>NC</b>	Not challenged
<b>NO</b>	Monoxyde d'azote
<b>NO</b>	Non observé
<b>NR</b>	Non réalisé
<b>PBS</b>	Phosphate Buffered Saline
<b>PHY</b>	Vaches ayant reçu une infusion de LPS puis une injection de sérum physiologique
<b>pg</b>	Picogramme
<b>sec</b>	Secondes
<b>TENS</b>	Transcutaneous Electrical Nerve Stimulation (méthode de neuro-stimulation transcutanée)
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Tumor Necrosis Factor alpha (facteur de nécrose tumorale)
<b>UI</b>	Unités internationales
<b>UMR-PRC</b>	Unité mixte de recherche – Physiologie de la Reproduction et des Comportements
<b>UMR-IHAP</b>	Unité mixte de recherche – Host pathogen interactions (recherche en infectiologie animale)
<b>Vs</b>	Versus

## INTRODUCTION

Depuis plusieurs années, la notion de douleur ressentie par les animaux de production est au cœur des débats. Elle représente en effet un des obstacles au bien-être animal, préoccupation majeure de la société actuelle.

Ce dernier est défini comme étant « l'état mental et physique positif lié à la satisfaction de ses besoins physiologiques et comportementaux, ainsi que de ses attentes » (ANSES, 2018). Il se divise en cinq libertés à respecter (Farm Animal Welfare Council, 2012) :

- L'absence de soif, de faim, de malnutrition
- L'absence de peur et de détresse
- L'absence de stress physique et thermique
- L'absence de douleur, lésion et maladie
- La liberté d'expression d'un comportement normal de l'espèce.

La présence de douleur au sein d'un élevage pose donc un problème éthique mais également un problème économique puisqu'elle est à l'origine d'une diminution des performances zootechniques des animaux (Faure et al, 2015). Il est donc dans l'intérêt des éleveurs et des vétérinaires de savoir la détecter pour pouvoir la prendre en charge de façon adaptée. La reconnaissance de la douleur chez les animaux est donc importante pour le bien-être des animaux. Si elle ne peut pas être correctement identifiée, ni sa gravité et sa nature évaluées, alors elle ne peut pas être soulagée de manière optimale (Descovich et al, 2017).

Les indicateurs de la douleur appartiennent à différentes catégories, tels que les indicateurs physiologiques/biochimiques, les indicateurs comportementaux ou encore les paramètres zootechniques (Levionnois et al, 2009). Le comportement permet de détecter précocement une douleur et de manière non invasive. Parmi les indicateurs comportementaux, l'utilisation des expressions faciales pour détecter la douleur avec la création de grilles d'analyse dédiée s'est de plus en plus développée depuis 10 ans. Des grilles ont déjà été développées chez les rats (Sotocinal et al., 2011), les souris (Langford et al, 2010), le mouton (McLennan et al, 2016; Guesgen et al, 2016), les chevaux (Dalla Costa et al, 2014) et le chat (Evangelista et al, 2019). Chez les bovins, une étude a également permis de créer une grille d'évaluation de la douleur mais elle comporte à la fois des expressions faciales et d'autres indicateurs comportementaux. En outre, le stimulus douloureux utilisé n'est pas précis puisque les vaches sélectionnées subissent différentes situations douloureuses (Gleerup et al, 2015 A). Il est donc nécessaire de développer des grilles d'expression faciale des bovins.

Cette thèse a donc pour but d'enrichir les connaissances sur l'expression faciale de la douleur chez les mammifères domestiques, notamment les bovins. Les objectifs sont :

- 1) Comprendre le mécanisme de la douleur.
- 2) Faire un état des lieux sur les sources de douleurs en élevage bovin.
- 3) Etudier les principales manifestations de la douleur déjà connues chez les mammifères domestiques ainsi que les expressions faciales déjà répertoriées lors de situation douloureuse chez ces espèces.
- 4) Etudier les variations d'expressions faciales lors d'une situation douloureuse localisée (épreuve intra-mammaire) et lors d'une situation douloureuse systémique (injection de LPS dans la veine jugulaire)

Cette thèse sera organisée en deux parties :

- Une première partie bibliographique permettra de définir la douleur, de présenter ses mécanismes. Nous présenterons ensuite les sources de douleur en élevage bovin. Puis nous mettrons en évidence les manifestations de la douleur chez les mammifères, qu'elles soient comportementales, physiologiques ou zootechniques. Enfin, nous nous intéresserons plus précisément aux expressions faciales en étudiant les différentes zones de la face et en observant comment elles sont modifiées lors de processus douloureux.
- Une seconde partie expérimentale présentera les résultats de deux études expérimentales conduites sur modèle bovin. La première a été menée sur 14 vaches laitières après une épreuve inflammatoire mammaire tandis que la seconde rassemble les données de 13 vaches laitières lors d'une épreuve inflammatoire systémique. L'objectif sera de déterminer si les expressions faciales des vaches varient lors d'un processus douloureux. Le second objectif sera d'essayer de comparer les variations des expressions faciales selon que la douleur soit localisée ou généralisée.



# SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE :

## LA DOULEUR : DEFINITION, MECANISMES, SOURCES, MANIFESTATION

### I. Définition

La douleur est « une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable associée ou ressemblant à celle associée à une lésion tissulaire réelle ou potentielle » (International Association for Study of Pain, 2020).

Cependant, il n'est parfois pas si aisé d'identifier un animal qui ressent de la douleur. En effet, les connaissances scientifiques sur le sujet sont encore maigres et le manque d'expressivité de la part de certaines espèces proies rend l'évaluation difficile (McLennan, 2018). De plus, l'animal ne pouvant communiquer verbalement avec l'homme, il peut être plus difficile de percevoir s'il ressent de la douleur et d'identifier la source de celle-ci (Levionnois et al, 2009).

La douleur comporte trois composantes (*figure n°1*) :

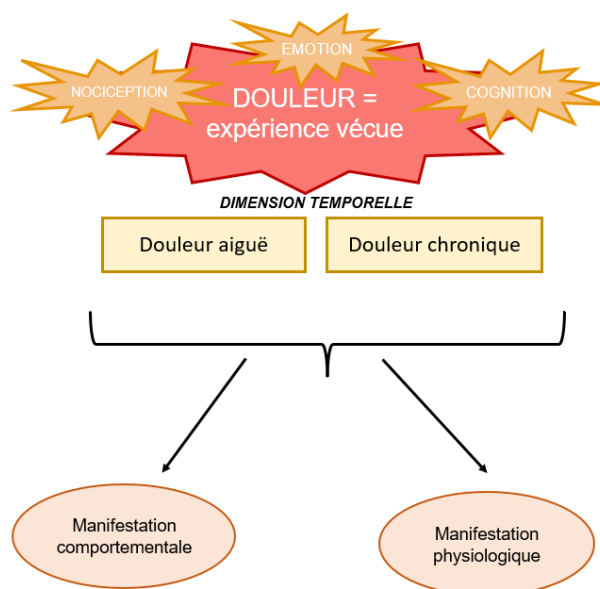
- Une **composante sensorielle** = la nociception. Cette composante correspond au décodage du message nocif : elle permet d'apprécier l'intensité, la durée, la localisation et la qualité du message. La nociception diffère donc de la douleur, en n'étant qu'une composante de cette dernière. Le message peut cependant être inexact, telle que la localisation dans le cas des douleurs projetées.
- Une **composante émotionnelle** : c'est le fait d'associer une tonalité désagréable au stimulus. Cette composante est influencée par le stimulus mais également par le contexte.
- Une **composante cognitive** : c'est l'ensemble des processus mentaux qui peuvent influencer la perception de la douleur ainsi que les réactions comportementales engendrées. C'est donc cette composante qui permet d'interpréter le stimulus douloureux et de réagir en conséquence. Cela fait appel à l'expérience personnelle face à la douleur.

La douleur présente également une dimension temporelle qui permet la distinction entre douleur aiguë et douleur chronique :

- La **douleur aiguë** : c'est un signal transitoire qui permet qui permet d'alarmer pour que l'individu réagisse. Elle est donc considérée comme utile puisqu'elle engendre des réactions de protection vis-à-vis du stimulus. Lorsqu'elle se prolonge dans le temps ou n'est pas traitée, elle devient douleur chronique.
- La **douleur chronique** : elle est considérée en tant que maladie du fait qu'elle n'a aucun objectif biologique bénéfique. Au contraire, elle participe à l'abattement de l'animal, provoque des troubles de l'appétit, du sommeil, etc ... On considère comme douleur chronique une douleur qui évolue depuis trois à six mois chez l'homme mais ceci est à nuancer chez les espèces animales du fait d'une espérance de vie relativement courte pour certaines productions, par exemple les volailles de chair (Levionnois et al, 2009).

Enfin, la douleur se manifeste via :

- Une réponse comportementale qui peut se traduire par des réactions verbales ou non verbales (pleurs, cris, etc...). Cette réponse peut être modifiée par l'environnement et les apprentissages antérieurs.
- Une réponse physiologique : il y a une augmentation des taux d'adrénaline, de cortisol ainsi qu'une élévation des fréquences cardiaques et respiratoires (Levionnois et al, 2009).



**Figure 1 : La pluridimensionnalité de la douleur (source personnelle)**

### En résumé :

Le concept de douleur n'est pas aisé à appréhender, ce qui le rend parfois difficile à évaluer sur le terrain. Pour évaluer la douleur, le vétérinaire peut identifier des modifications comportementales, physiologiques ou biochimiques mais leur mesure n'est pas toujours réalisable instantanément ou peut se révéler trop invasive dans certains cas (Prunier et al, 2013).

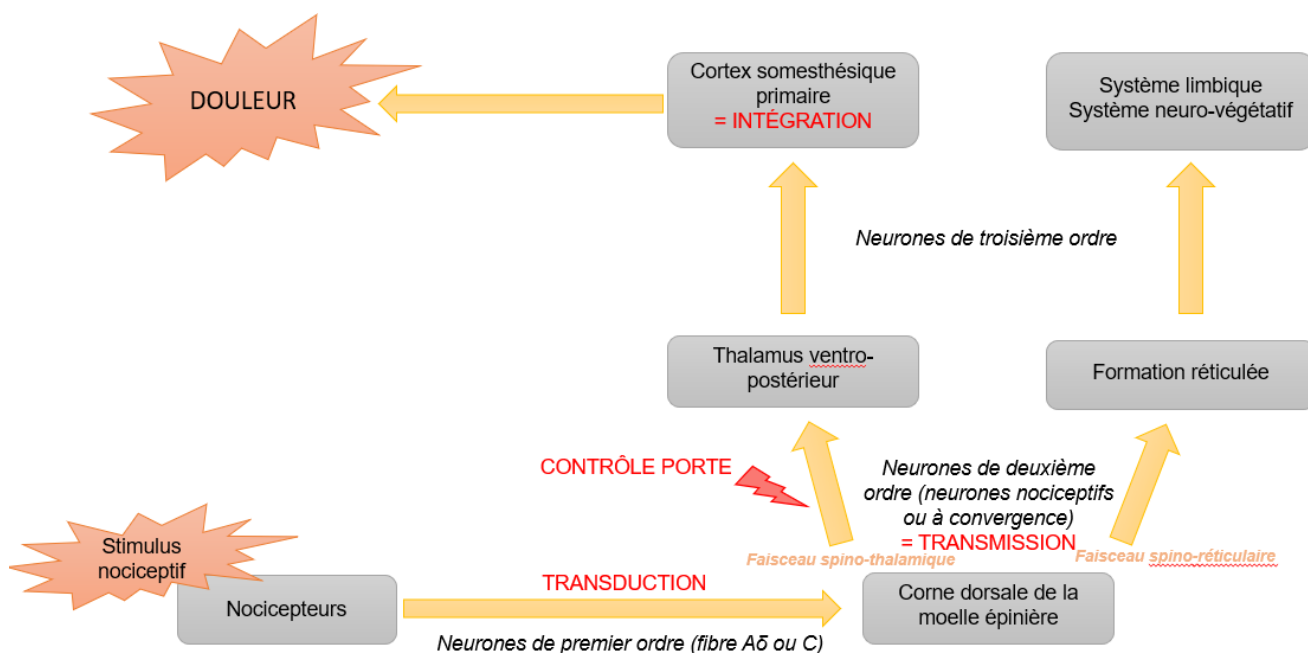
## II. Mécanismes et physiopathologie

Les voies de la nociception sont différentes de celles de la somesthésie bien qu'elles aient une organisation parallèle : la nociception n'est donc pas due à une stimulation excessive des voies de la somesthésie. De même, il faut différencier la douleur de la nociception : la douleur est une sensation consciente qui est permise en partie par les voies et les récepteurs de la nociception ; elle nécessite donc l'intégration du signal par le cortex (Sneddon et al, 2014).

Le mécanisme de la nociception est une succession complexe d'évènements comportant divers relais (**figure n°2**). On distingue trois étapes majeures :

- L'élaboration du message, aussi appelée transduction, et sa transmission au niveau périphérique
- La modulation au niveau médullaire
- La projection du message au cortex, où le message est intégré au niveau central et permet la perception de la douleur (Steagall et al, 2021).

Les voies ascendantes permettant la nociception sont donc elles aussi divisées en trois « étages » : les neurones du premier ordre qui permettent de faire le relais entre les nocicepteurs et la moelle épinière ; les neurones du deuxième ordre qui font le relais entre la moelle épinière et le cerveau ; et enfin, les neurones du troisième ordre qui portent l'information jusqu'au niveau cortical (Levionnois et al, 2009).



**Figure 2 : Les voies de la nociception (source personnelle)**

### 1. Elaboration du message nociceptif et transmission au niveau périphérique

Les nocicepteurs sont des récepteurs à haut seuil de stimulation. Ils sont principalement situés dans les régions les plus susceptibles d'être atteintes par des lésions (tissus cutanés, musculaires, ligamentaires, etc ...) tandis qu'ils sont plus rares au niveau viscéral. Ils permettent la transformation du message initial en un message électrique (Levionnois et al, 2009).

Les nocicepteurs sont de trois types :

- Les mécano-nocicepteurs, activés par des stimuli mécaniques de forte intensité.
- Les thermo-mécano-nocicepteurs, activés par des stimuli mécaniques ou thermiques intenses.
- Les nocicepteurs polymodaux, qui sont les plus nombreux et qui sont activés par des stimuli mécaniques, thermiques ou chimiques.

Ces nocicepteurs sont liés à deux types de fibres nerveuses, qui constituent les axones des neurones de premier ordre qui véhiculent l'information jusqu'à la moelle épinière :

- Les fibres A $\delta$  pour les mécano et thermo-mécano-nocicepteurs (tandis que les voies de la somesthésie sont composées de fibres A $\alpha$  et A $\beta$ ) : ce sont des fibres peu myélinisées et de diamètre moyen, à vitesse de conduction plutôt rapide. Elles sont à l'origine d'une sensibilité douloureuse épicrotique, c'est-à-dire rapide, vive et précise.
- Les fibres C pour les nocicepteurs polymodaux : ce sont des fibres amyélinisées et de faible diamètre, à vitesse de conduction très faible. Elles sont à l'origine d'une sensibilité douloureuse protopathique, soit lente, sourde, lancinante et mal localisées (Levionnois et al, 2009).

## 2. Modulation du message

Le relais a lieu dans la corne dorsale de la moelle épinière, où se situent les corps cellulaires des neurones de deuxième ordre, via le neuromédiateur appelée substance P. Le message est ainsi transmis par les axones des neurones de deuxième ordre jusqu'au thalamus ventro-postérieur (on parle de faisceau spino-thalamique). Une partie des axones des neurones de second ordre sont déviés du faisceau spino-thalamique vers le faisceau spino-réticulaire pour atteindre la formation réticulée et permettre la mémorisation et l'apprentissage de la douleur.

Les neurones de deuxième ordre peuvent être de deux types : des neurones spécifiquement nociceptifs, qui ne sont en relation qu'avec les neurones de premier ordre, ou des neurones à convergence qui reçoivent des afférences nociceptives et somesthésiques via des interneurones (ils sont à l'origine du « bruit de fond somesthésique ») (Levionnois et al, 2009).

## 3. Projection du message et intégration

Le thalamus ventro-postérieur contient les corps cellulaires des neurones de troisième ordre ; c'est donc là qu'a lieu le relais avec les neurones de deuxième ordre issus du faisceau spino-thalamique. Les axones de ces neurones projettent l'information jusqu'au cortex somesthésique primaire ; c'est là qu'a lieu l'intégration du message et dès ce moment, la nociception peut être à l'origine de douleur.

Les neurones du second ordre issus du faisceau spino-réticulé sont relayés par les neurones de troisième ordre au niveau de la formation réticulée pour que l'information puisse être distribuée à différentes structures liées aux émotions, à la mémorisation (système limbique), à la vigilance ou encore au système neuro-végétatif (Levionnois et al, 2009).

## 4. Les contrôles du message nociceptif

- **Contrôle d'origine médullaire** : ce contrôle a lieu grâce aux neurones de deuxième ordre à convergence. Les fibres somesthésiques exercent une activité inhibitrice sur ces neurones lors d'une stimulation intense, le tout par le biais d'interneurones inhibiteurs qui libèrent une endorphine (leucine-enképhaline). On parle de contrôle de porte. Ce contrôle permet la prise en charge de la douleur par l'acupuncture ou encore la méthode TENS (stimulation électrique des fibres somesthésiques).

- **Contrôle d'origine supra-spinal** : un contrôle de porte est également réalisé par d'autres structures tels que le cortex somesthésique ou le tronc cérébral. Ce contrôle par voie descendante se fait de deux façons :
  - Une voie directe : les afférences centrales inhibent les neurones à convergence via la noradrénaline et la sérotonine.
  - Une voie indirecte par le biais d'interneurones médullaires inhibiteurs qui font synapse avec les neurones à convergence et qui libèrent de l'enképhaline.
- **Contrôles inhibiteurs diffus induits par stimulation nociceptive (CIDN)** : le système nerveux central peut inhiber le bruit de fond des neurones à convergence afin de se « concentrer » sur un stimulus nociceptif particulier grâce à la libération d'endorphines qui permettent l'élévation du seuil de stimulation des neurones à convergence non concernés par le stimulus nociceptif. Ceci explique qu'une douleur forte inhibe une douleur moins forte (principe du tord-nez).
- **Contrôle par les endorphines circulantes** : on parle d'analgésie physiologique comme lors d'un exercice physique (augmentation des  $\beta$ -endorphines) ou d'un stress (libération de peptides opioïdes) (Levionnois et al, 2009).

**En résumé**, la douleur est la résultante de l'intégration par le cortex d'un message nocif.

Ce message atteint le cortex en trois grandes étapes :

1. L'élaboration du message et sa transmission qui mettent en jeu les différents types de nocicepteurs et les neurones de premier ordre qui véhiculent l'information jusqu'à la moelle épinière.
2. La modulation du message qui permet de transmettre le message au thalamus ventro-postérieur et à la formation réticulée via les neurones de second ordre.
3. La projection du message jusqu'au cortex somesthésique primaire où il pourra être intégré ainsi que la distribution par la formation réticulée au système limbique et neuro-végétatif notamment.

Ce message est contrôlé à différents moments : un contrôle au niveau médullaire, un contrôle d'origine supra-spinal, un contrôle inhibiteur permettant de se « concentrer » sur un seul message nociceptif lorsqu'il y en a plusieurs et enfin un contrôle par les endorphines circulantes permettant d'atténuer le message.

### III. Sources de douleur en élevage bovin

Bien qu'il existe une législation dans le monde entier visant à protéger les animaux de la douleur et de la souffrance, la douleur reste un problème pour le bien-être des animaux d'élevage (McLennan, 2018). En effet des pratiques douloureuses et des maladies de production subsistent et affectent la qualité de vie et la productivité de ces animaux. La douleur peut être ressentie de façon localisée (somatique, atteinte superficielle ou d'une partie du corps très localisée) ou bien de façon généralisée (systémique, atteinte profonde et viscérale).

## 1. Locale

Les causes de douleur localisée sont multiples : des maladies, certaines pratiques d'élevage, des interventions vétérinaires ou encore une mauvaise ergonomie des installations (logement, etc...).

### **MALADIES**

Premièrement, les maladies sont fréquemment source de douleur. Ces maladies peuvent être uniquement d'origine infectieuse ou être associées à une intensification de la production ou encore à une mauvaise gestion de l'environnement (McLennan, 2018).

Par exemple, la boiterie, très fréquente chez les bovins laitiers notamment, est une maladie multifactorielle mettant en jeu à la fois des agents infectieux (*Fusobacterium necrophorum*, *Dichelobacter nodosus*) et des facteurs environnementaux puisque la présence de sols bétonnés sont à l'origine de problèmes de pied et de boiteries, tout comme la conception des logements (absence d'aire paillée) ou encore l'absence/le manque de temps passé en pâture (McLennan, 2018). Ainsi, des logettes équipées d'un revêtement souple (caoutchouc ou paille) réduisent le nombre de boiteries tandis qu'un sol en béton est à l'origine d'une augmentation des problèmes aux pieds (Levionnois et al, 2009). Une des causes principales de boiterie est liée à l'alimentation : en effet, un apport trop important en glucides fermentescibles provoque une acidose subaiguë, elle-même à l'origine de fourbure (Levionnois et al, 2009). Les panaris sont également une des causes principales de douleur localisée selon les éleveurs (Roger, 2008).

La mammite est également une maladie à l'origine de douleur localisée. Là encore, des agents pathogènes sont responsables (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, ...) mais bien souvent, la mammite est causée par plusieurs facteurs. Ainsi, la réduction de l'espace disponible dans une stabulation libre par augmentation du nombre d'animaux, la malpropreté de la litière ou encore une mauvaise hygiène de traite favorisent l'apparition de mammites (McLennan, 2018; Levionnois et al, 2009).

D'autres maladies sont à l'origine de douleur localisée ; chez le veau, les omphalites peuvent provoquer une douleur intense localisée, tout comme une fracture d'un membre, le plus souvent provoquée par un bovin adulte qui écrase le membre d'un veau couché. Les bovins adultes peuvent également souffrir d'une fracture lors d'accidents (Roger, 2008).

Enfin, d'autres affections locales peuvent provoquer de la douleur telle que les affections oculaires comme la kératoconjunctivite, les abcès ou encore les affections buccales (Roger, 2008).

### **PRATIQUES D'ELEVAGE**

Certaines pratiques courantes d'élevage sont source de douleur localisée chez les bovins. Certaines de ces pratiques sont effectuées dans le but de réduire le risque de blessures ou de maladies ultérieures mais sont douloureuses au moment où elles sont pratiquées et juste après, si elles ne sont pas soulagées. Parfois, elles sont réalisées dans le but d'améliorer la manipulation des animaux ou pour résoudre des problèmes de comportement (McLennan, 2018).

Parmi les plus courantes, l'ébourgeonnage des veaux, pratiqué sur la quasi-totalité des veaux femelles laitiers destinés à la production laitière afin de limiter les risques de blessures dues aux coups de cornes (pour l'homme et les congénères) (Levionnois et al, 2009). L'ébourgeonnage chez le veau et l'écornage chez l'adulte, quelle que soit la technique utilisée, est source de douleur pour l'animal (McLennan, 2018).

La castration est également source de douleur localisée. Elle est le plus souvent réalisée afin de pouvoir élever des jeunes bovins mâles sur les mêmes pâtures que les femelles ou encore pour son influence sur la qualité des carcasses (viande plus tendre que les mâles entiers). Il existe différentes techniques (par écrasement à la pince de Burdizzo, par striction avec un élastique ou par exérèse chirurgicale), toutes à l'origine d'une douleur aiguë mais également chronique. La castration est douloureuse quel que soit l'âge de l'animal bien qu'il semblerait que l'intensité de la douleur engendrée augmente avec l'âge du veau (Levionnois et al, 2009).

D'autres pratiques douloureuses peuvent également être citées telles que le marquage des animaux ou encore la coupe de queue chez les bovins bien qu'elle soit désormais rare en France : il arrive qu'elle soit pratiquée dans certains cas dans un but thérapeutique ; elle est alors à l'origine d'une douleur aiguë et chronique en raison d'un névrome, et ce d'autant plus que l'animal est âgé au moment de l'intervention. La pose d'anneaux chez les taureaux est également à l'origine d'une douleur localisée (Levionnois et al, 2009).

La sélection génétique est également à l'origine de douleur localisée car les bovins issus de la sélection sont plus sensibles aux affections telles que les boiteries, les problèmes articulaires ou les mammites (Levionnois et al, 2009).

### **INTERVENTIONS VÉTÉRINAIRES**

Certaines interventions vétérinaires, à visée thérapeutique ou préventive, sont source de douleur localisée chez les bovins.

En effet, chez le veau, les soins ou les chirurgies du nombril lorsqu'il est atteint d'omphalite, les injections nécessaires au traitement d'une affection ou encore les injections liées à la vaccination sont à l'origine d'une douleur localisée (Levionnois et al, 2009).

Également, chez les bovins adultes, les interventions chirurgicales effectuées sur un pied infecté de bovins comme l'amputation ou encore le parage d'un onglon sont des pratiques douloureuses mais nécessaires. De la même façon, la vaccination des bovins peut engendrer une douleur au niveau de l'injection, tout comme les injections médicamenteuses lors d'une maladie (Levionnois et al, 2009; Roger, 2008). Les sutures lors de traumatismes tégumentaires ou d'interventions chirurgicales tout comme la vidange des abcès sont également des pratiques thérapeutiques douloureuses pour les bovins (Levionnois et al, 2009).

Enfin, l'utilisation d'aiguillons électriques, que ce soit par le vétérinaire ou par l'éleveur pour faire lever ou avancer le bovin, provoque également une douleur localisée (McLennan, 2018).

### **MAUVAISE ERGONOMIE DES INSTALLATIONS**

Enfin, la conduite du troupeau est parfois à l'origine de douleur localisée. Par exemple, une augmentation de la densité des animaux peut augmenter le nombre d'agressions entre les animaux et donc le nombre de lésions et de traumatismes du tégument, notamment si la taille du bâtiment n'est pas adaptée au nombre d'individus : la compétition alimentaire et pour le logement sont à l'origine d'une augmentation des combats (Levionnois et al, 2009).

De même, un logement non adapté aux animaux (par exemple logettes trop petites) augmentera le risque de lésions (Levionnois et al, 2009). Le logement n'est pas la seule source de douleur localisée dans un bâtiment : une taille inadaptée des cornadis, un sol traumatique ou des bâtiments mal conçus avec notamment des angles droits difficiles à aborder pour les animaux sont des sources de douleur localisée (ecchymoses, collisions, etc...) (McLennan, 2018).



Une mauvaise configuration de la salle de traite peut également provoquer des douleurs localisées : par exemple, une traite traumatique sera à l'origine de lésions sur les trayons. Également, si la disposition de la salle de traite n'est pas optimale, les lésions tégumentaires sont plus nombreuses (Levionnois et al, 2009).

## 2. Systémique

### **MALADIES**

Certaines maladies sont source de douleur systémique pour les bovins. Ainsi, toutes les maladies atteignant la circulation sanguine ou encore les maladies diffuses telles que celles atteignant le système digestif (grippe intestinale, par exemple) peuvent être à l'origine de douleur systémique. Ces maladies peuvent également être d'origine mécanique (volvulus, etc...) ou atteindre d'autres systèmes (bronchopneumonie, etc...) (Roger, 2008). Les péritonites, qu'elles soient consécutives à une intervention chirurgicale ou la résultante d'une pathologie chez le bovin, sont également une cause de douleur systémique (Levionnois et al, 2009).

Chez les veaux, les pneumonies ou les polyarthrites sont deux des principales maladies à l'origine d'une douleur systémique (Roger, 2008).

### **PRATIQUES D'ELEVAGE**

Les douleurs diffuses peuvent également être provoquées par des erreurs dans la conduite d'élevage.

Par exemple, une alimentation déséquilibrée avec un apport en glucides fermentescibles trop important peut provoquer une acidose subaiguë du rumen et cette dernière peut engendrer plusieurs phénomènes douloureux tels qu'une ruminite, des abcès hépatiques et ainsi être à l'origine de douleur généralisée (Levionnois et al, 2009).

La sélection génétique des bovins laitiers est également à l'origine d'un déficit énergétique post-partum plus élevé chez les bovins issus de cette sélection et ce déficit peut être associé à des désordres métaboliques douloureux tels que l'acétonémie. Les désordres digestifs sont également plus nombreux chez ces bovins. Chez les bovins allaitants, cette sélection est souvent à l'origine d'une hypertrophie musculaire chez les veaux à la naissance, à l'origine d'une douleur au vêlage plus intense pour la mère (Levionnois et al, 2009).

### **INTERVENTIONS VETERINAIRES**

Enfin, les interventions chirurgicales, bien que nécessaires, peuvent engendrer une douleur généralisée chez les bovins. Ainsi les interventions obstétricales telles que les césariennes ou encore les chirurgies digestives en cas de perforation intestinale par exemple peuvent causer une douleur diffuse viscérale (Roger, 2008).

Remarque : La douleur peut également être causée par des phénomènes physiologiques : il est probable que la parturition soit un événement douloureux pour les bovins (McLennan, 2018).



**En résumé**, les sources de douleur en élevage sont multiples.

Parmi elles, on peut citer :

- Les **maladies**, qui peuvent être à l'origine de douleur localisée ou généralisée selon le type de maladie. Elles peuvent être causées par des agents infectieux ou par des erreurs dans la conduite d'élevage.
- Les **pratiques** courantes en élevage, majoritairement à l'origine de douleur localisée.
- Les **erreurs** dans la conduite du troupeau, à l'origine de douleur localisée ou systémique selon le type de problème.
- Les **interventions chirurgicales/médicales** ainsi que les événements physiologiques douloureux (exemple de la mise-bas) causant une douleur localisée ou systémique selon la nature de l'intervention.

Les causes sont nombreuses, cependant la peur des effets indésirables induits par les analgésiques, les temps d'attente de production liés à leur administration ainsi que le manque de reconnaissance des comportements induits par la douleur provoquent régulièrement une mauvaise prise en charge de cette douleur (Steagall et al, 2021).

#### **IV. Manifestation et signes de douleur chez les mammifères**

Bien que la douleur ait une dimension négative puisqu'elle est désagréable pour l'animal, elle n'en reste pas moins utile. En effet, elle favorise la survie de l'individu en l'informant du dommage tissulaire : l'animal réagit afin d'arrêter ou d'éviter ce dommage et ainsi préserver sa santé. Cependant, il ne faut pas que cette douleur dure trop longtemps en raison des effets néfastes qu'elle peut engendrer ; il est donc nécessaire de pouvoir l'identifier et idéalement de pouvoir mesurer son intensité (Levionnois et al, 2009).

Cependant, il n'est pas si aisé de percevoir ces manifestations de la douleur puisqu'elle est très multiforme et dépend de l'intensité, de la fréquence et de la durée du stimulus (Ashley et al, 2005). De plus, d'autres facteurs rendent difficile l'évaluation de la douleur puisque c'est une évaluation assez personnelle qui dépend de l'expérience de l'évaluateur vis-à-vis de la douleur ainsi que de sa personnalité et de son sexe (McLennan, 2018; Collins et al, 2014). Pour que la perception de la douleur soit faisable en élevage, il faut donc que la mesure soit facilement réalisable sur le terrain, non invasive et sans avoir besoin d'un équipement spécialisé ainsi que nécessitant une formation minimale (McLennan, 2018).

Les manifestations et signes de la douleur peuvent être classées en trois catégories : des manifestations comportementales, des critères physiologiques et des paramètres zootechniques, qui sont en général la conséquence des modifications comportementales et physiologiques. Nous allons présenter les principaux signes de douleur dans ces trois catégories, lors d'une douleur localisée et lors d'une douleur généralisée.

## 1. Comportement

Les modifications comportementales liées à la douleur peuvent être classées en 5 catégories, plus ou moins exprimées selon que la douleur sera locale ou généralisée (Prunier et al, 2013) :

- L'évitement et les comportements défensifs
- Les vocalisations
- Les comportements liés à la zone douloureuse
- Les postures et actions permettant de réduire la stimulation de la zone douloureuse
- Les modifications générales d'activité (changement liés à l'agitation, l'immobilité, les comportements sociaux et de toilettage).

Les modifications du comportement sont des indicateurs très sensibles qui apparaissent immédiatement lors d'une douleur aiguë. Cependant, ils ne sont pas toujours très spécifiques puisque certains peuvent être présents lors de stress ou d'inconfort sans qu'il y ait de douleur (Levionnois et al, 2009). Ils peuvent également parfois être confondus avec les signes cliniques de la maladie ; il convient donc de rester vigilant lors de l'évaluation comportementale. Pour évaluer ces modifications comportementales, il faut donc s'assurer que ce soit bien lié à la douleur. Pour cela des tests avec et sans anesthésiques doivent être réalisés puisque si un comportement disparaît ou diminue sous anesthésique, cela signifie qu'il est bien lié à la douleur (McLennan, 2018). De nombreuses interventions sources de douleur chez différentes espèces (bovins, ovins, chevaux, etc...) ont donc été analysées en comparant les critères avec des animaux contrôles ou ayant reçus différents niveaux d'analgésie (Prunier et al, 2013).

L'évaluation comportementale rencontre cependant plusieurs obstacles. En effet, il arrive que des observateurs finissent par trouver normaux des comportements exprimés en situation de douleur lorsqu'ils sont constamment exposés à des animaux dans cette situation (Whay et al, 2003). A l'inverse, des animaux en situation douloureuse constante à laquelle ils ne peuvent pas se soustraire risquent de cesser d'exprimer les comportements douloureux. Il peut donc y avoir une évolution dans le temps de la réponse comportementale à la douleur (Levionnois et al, 2009). En outre, la réponse comportementale peut être modifiée par l'état physiologique de l'animal tel que la gestation ou la mise-bas. Enfin, une dernière source de variabilité de la réponse réside dans la tolérance à la douleur de chaque animal : tous ne vont pas exprimer les mêmes comportements ou à la même fréquence/intensité lors d'un même stimulus douloureux (Levionnois et al, 2009).

Certains comportements ne sont également pas exprimés en raison du statut de l'animal. En effet, si l'on prend l'exemple des bovins qui appartiennent à une espèce « proie », ils expriment relativement peu de comportements de douleur car cela pourrait attirer l'attention d'autres animaux et les exposer davantage aux prédateurs (notamment lorsqu'ils sont à l'extérieur) (Levionnois et al, 2009).

#### a. Lors d'une douleur locale

Les comportements rencontrés lors d'une douleur locale sont nombreux et assez bien documentés puisque de nombreuses études utilisent la castration, l'écornage ou encore la caudectomie comme procédure expérimentale (par exemple de Oliveira et al, 2014; Molony et al, 2002; Stewart et al, 2010). Ces comportements peuvent être classés en différentes catégories (**figure n°3**): les comportements d'évitement et défensifs, les vocalisations, les comportements visant à soulager la zone douloureuse, les comportements permettant de limiter la stimulation de la zone douloureuse, les modifications générales d'activité. Enfin, certains comportements exprimés sont liés à l'activation du système sympathique (Prunier et al, 2013).

Concernant les **comportements d'évitement** et les **comportements défensifs**, on observe des mouvements de pied ou du corps pour essayer d'échapper aux stimuli douloureux lors de la castration, de la résection des dents et de la caudectomie chez les jeunes porcelets (Marx et al, 2003; Noonan et al, 1994; Torrey et al, 2009). On observe également des sauts ou des coups de pied lorsqu'ils sont soumis à une marque au fer chaud ou à l'azote liquide (Lay et al, 1992; Schwartzkopf-Genswein et al, 1997). On observe aussi ce type de comportement lors de la palpation de la zone douloureuse, notamment lors de la palpation du scrotum après la castration (Prunier et al, 2013). Les animaux peuvent également avoir tendance à exercer plus de pression sur les barreaux de la cage de contention lorsqu'ils ressentent de la douleur. Enfin, il est fréquent qu'ils montrent une agressivité plus importante vis-à-vis de l'homme mais aussi de leurs congénères lors de situations douloureuses car leur tolérance à la manipulation est réduite (Levionnois et al, 2009).

Les **vocalisations** ont aussi été étudiées : leur fréquence, leur durée et leur qualité ont été analysées lors d'interventions douloureuses. La principale difficulté réside dans le fait que les vocalisations sont souvent émises lors d'une simple manipulation chez les porcins, les ovins ou même les bovins, et peuvent ainsi traduire de la peur. Cependant, le nombre et les caractéristiques de ces vocalisations variaient lors de situation douloureuse. En effet, le nombre ou la durée des vocalisations a augmenté chez les agneaux et les bovins lors de situations douloureuses telles que la castration, la caudectomie ou la marque au fer chaud (McLennan, 2018). Les cris de haute fréquence (> 1000 Hz) sont plus fréquents, plus intenses et plus longs chez les porcs qui subissent une castration par rapport aux porcs chez qui la castration est seulement mimée (Marx et al, 2003). De même, chez les veaux qui subissent un marquage au fer rouge, la fréquence maximale des cris et leur intensité sont augmentées par rapport aux veaux témoins (Watts and Stookey, 1999). Cependant ces analyses nécessitent un enregistrement des vocalisations et une analyse du sonogramme par des moyens informatiques. Les vocalisations peuvent aussi être utilisées de manière plus simple en dénombrant le nombre d'animaux qui vocalisent qui est supérieur lors d'une situation douloureuse (Levionnois et al, 2009; Schwartzkopf-Genswein et al, 1997). Cependant, il faut rester critique sur l'utilisation de ce paramètre puisqu'il peut exister dans des situations indolores telles que le stress ou la peur et conduire à une mauvaise interprétation. De plus, il s'avère plutôt décevant et peu utile pour détecter la douleur dans les heures qui suivent une pratique douloureuse (Levionnois et al, 2009; Molony et al, 2002).

D'autres comportements sont exprimés dans une **tentative de soulagement de la zone douloureuse**. Ces comportements sont donc principalement rencontrés lors d'une douleur locale. Ainsi, le léchage et le grattage sont deux comportements visant à activer simultanément les récepteurs sensoriels non nociceptifs de la peau pour inhiber la transmission du signal nociceptif (Eicher et al, 2000). Le léchage a été constaté lors de la caudectomie chez les veaux notamment ou dans les jours suivant la castration (Becker et al, 2012). Lorsque la zone n'est pas atteignable par léchage pour des raisons anatomiques, les animaux grattent alors la zone douloureuse, par exemple après l'écornage chez les veaux. Les veaux écornés présentent également plus de mouvements d'oreille et se frottent la tête contre des objets/surfaces dans les jours qui suivent l'intervention (Morisse et al, 1995).

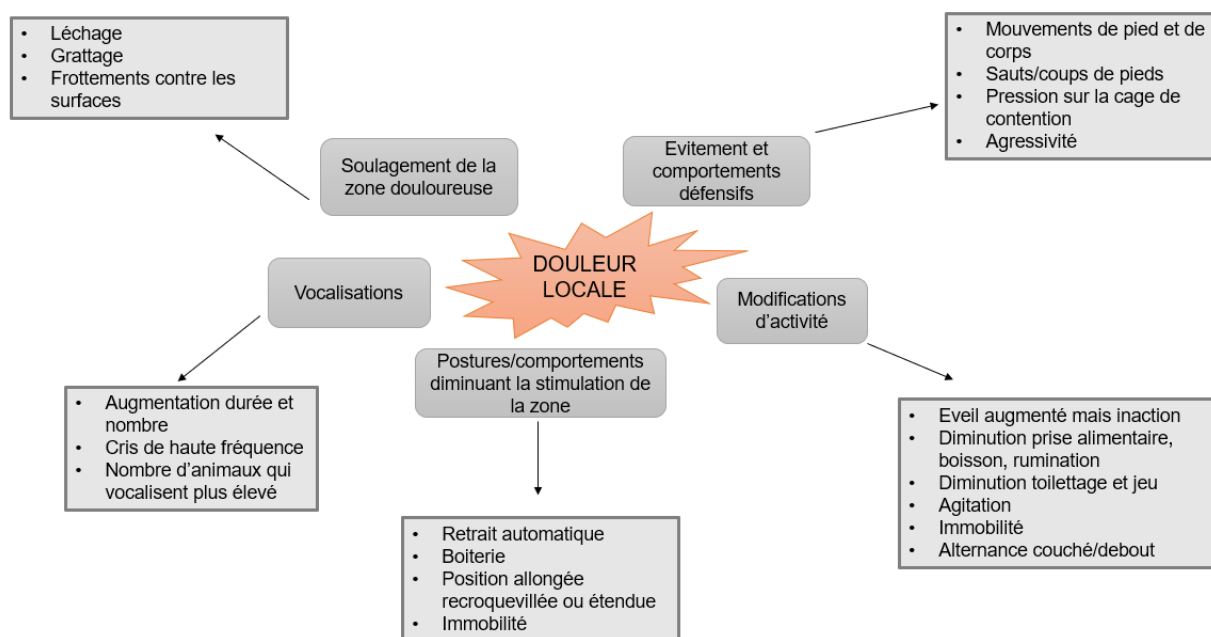
La présence de douleur peut également être indiquée par des **postures** ou des **comportements permettant de réduire la stimulation** de la zone douloureuse. Ce type de comportements est donc plutôt exprimé lors de douleur locale. Le principal comportement utilisé pour éviter la stimulation de la zone douloureuse est le réflexe de retrait. Par exemple lors d'un stimulus nociceptif tel que l'application d'un rayon laser sur un membre, on peut mesurer le temps mis par l'animal pour retirer son membre pour s'y soustraire (Schwartzkopf-Genswein et al, 1997). L'autre comportement régulièrement observé dans ces situations-là est le comportement de boiterie. Cependant, d'autres comportements peuvent être exprimés comme des animaux qui s'allongent avec les membres repliés sous le corps pour éviter l'étirement des tissus ou au contraire des animaux couchés sur le côté avec les membres étendus au maximum (observé chez le porc après la castration, Hay et al, 2003). Parfois les animaux peuvent également rester debout mais être immobile afin d'éviter de stimuler la zone douloureuse (Levionnois et al, 2009).

Concernant les **modifications générales d'activité**, la douleur perturbe le **sommeil** des bovins (l'état d'éveil est plus fréquent mais l'animal reste inactif pendant plusieurs heures) (Ohayon, 2005). La douleur provoque également une diminution de la consommation de **nourriture et d'eau** (de Oliveira et al, 2014). Cependant, les animaux ne réagissent pas tous de la même façon puisque chez certains la prise alimentaire peut au contraire être augmentée tout comme l'activité générale dans le but de rediriger son attention et ainsi atténuer la douleur (Eicher et al, 2000). Cependant, il semblerait que ce ne soit le cas que lors de douleur légère. Or, ces comportements sont essentiels pour la survie de l'animal et leur diminution peut ralentir la récupération d'une maladie ou de lésions tissulaires (McLennan, 2018). La diminution de la **rumination** peut également être un indicateur (Levionnois et al, 2009). La douleur réduit également les comportements de **toiletage** et de **jeu** (Dalla Costa et al, 2014). La diminution du comportement de jeu a été notée après la castration chez les agneaux (Thornton et al, 2002) et l'écornage chez les veaux (Mintline et al, 2013), tout comme la diminution de la prise alimentaire et l'augmentation du temps passé en position couchée (Devant et al, 2012). Ces modifications d'activité sont parfois associées à une **agitation** augmentée, tel que le roulement d'un côté à l'autre ou l'alternance des positions couché et debout (Prunier et al, 2013). On observe parfois un isolement des animaux ou alors une désynchronisation des activités avec les autres membres de la portée chez les porcins notamment (Hay et al, 2003). Ces changements de comportement peuvent parfois être difficiles à interpréter car ils peuvent être causés par des perturbations dans l'environnement des animaux ou par une maladie ; il faut donc être capable de différencier ceux qui sont réellement liés à

la douleur. Enfin on peut noter une diminution de la réactivité à l'approche de l'homme ou à la manipulation (sauf lorsqu'on manipule la zone douloureuse) (Levionnois et al, 2009).

On constate aussi des comportements liés à **l'activation du système sympathique**. Par exemple, dans les premières heures suivant la castration chirurgicale des porcelets, on observe plus de **tremblements** qu'à l'accoutumée. On peut aussi observer une agitation de la queue plus marquée après la caudectomie ou la castration chez le veau (notamment la castration par pose d'élastique). Les très jeunes animaux peuvent également présenter des **spasmes** et des tremblements spontanés durant leur sommeil lorsqu'ils sont en situation douloureuse (Molony et al, 2002; Hay et al, 2003).

Les **liens entre la mère et leur progéniture** sont aussi affectés par la douleur locale; en effet les brebis atteintes de mammite réduisent leur nombre de vocalisations pour appeler les agneaux afin qu'ils viennent téter : cela réduit le lien puisque les agneaux trouvent des ressources ailleurs (McLennan, 2018).



**Figure 3 : Principales manifestations comportementales d'une douleur localisée (source personnelle)**

## b. Lors d'une douleur systémique

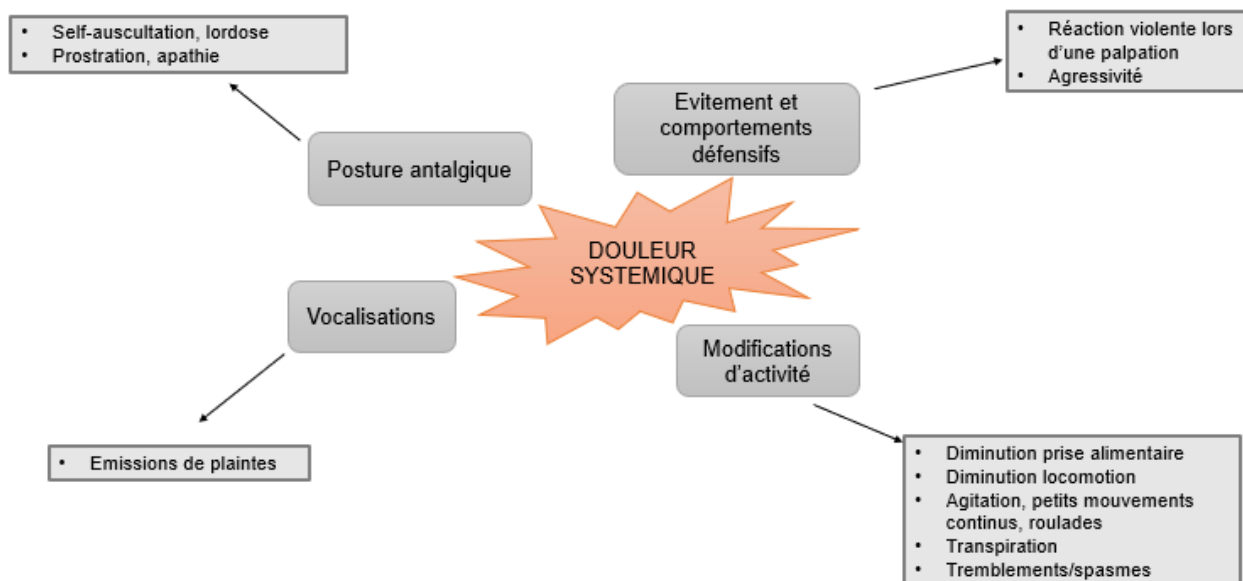
Les études concernant un processus douloureux systémique (c'est-à-dire une douleur diffuse dans tout un tissu ou système anatomique ou dans différentes régions du corps) sont plus rares et les comportements rencontrés dans ce cas-là ne sont pas très bien renseignés. On rencontre donc plutôt des comportements d'évitement ou de défense, de soulagement ainsi que des modifications de l'activité (Levionnois et al, 2009) (**figure n°4**).

Les **comportements défensifs ou d'évitement** sont présents lors de douleur systémique. Ainsi, les chevaux avec une douleur viscérale intense réagissent de manière excessive (mouvements du corps pour montrer l'arrière-train) aux stimuli auditifs voire de façon agressive (morsure). Cependant lors d'une douleur très intense, ce comportement est remplacé par de la prostration/une absence de réaction. En outre, lors de la palpation de l'abdomen, ces mêmes chevaux peuvent montrer une violente réaction en cas de douleur sévère lors de colique aiguë (Van Loon et al, 2014).

Les **vocalisations** peuvent également être exprimées lors d'une douleur systémique ; ainsi des bovins présentant des affections digestives douloureuses telles qu'un volvulus ou une torsion de caillette peuvent émettre des plaintes (Roger, 2008).

Les animaux souffrant d'une douleur systémique peuvent également adopter une **posture antalgique** particulière avec la tête en extension et assez basse, les coudes écartés et de la lordose lorsqu'ils sont debout ; couchés, ils sont le plus souvent en position de « self-auscultation », c'est-à-dire la tête tournée vers le flanc (Roger, 2008). Les bovins et les ovins ayant subi l'implantation d'une canule ruminale et duodénale par intervention chirurgicale ont aussi présenté une apathie et des postures antalgiques avec la tête baissée par rapport à la ligne du dos (Durand et al, 2021; Faure et al, 2017).

Concernant les **modifications d'activité**, les vaches ayant une douleur viscérale induite par une réticulo-péritonite traumatique diminuent leur activité locomotrice de 70 à 90% (Rialland et al, 2008). Les chevaux présentant une douleur viscérale aiguë sont réticents à bouger et présentent une agitation générale du corps avec des mouvements continus. Ils transpirent en quantité importante. Lors d'une douleur sévère causée par une chirurgie viscérale, ils étaient dans un état de prostration avec des tremblements musculaires et la tête était constamment en mouvement (mouvements latéraux ou verticaux). Des coups de pied en direction du flanc et des piétinements ont pu être observés également (Van Loon et al, 2014). Concernant la nourriture, ils ne montraient aucun intérêt pour le foin (Van Loon et al, 2014). Ces piétinements et cette agitation se retrouvent chez les bovins lors d'une douleur abdominale intense, pouvant même aller jusqu'au pédalage et aux roulades (Levionnois et al, 2009).



**Figure 4 : Principales manifestations comportementales d'une douleur systémique (source personnelle)**

**En résumé**, les évaluations comportementales pour détecter la douleur se sont beaucoup développées par nécessité d'avoir des indicateurs rapides à observer et non invasifs. En revanche, des améliorations permettraient de limiter les biais associés aux évaluateurs, notamment une meilleure définition des différents indicateurs, une meilleure formation des observateurs et dans le cas d'une évaluation multiple, l'assurance de leur indépendance.

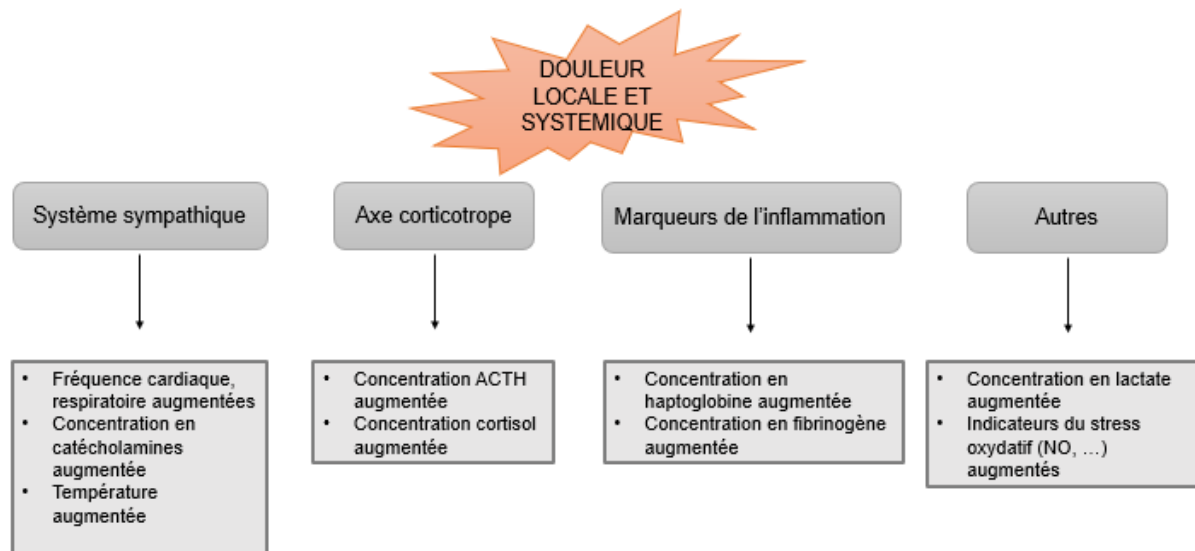
De plus, les manifestations comportementales sont rarement spécifiques de la douleur et peuvent être associés à d'autres émotions négatives telles que la peur et le stress. Ils ne peuvent donc pas identifier spécifiquement la douleur : ils nécessitent d'être associés à d'autres indicateurs comme les paramètres physiologiques ou encore les critères zootechniques (McLennan, 2018; Prunier et al, 2013).

Il est cependant difficile de différencier le type de stimulus douloureux (locale ou systémique) grâce aux modifications comportementales puisque dans les deux cas, les différentes catégories de comportement sont représentées.



## 2. Paramètres physiologiques

La variation de certains paramètres physiologiques lors de situation douloureuse repose sur le fait que les systèmes de réponse au stress tels que l'axe corticotrope et le système sympathique sont activés lors d'un stimulus douloureux. Ce ne sont donc pas des indicateurs spécifiques de la douleur : il faut tenir compte du contexte lors de l'interprétation de leurs variations (Levionnois et al, 2009).



**Figure 5 : Principales modifications physiologiques en cas de douleur (source personnelle, adapté de (FAURE et al., 2015))**

### a. Lors d'une douleur locale

La douleur est un facteur de stress, ce qui provoque une libération d'hormones par les axes **hypothalamo-hypophysio-surrénalien** et **sympathique** chez les mammifères. De plus, les lésions tissulaires pouvant être présentes activent le système immunitaire et provoquent la libération de **médiateurs de l'inflammation** qui peuvent eux aussi activer l'axe corticotrope. Enfin, certains **substances libérées pendant l'inflammation** (haptoglobine, fibrinogène, etc) peuvent être utilisées en tant qu'indicateurs indirects d'une éventuelle douleur puisqu'il est fréquent que les états inflammatoires génèrent de la douleur chez les mammifères (Levionnois et al, 2009).

Juste après l'application du stimulus nocif, on observe une activation de **l'axe hypothalamo-hypophysio-surrénalien**, provoquant une **augmentation de la concentration en ACTH plasmatique**. Cette hormone hypophysaire stimule la libération de cortisol. On constate alors une **augmentation du cortisol plasmatique** dans les heures et parfois les jours suivant l'intervention douloureuse. On ne retrouve pas cette augmentation lors de la simple manipulation des porcs et des veaux (Prunier et al, 2005; Lay et al, 1992). L'augmentation du cortisol est le paramètre physiologique le plus utilisé chez les mammifères d'élevage ; elle a été montrée après la castration du porc et du veau ainsi que l'écornage par des prélèvements sanguins effectués à intervalles réguliers sur des animaux castrés et sur des animaux témoins. De plus, ces études ont montré que l'amplitude et la durée du pic de cortisol ont diminué lors de l'utilisation d'une anesthésie locale ou péridurale : cela signifie que l'augmentation du cortisol est bien liée à la douleur (Levionnois et al, 2009). Les variations en ACTH sont plus marquées que celles en cortisol (amplitude du pic plus forte et pic atteint plus



rapidement). Cependant, ces mesures sont peu spécifiques car elles sont sujettes aux variations liées au stress provoqué par la prise de sang ou toute perturbation de l'environnement (Prunier et al, 2005). De plus, ce sont des mesures peu voire pas réalisables sur le terrain en raison du matériel et de la technique nécessaire (Levionnois et al, 2009). D'autres concentrations hormonales peuvent être utiles pour détecter la douleur. La concentration plasmatique en **beta-endorphine** augmente après une intervention chirurgicale orthopédique douloureuse chez le cheval (McCarthy et al, 1993) ; elle peut donc être utile pour détecter une douleur aiguë mais n'est pas un bon indicateur d'une douleur chronique. De plus les études sont limitées sur ce paramètre, les effets constatés sont peu marqués et pourraient être expliqués par la perte de sang.

L'activation du **système sympathique** est à l'origine de l'augmentation de la concentration en **adrénaline plasmatique**. Cette augmentation est rapide (dans les 5 minutes suivant le stimulus) après la castration des porcs ou encore l'écornage chez les veaux mais elle ne dure pas dans le temps (seulement une quinzaine de minutes), tandis que la **noradrénaline** plasmatique augmente plus tard (dans les 15 minutes suivant le stimulus nociceptif) mais dure plus longtemps (persiste environ 90 minutes). La concentration de ces deux neuropeptides est encore plus sensible au stress ; cela les rend donc difficiles à utiliser (Prunier et al, 2006). Des **paramètres cliniques** connaissent également une augmentation lors de situation douloureuse. C'est notamment le cas de la **fréquence cardiaque** et de la **fréquence respiratoire** lors de l'identification au fer chaud, tout comme la **température rectale** (Prunier et al, 2013). Enfin, les comportements défensifs impliquent une augmentation de l'activité musculaire pendant la douleur aiguë, ce qui contribue à une augmentation de la concentration en **lactate plasmatique** (suite à une mobilisation des réserves en glycogène, elle-même provoquée par l'augmentation de la concentration en adrénaline plasmatique (Prunier et al, 2005)).

Les **concentrations en protéines de la phase aiguë** peuvent aussi être utilisées comme indicateurs puisqu'elles témoignent de la présence d'un état inflammatoire pouvant générer de la douleur. La concentration en **haptoglobine plasmatique** a augmenté dans les jours suivant la castration chirurgicale des agneaux et des veaux ou la caudectomie des génisses. Les concentration **en fibrinogène, en céruloplasmine et en sérum amyloïde A** augmentent également lors d'une inflammation. Ce sont des indicateurs sensibles mais qui restent complexes à utiliser en dehors d'un cadre expérimental (Prunier et al, 2013).

Il est possible d'utiliser des marqueurs de l'activation d'autre structures du système nerveux qui sont impliquées dans la détection, la perception ou le contrôle de la douleur. Ainsi l'expression des **gènes d'activation précoce** tel que *c-fos* dans la moelle épinière peut être un marqueur de la douleur (Levionnois et al, 2009).

#### b. Lors d'une douleur systémique

L'**axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien** est également activé lors d'une douleur systémique avec l'augmentation de la concentration plasmatique en **cortisol**, montré lors de l'insertion d'une canule dans le rumen et le duodénum d'ovins (Faure et al, 2017). Cette augmentation a également été constatée lors de l'insertion d'une canule dans le rumen et le duodénum mais elle n'était pas significative par rapport à la concentration mesurée avant la chirurgie (Durand et al, 2021).

L'activation du **système sympathique** lors de douleur systémique a également été montrée : la **fréquence cardiaque**, la **fréquence respiratoire** et la **température rectale** ont augmenté chez des chevaux souffrant de douleur abdominale aiguë (Van Loon et al, 2014).

La concentration plasmatique en **haptoglobine** est également un paramètre qui augmente lors de l'insertion d'une canule dans le rumen et le duodénum des bovins (Durand et al, 2021) tout comme chez les ovins lors de cette même chirurgie (Faure et al, 2017).

Les indicateurs du **stress oxydatif** tels que le **monoxyde d'azote** et le **malondialdéhyde** ont également augmenté après l'insertion d'une canule dans le rumen ou le duodénum (Durand et al, 2021).

**En résumé**, les variations des paramètres physiologiques pouvant également être liées au stress ou à la maladie en elle-même, il faut les interpréter avec prudence. De plus, ces mesures nécessitent le plus souvent un équipement assez important ou des techniques de laboratoire complexes. Il n'est donc pas toujours évident de les réaliser en routine alors qu'ils sont très souvent utilisés lors de situations expérimentales. Ces variations sont assez similaires entre une douleur locale et systémique donc elles ne permettent pas de discriminer le type de douleur (**figure n°5**).

Les modifications comportementales et les variations d'indicateurs physiologiques sont à l'origine de changements de certains paramètres zootechniques. Ces derniers peuvent donc être utilisés en association afin d'augmenter la spécificité de la détection de la douleur.

### 3. Paramètres zootechniques

En raison des conséquences de la douleur sur le comportement (notamment l'appétit) et sur la sécrétion des hormones du stress, on peut s'attendre à une baisse des performances zootechniques chez des animaux ressentant de la douleur. Cette baisse apparaît dans un second temps puisqu'elle est la conséquence des modifications comportementales et physiologiques. Elle peut cependant être un critère d'alerte (Levionnois et al, 2009).

Peu d'études traitent de l'effet de la douleur sur les performances de production mais certains résultats ont été extrapolés à partir d'études portant sur l'impact du stress ou de troubles de la santé.

#### a. Lors d'une douleur locale

Les **performances de reproduction** des bovins sont impactées par la douleur. Par exemple, en cas de boiterie, les vaches allaitantes présentent plus fréquemment des **kystes ovariens** en début de lactation, un **intervalle augmenté** entre le vêlage et la conception ultérieure d'un veau. De même, 88% des taureaux abattus pour de **l'infertilité** présentaient au moins une articulation lésée (Prunier et al, 2013). **L'expression des chaleurs** est également impactée par la douleur locale en raison d'une insuffisance hormonale. De même, on constate une diminution des concentrations sanguines en LH et en testostérone qui sont associées à une altération de la **qualité du sperme** produit et à une diminution de sa **quantité** (Levionnois et al, 2009).

La douleur entraîne une **diminution des niveaux de production/croissance**. Des maladies comme la boiterie et la mammite ont donc des coûts liés à leur traitement mais aussi aux pertes de production. La **production laitière** est notamment diminuée dans le cas de mammite puisque les bovins mangent moins et s'allongent moins (McLennan, 2018) ainsi que dans les cas de boiterie (Prunier et al, 2013). De même, lorsque des brebis sont atteints de mammites, les agneaux têtent moins et ne reçoivent pas assez de lait pour assurer une **croissance** correcte (McLennan, 2018). La douleur impacte aussi le **gain moyen quotidien** des bovins castrés. Cette diminution de croissance est en partie résolue par l'utilisation d'une anesthésie locale, ce qui montre bien qu'elle est liée à la douleur engendrer par l'acte (Levionnois et al, 2009).

#### b. Lors d'une douleur systémique

Il existe peu de données bibliographiques sur les performances zootechniques des mammifères lors de douleur systémique. Cependant, il a été montré que des bovins ayant subi une chirurgie digestive telle que l'insertion d'une canule ruminale et duodénale présentaient une **diminution de la production laitière** lors du premier jour suivant l'intervention (Durand et al, 2021).

**En résumé**, la douleur peut donc être détectée par différentes variations : comportementales, physiologiques, zootechniques. Cependant tous ces indicateurs ne sont pas très spécifiques (**tableau I**) de la douleur puisqu'ils varient également en cas de stress ou de maladie sans composante nociceptive. Il convient donc de les associer et de les prendre dans leur ensemble, mais également d'utiliser d'autres indicateurs que peuvent être les expressions faciales.

En effet, l'expression faciale est considérée comme un signal « honnête » de l'état affectif de l'animal et de l'intensité de la douleur ressentie puisqu'il est difficile de masquer l'expression de la douleur (McLennan, 2018).

**Tableau I : Avantages et inconvénients des différents types de critères pour évaluer la douleur** (d'après de Boyer des Roches et al, 2014, modifié par l'auteure)

	<b>CRITERES COMPORTEMENTAUX</b>	<b>CRITERES PHYSIOLOGIQUES</b>	<b>CRITERES ZOOTECHNIQUES</b>
<b>AVANTAGES</b>	Non invasifs Immédiats Sensibles Discrimination du type de douleur	Sensibles	Non invasifs
<b>INCONVENIENTS</b>	Pas toujours spécifiques Variation selon l'espèce/l'âge/stade physiologique Formation nécessaire	Peu spécifiques Peu adaptés au terrain Invasifs Pas de discrimination du type de douleur	Peu sensibles Très peu spécifiques Pas de discrimination du type de douleur

## V. Tête : expressions faciales chez les mammifères : analyse comparée

### 1. Définition des expressions faciales

Les expressions faciales sont la résultante de la contraction de certains muscles et de la relaxation d'autres muscles en réponse à un stimulus émotionnel (McLennan, 2018). Elles peuvent donc être utilisées pour déduire le statut émotionnel d'une personne.

Chez l'Homme, le premier système à avoir été utilisé pour déterminer les statuts émotionnels et le système FACS (« Facial action coding system »), créé par Paul Ekman et Wallace Friesen (Harley, 2016). Ce système (**figure n°6**) décrit des unités d'action, chacune correspondant à une expression faciale. Une unité d'action décrit alors la contraction ou la décontraction d'un muscle ou groupe de muscles.

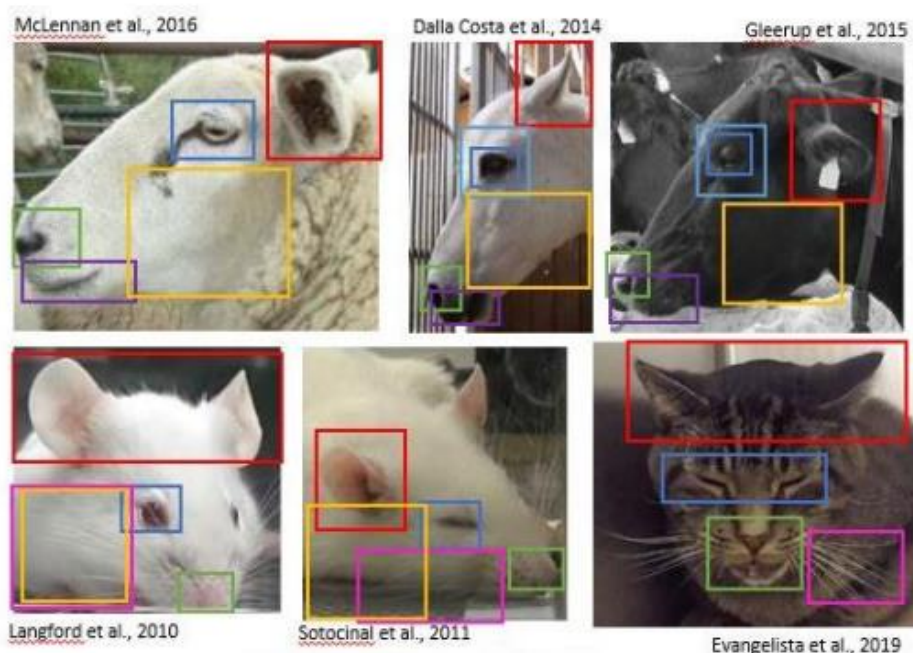
Upper Face Action Units					
AU 1	AU 2	AU 4	AU 5	AU 6	AU 7
					
Inner Brow Raiser *AU 41	Outer Brow Raiser *AU 42	Brow Lowerer *AU 43	Upper Lid Raiser AU 44	Cheek Raiser AU 45	Lid Tightener AU 46
					
Lid Droop	Slit	Eyes Closed	Squint	Blink	Wink
Lower Face Action Units					
AU 9	AU 10	AU 11	AU 12	AU 13	AU 14
					
Nose Wrinkler AU 15	Upper Lip Raiser AU 16	Nasolabial Deepener AU 17	Lip Corner Puller AU 18	Cheek Puffer AU 20	Dimpler AU 22
					
Lip Corner Depressor AU 23	Lower Lip Depressor AU 24	Chin Raiser *AU 25	Lip Puckerer *AU 26	Lip Stretcher *AU 27	Lip Funneler AU 28
					
Lip Tightener	Lip Pressor	Lips Part	Jaw Drop	Mouth Stretch	Lip Suck

**Figure 6 : Unités d'action utilisées pour décrire le haut et bas du visage chez l'Homme (source : d'après Yin et al, 2017)**

Chez les animaux, l'utilisation des expressions faciales est encore peu répandue sauf dans les études sur la douleur. Or, l'évaluation des expressions faciales a l'avantage d'être non invasive, immédiate et de nécessiter un entraînement minime aux observateurs, elles pourraient donc être utilisées en complément des mesures comportementales ou physiologiques (Descovich et al, 2017). De plus, il est probable que ce soit une réponse involontaire à la douleur : c'est donc une méthode d'évaluation plus sensible que d'autres outils (McLennan, 2018).

Chez les espèces de mammifères étudiées (souris, rat, bovins, ovins, chevaux, chats), les zones étudiées lors des expressions faciales sont au nombre de 4 (**figure n°7**) :

- Région auriculaire : cette région comprend donc l'oreille.
- Région oculaire : cette région comporte l'œil et de l'arcade sourcilière.
- Région nasale : elle se compose du muflé.
- Région buccale et péri-buccale : cette région comprend la bouche, la mandibule et les vibrisses pour les espèces en possédant.



**Figure 7 : Les différentes zones étudiées lors de l'analyse des expressions faciales** (source : d'après (De Boyer des Roches et al., 2016))

## 2. Modifications de ces zones lors d'un stimulus douloureux chez différentes espèces

L'utilisation des expressions faciales en tant qu'outil d'évaluation de la douleur date de la dernière décennie. C'est donc un concept récent (McLennan, 2018). De multiples systèmes de notation utilisant les expressions faciales ont été développés lors de différents épisodes douloureux chez des espèces comme la souris (Langford et al, 2010), le rat (Sotocinal et al, 2011), le cheval (Dalla Costa et al, 2014), le chat (Evangelista et al, 2019), le mouton (McLennan et al, 2016) et le bovin (Gleerup et al, 2015 A).

Ces grilles ont été obtenues en s'inspirant du système FACS, utilisé chez les humains (**ANNEXE n°4**). Les expérimentateurs ont défini des expressions, puis chacune était notée de la façon suivante : 0 en cas d'absence, 1 si elle était modérément présente ou s'il y avait une incertitude, 2 si elle était présente ; l'option « impossible à estimer » était utilisée si l'unité d'action n'était pas visible.

**Les tableaux II à VI** mettent en évidence les modifications d'expression faciale lors de la présence de douleur ainsi que selon le type de stimulus douloureux (locale ou systémique).



## a. Modifications des zones selon la présence/l'absence de douleur

### • Région auriculaire

La région auriculaire a été étudiée via les postures d'oreilles chez les ovins (McLennan et al, 2016; Guesgen et al, 2016; Häger et al, 2017; Durand et al, 2019), les bovins (Müller et al, 2019; de Boyer des Roches et al, 2017; Glerup et al, 2015 A), les chats (Evangelista et al, 2019; Holden et al, 2014), les chevaux (Dalla Costa et al, 2014; Van Loon et al, 2019; Glerup et al, 2015 B; Dalla Costa et al, 2016; Ask et al, 2020; Dyson et al, 2017; Van Loon et al, 2017; Diego et al, 2016; Coneglian et al, 2020; Van Loon et al, 2014), les souris (Miller et al, 2015; Heinsinger et al, 2020; Miller et al, 2016; Leach et al, 2012; Langford et al, 2010; Mittal et al, 2016; Chartier et al, 2020; Akintola et al, 2017) et les rats (Sotocinal et al, 2011; Leung et al, 2019; Nagakura et al, 2019; Akintola et al, 2017).

Lors d'épisodes douloureux tels que la mammite et le piétain (McLennan et al, 2016), la caudectomie (Guesgen et al, 2016), l'ostéotomie unilatérale du tibia (Häger et al, 2017) ou encore la castration (Durand et al, 2019), les ovins présentent les oreilles orientées vers le bas ou vers l'arrière (**tableau II, p.51**).

Les bovins présentent également les oreilles vers le bas ou vers l'arrière lors de marque au fer chaud (Müller et al, 2019), lors de mammite à *E.coli* (de Boyer des Roches et al, 2017) ou lors de boiterie, d'atteinte circulatoire, respiratoire, gastro-intestinale, de fracture, etc (Glerup et al, 2015 A) (**tableau III, p.52**).

Les chats orientent aussi leurs oreilles vers le bas lors de divers stimulus tels que la douleur liée à la stérilisation, à une biopsie cutanée, à une fracture, à une insuffisance rénale aiguë, etc (Evangelista et al, 2019; Holden et al, 2014) (**tableau IV, p.53**). Le pavillon de l'oreille devient alors moins visible et l'espace entre les deux oreilles devient plus grand pour les ovins, les chats et les bovins.

Les chevaux peuvent parfois présenter des oreilles orientées vers l'arrière et rigides lors de la castration (Dalla Costa et al, 2014), de traumatisme orthopédique (Van Loon et al, 2019; Dyson et al, 2017; Ask et al, 2020), de fourbure aiguë (Dalla Costa et al, 2016), de douleur à la tête (Van Loon et al, 2017), de troubles dentaires (Coneglian et al, 2020) ou de colique aiguë (Van Loon et al, 2014). Ils peuvent parfois présenter des oreilles dans une position asymétrique (les deux oreilles n'ont pas la même position) lors d'application de capsaïcine et de garrot sur le membre (Glerup et al, 2015) ou lors de boiterie (Dyson et al, 2017) (**tableau V, p.54**). Aucune différence significative n'a été observée dans le positionnement des oreilles lors de douleur causée par des ponctions folliculaires (Diego et al, 2016)

Les souris présentent principalement les oreilles vers l'arrière lors de douleur : cela a été montré lors de lésion de la moelle épinière (Heinsinger et al, 2020), de la vasectomie (Miller et al, 2016; Leach et al, 2012), d'une constriction abdominale avec de l'acide acétique (Langford et al, 2010), de drépanocytose (Mittal et al, 2016) ou encore lors de douleur neuropathique du trijumeau (Akintola et al, 2017). Lors de certaines de ces situations telles que la vasectomie, la constriction abdominale ou la drépanocytose, certaines souris ont présenté des oreilles écartées plutôt qu'orientées vers l'arrière. Aucune différence significative n'a été montrée dans la position des oreilles lors d'une douleur causée par une entaille de l'oreille (Miller et al, 2015) ou de colite (Chartier et al, 2020) (**tableau VI, p.56**).

Les rats ont la particularité d'avoir les oreilles qui se replient vers l'intérieur lors de douleur causée par une injection intra-plantaire ou intra-articulaire et par une laparotomie (Sotocinal et al, 2011), par une colite (Leung et al, 2019), par une fibromyalgie (Nagakura et al, 2019) ou encore par une douleur neuropathique du trijumeau (Akintola et al, 2017) (**tableau VI, p.56**).

**En résumé**, les positions d'oreilles observées lors de douleur sont variées même si l'on retrouve principalement des oreilles vers l'arrière ou vers le bas pour les ovins, bovins, chats, chevaux et souris tandis que les rats présentent des oreilles repliées vers l'intérieur généralement.

- **Région orbitaire**

La région orbitaire a été étudiée via la contraction des paupières chez les ovins (McLennan et al, 2016; Guesgen et al, 2016; Häger et al, 2017; Durand et al, 2019), les bovins (Müller et al, 2019; de Boyer des Roches et al, 2017; Yamada et al, 2021), les chats (Evangelista et al, 2019), les chevaux (Dalla Costa et al, 2014; Van Loon et al, 2019; Gleerup et al, 2015 B; Dalla Costa et al, 2016; Ask et al, 2020; Dyson et al, 2017; Van Loon et al, 2017; Diego et al, 2016; Coneglian et al, 2020; Van Loon et al, 2014), les souris (Miller et al, 2015; Heinsinger et al, 2020; Miller et al, 2016; Leach et al, 2012; Langford et al, 2010; Mittal et al, 2016; Chartier et al, 2020; Akintola et al, 2017) et les rats (Sotocinal et al, 2011; Leung et al, 2019; Nagakura et al, 2019; Akintola et al, 2017).

Les ovins ont présenté une contraction des paupières avec un œil fermé ou semi-fermé lors de mammite et piétain (McLennan et al, 2016), de caudectomie (Guesgen et al, 2016), d'ostéotomie unilatérale du tibia (Häger et al, 2017) et lors de castration (Durand et al, 2019) (**tableau II, p.51**).

Les bovins ont eux aussi présenté cette contraction des paupières allant jusqu'à la fermeture de l'œil lors de la castration (Yamada et al, 2021). Il n'y a cependant pas eu de différence significative de contraction des paupières lors de la marque au fer chaud (Müller et al, 2019) et lors d'une mammite à *E.coli* (de Boyer des Roches et al, 2017) (**tableau III, p.52**).

Les chats avaient l'œil plissé lors d'une douleur abdominale (Evangelista et al, 2019) (**tableau IV, p.53**).

Les chevaux avaient généralement les paupières contractées voire les yeux fermés lors de la castration (Dalla Costa et al, 2014), de traumatisme orthopédique (Van Loon et al, 2019), d'application de la capsaïcine ou de garrot sur un membre (Gleerup et al, 2015 B), de fourbure aiguë (Dalla Costa et al, 2016), de l'injection de LPS dans une articulation (Ask et al, 2020), de boiterie (Dyson et al, 2017), de douleur de la tête (Van Loon et al, 2017), de troubles dentaires (Coneglian et al, 2020) ou de colique aiguë (Van Loon et al, 2014). Cependant, certains individus ont à l'inverse présenté un écarquillement de l'œil lors de traumatisme orthopédique, de douleur de la tête ou de colique aiguë. De plus, des chevaux ont présenté une intensité plus marquée du regard lors de l'application de capsaïcine, d'un garrot sur un membre et de boiterie. Enfin, aucune différence significative n'a été montrée dans la contraction des paupières lors de douleur engendrée par des ponctions folliculaires (Diego et al, 2016) (**tableau V, p.54**).

Les souris ont présenté une contraction des paupières lors de lésion de la moelle épinière cervicale (Heinsinger et al, 2020), de vasectomie (Miller et al, 2016; Leach et

al, 2012), de constriction abdominale par de l'acide acétique (Langford et al, 2010), de drépanocytose (Mittal et al, 2016) et de douleur neuropathique du trijumeau (Akintola et al, 2017). Aucune différence significative de contraction des paupières n'a pu être montrée lors de douleur causée par une entaille de l'oreille (Miller et al, 2015) ou par une colite (Chartier et al, 2020) (**tableau VI, p.56**).

Enfin les yeux des rats étaient fermés ou semi-fermés lors d'injection intra-plantaire ou intra-articulaire et de laparotomie (Sotocinal et al, 2011), de colite (Leung et al, 2019), de fibromyalgie (Nagakura et al, 2019) et de douleur neuropathique du trijumeau (Akintola et al, 2017) (**tableau VI, p.56**).

La tension de la région orbitaire a également été étudiée chez les bovins (Müller et al, 2019; Yamada et al, 2021; Glerup et al, 2015 A) et les chevaux (Dalla Costa et al, 2014 et 2016; Ask et al, 2020; Dyson et al, 2017; Diego et al, 2016; Coneglian et al, 2020).

Les bovins ont présenté une tension au-dessus de l'œil lors de la castration (Yamada et al, 2021), lors de la marque au fer chaud (Müller et al, 2019) et lors de divers stimulus douloureux tels que la boiterie, des atteintes circulatoires, respiratoires, gastro-intestinales, génitales, etc. (Glerup et al, 2015 A) (**tableau III, p.52**).

Les chevaux avaient également une tension dans la zone orbitaire lors de la castration (Dalla Costa et al, 2014), de fourbure aiguë (Dalla Costa et al, 2016), de l'injection de LPS dans une articulation (Ask et al, 2020), de boiterie (Dyson et al, 2017) ou de troubles dentaires (Coneglian et al, 2020). Aucune différence significative n'a été montrée dans la tension de la région orbitaire lors de douleur engendrée par des ponctions folliculaires (Diego et al, 2016) (**tableau V, p.54**).

**En résumé**, les espèces de mammifères étudiées (ovins, bovins, chevaux, chats, souris, rats) présentent généralement des yeux semi-fermés ou fermés par la contraction des paupières lors de stimulus douloureux. Les chevaux peuvent parfois à l'inverse présenter des yeux écarquillés. De plus, les bovins et les chevaux peuvent présenter une tension dans la région orbitaire dans certaines situations.

- **Région nasale**

Cette région présente des unités d'action très différentes selon l'espèce étudiée.

Elle a été étudiée chez les ovins (McLennan et al, 2016; Guesgen et al, 2016; Durand et al, 2019), les bovins (Müller et al, 2019; Glerup et al, 2015 A), les chats (Evangelista et al, 2019; Holden et al, 2014), les chevaux (Dalla Costa et al, 2014; Van Loon et al, 2019; Glerup et al, 2015 B; Dalla Costa et al, 2016; Ask et al, 2020; Dyson et al, 2017; Van Loon et al, 2017; Diego et al, 2016; Coneglian et al, 2020; Van Loon et al, 2014), les souris (Miller et al, 2015; Heinsinger et al, 2020; Miller et al, 2016; Leach et al, 2012; Langford et al, 2010; Mittal et al, 2016; Chartier et al, 2020; Akintola et al, 2017) et les rats (Sotocinal et al, 2011; Leung et al, 2019; Nagakura et al, 2019; Akintola et al, 2017).

Chez les chevaux, les ovins et parfois les bovins, la taille des narines et l'apparence du nez ont été étudiées.

Les narines sont dilatées chez les chevaux subissant une castration sans analgésie (Dalla Costa et al, 2014), un traumatisme orthopédique (Van Loon et al, 2019), une application de capsaïcine ou un garrot sur un membre (Glerup et al, 2015), une



boiterie (Dyson et al, 2017), une douleur de la tête (Van Loon et al, 2017) ou une colique aiguë (Van Loon et al, 2014) (**tableau V, p.54**). Dans certains cas comme la fourbure aiguë (Dalla Costa et al, 2016), l'injection de LPS intra-articulaire (Ask et al, 2020) ou les troubles dentaires (Coneglian et al, 2020), les narines sont simplement tendues plutôt que dilatées. Enfin, aucune différence significative de taille de narines n'a été montrée lors de douleur provoquée par des ponctions folliculaires (Diego et al, 2016).

Chez les bovins, les narines sont dilatées lors de la marque au fer chaud (Müller et al, 2019) et lors de divers stimulus tels que la boiterie, des affections systémiques, une fracture, etc (Gleerup et al, 2015 A) ; lors de ce dernier cas, les narines peuvent également simplement être tendues (**tableau III, p.52**).

Chez les ovins, les narines apparaissent plutôt de taille diminuée lors d'un stimulus douloureux en raison de la tension dans le nez qui fait s'étirer les narines. Cela a notamment été montré lors de mammite et de piétain (McLennan et al, 2016) et lors de caudectomie (Guesgen et al, 2016). Lors de la castration des ovins (Durand et al, 2019), la taille des narines n'est pas significativement différente mais des rides apparaissent sur le mufle (**tableau II, p.51**).

Chez les souris et les rats, c'est l'apparence bombée du nez qui permet de déterminer si l'animal souffre ou non puisque ces animaux présentent un renflement dans la région nasale lorsqu'ils sont soumis à un stimulus douloureux tel qu'une lésion de la moelle épinière (Heinsinger et al, 2020), une vasectomie (Miller et al, 2016; Leach et al, 2012), une constriction abdominale par de l'acide acétique (Langford et al, 2010), la dépranocytose (Mittal et al, 2016), une injection intra-plantaire, intra-articulaire ou une laparotomie (Sotocinal et al, 2011), une colite chez les rats (Leung et al, 2019), une fibromyalgie (Nagakura et al, 2019) ou une douleur neuropathique du trijumeau (Akintola et al, 2017). Aucune différence significative n'a été observée en ce qui concerne le renflement du nez lors de douleur causée par une entaille de l'oreille (Miller et al, 2015) ou par une colite chez les souris (Mittal et al, 2016) (**tableau VI, p.56**).

Enfin, chez le chat, c'est la tension dans le nez qui révèle si l'animal est en situation de douleur ou non, avec une forme plus elliptique lors de douleur causée par une douleur abdominale (Evangelista et al, 2019) ou par divers stimulus tels que la stérilisation, des biopsies cutanées, des fractures, une insuffisance rénale aiguë (Holden et al, 2014) (**tableau IV, p.53**).

**En résumé**, l'expression de la douleur au niveau de la région nasale diffère en fonction des espèces concernées. Ces variations viennent principalement du fait que la région nasale est une région anatomique très différente entre les espèces. Les bovins, ovins et chevaux expriment la douleur au niveau de la région nasale principalement par la taille de leurs narines et la tension dans les narines ; les rats et les souris présentent plutôt un renflement du nez lorsqu'ils subissent un stimulus douloureux ; enfin les chats présentent une tension dans le nez.

- **Région buccale, mentonnière et région mandibulaire**

La région buccale et péri-buccale a été étudiée via la tension de la bouche et notamment des lèvres chez les ovins (McLennan et al, 2016; Guesgen et al, 2016; Häger et al, 2017; Durand et al, 2019), les bovins (Müller et al, 2019; Glerup et al, 2015 A; Yamada et al, 2021) et les chevaux (Dalla Costa et al, 2014; Van Loon et al, 2019; Glerup et al, 2015 B; Dalla Costa et al, 2016; Dyson et al, 2017; Van Loon et al, 2017; Diego et al, 2016; Coneglian et al, 2020; Van Loon et al, 2014).

Les ovins ont présenté une crispation de la mâchoire associée à un retroussement d'une ou des lèvres lors de mammite et de piétain (McLennan et al, 2016), de caudectomie (Guesgen et al, 2016), d'ostéotomie unilatérale du tibia (Häger et al, 2017) et lors de castration (Durand et al, 2019) (**tableau II, p.51**).

Les bovins ont présenté cette tension au-dessus de la bouche lors de la castration (Yamada et al, 2021) et un tonus des lèvres augmenté lors de divers stimulus (boiterie, affections gastro-intestinales, fracture, mammites... ; Glerup et al, 2015 A). Lors de la marque au fer chaud (Müller et al, 2019), ils présentaient une bouche ouverte. (**tableau III, p.52**).

La bouche des chevaux était crispée et les lèvres tendues voire retroussées lors de la castration (Dalla Costa et al, 2014), de traumatisme orthopédique (Van Loon et al, 2019), d'application de la capsaïcine ou de garrot sur un membre (Glerup et al, 2015 B), de fourbure aiguë (Dalla Costa et al, 2016), de boiterie (Dyson et al, 2017), de douleur de la tête (Van Loon et al, 2017), de troubles dentaires (Coneglian et al, 2020) ou de colique aiguë (Van Loon et al, 2014). Certains chevaux ont également présenté un grincement de dents lors de traumatisme orthopédique (Van Loon et al, 2019), de douleur à la tête (Van Loon et al, 2017) ou de colique aiguë (Van Loon et al, 2014). Enfin, aucune différence significative n'a été montrée dans la tension de la bouche ou des lèvres lors de douleur engendrée par des ponctions folliculaires (Diego et al, 2016) (**tableau V, p.54**).

La position des vibrisses a également été étudiée chez les espèces en possédant : les chats (Evangelista et al, 2019), les souris (Miller et al, 2015; Langford et al, 2010; Mittal et al, 2016; Chartier et al, 2020; Akintola et al, 2017) et les rats (Sotocinal et al, 2011; Leung et al, 2019; Nagakura et al, 2019; Akintola et al, 2017).

Lors d'une douleur abdominale, les chats ont présenté des vibrisses bien droites avec des mouvements vers l'avant (Evangelista et al, 2019) (**tableau IV, p.53**).

Les souris ont présenté des vibrisses agglutinées entre elles ou orientées vers l'arrière ou vers l'avant lors de la constriction abdominale avec de l'acide acétique (Langford et al, 2010), de drépanocytose (Mittal et al, 2016) ou de douleur neuropathique du trijumeau (Akintola et al, 2017). Il n'y a pas eu de différence significative dans la position des vibrisses lors d'entaille de l'oreille (Miller et al, 2015) et de colite (Chartier et al, 2020) (**tableau VI, p.56**).

Lors de douleur, les vibrisses des rats s'agglutinent également et la pointe des vibrisses s'éloignent du museau (en direction de l'arrière) : cela a été montré lors d'injection intra-plantaire et intra-articulaire et de laparotomie (Sotocinal et al, 2011), de colite aiguë (Leung et al, 2019), de fibromyalgie (Nagakura et al, 2019) et de douleur neuropathique du trijumeau (Akintola et al, 2017) (**tableau VI, p.56**).

Chez les chevaux, la tension du menton est également étudié : en effet, ces animaux présentent un menton plus marqué lors de la castration (Dalla Costa et al, 2014), d'application de capsaïcine ou de garrot sur un membre (Gleerup et al, 2015 B), de fourbure aiguë (Dalla Costa et al, 2016) ou de troubles dentaires (Coneglian et al, 2020). En revanche, il n'y avait pas de différence significative lors de ponctions folliculaires (Diego et al, 2016) (**tableau V, p.54**).

Enfin, pour étudier la région mandibulaire c'est généralement la tension des muscles masticateurs qui est étudiée : c'est le cas chez les ovins (McLennan et al, 2016; Guesgen et al, 2016), les bovins (Yamada et al, 2021; Gleerup et al, 2015 A), les chevaux (Dalla Costa et al, 2014; Van Loon et al, 2019; Gleerup et al, 2015 B; Dalla Costa et al, 2016; Van Loon et al, 2017; Diego et al, 2016; Coneglian et al, 2020; Van Loon et al, 2014).

Les ovins présentaient des joues plutôt convexes lors de mammite et de piétain (McLennan et al, 2016) alors qu'elles étaient plus creuses lors de la caudectomie (Guesgen et al, 2016) (**tableau II, p.51**).

Les muscles fasciaux des bovins et plus particulièrement les muscles masticateurs étaient contractés lors de la castration (Yamada et al, 2021) et de divers stimulus comme la boiterie, la mammite, les affections gastro-intestinales, circulatoires, respiratoires, etc. (Gleerup et al, 2015 A) (**tableau III, p.52**).

Enfin, les chevaux ont eu aussi présenté une certaine tension dans les muscles masticateurs lors de la castration (Dalla Costa et al, 2014), d'application de capsaïcine ou de garrot sur le membre (Gleerup et al, 2015 B), de fourbure aiguë (Dalla Costa et al, 2016) et lors de troubles dentaires (Coneglian et al, 2020). Ces mêmes muscles pouvaient présenter des fasciculations plutôt qu'une contraction fixe lors de traumatisme orthopédique (Van Loon et al, 2019), de douleur de la tête (Van Loon et al, 2017) ou de colique aiguë (Van Loon et al, 2014). En revanche, il n'y avait pas de différence significative lors de ponctions folliculaires (Diego et al, 2016) (**tableau V, p.54**).

Lors de l'étude de la douleur chez les souris et les rats, c'est le renflement des joues qui est étudié pour la région mandibulaire : ce renflement est présent lors de lésion de la moelle épinière cervicale (Heinsinger et al, 2020), de vasectomie (Miller et al, 2016; Leach et al, 2012), de la constriction abdominale avec de l'acide acétique (Langford et al, 2010), de drépanocytose (Mittal et al, 2016), d'injection intra-plantaire, intra-articulaire ou de laparotomie (Leach et al, 2012), de colite aiguë chez le rat (Leung et al, 2019), de fibromyalgie (Nagakura et al, 2019) et de douleur neuropathique du trijumeau (Akintola et al, 2017). Aucune différence significative n'a été observée lors d'entaille de l'oreille (Miller et al, 2015) et de colite chez la souris (Chartier et al, 2020) (**tableau VI, p.56**).

**En résumé**, l'expression de la douleur au niveau de la région buccale et péri-buccale est également très différente en fonction des espèces. Les bovins, ovins et chevaux présentent principalement une tension de la bouche, des lèvres et des muscles masticateurs avec la particularité chez les chevaux de présenter également des fasciculations et des grincements de dents. Les souris et les rats présentent plutôt un renflement des joues lorsqu'ils subissent un stimulus douloureux associé à une agglutination des vibrisses, pouvant être orientées plutôt vers l'arrière ou vers l'avant. Les vibrisses des chats font également des mouvements vers l'avant.

## b. Modifications des zones selon le type de douleur : locale ou systémique

Certains stimuli douloureux sont d'origine locale et d'autres sont d'origine systémique. La partie suivante a donc pour but de déterminer si les expressions faciales peuvent permettre de discriminer l'origine de la douleur.

Il existe très peu de d'études sur les expressions faciales ayant utilisé un stimulus douloureux à l'origine d'une douleur systémique.

Seuls les souris (Miller et al, 2016; Leach et al, 2012; Langford et al, 2010; Mittal et al, 2016; Chartier et al, 2020; Akintola et al, 2017), les rats (Sotocinal et al, 2011; George et al, 2019; Leung et al, 2019; Nagakura et al, 2019; Akintola et al, 2017) et les chats (Evangelista et al, 2019) ont fait l'objet de ce type d'étude. Concernant les chevaux, une seule étude présente un stimulus douloureux systémique (colique aiguë, Van Loon et al, 2014). La douleur systémique chez les bovins a également fait partie d'une étude mais les stimulus douloureux étaient variés, systémiques et locaux et les résultats n'étaient pas différenciés en fonction du type de stimulus (Gleerup et al, 2015 A). C'est également le cas chez le chat lors de l'étude Holden et al (2014).

La seule différence relevée chez les rongeurs lors de la comparaison des expressions faciales en fonction du type de douleur est la **position des oreilles** chez le rat : les oreilles sont repliées vers l'intérieur et penchées vers l'avant lors de douleur systémique et cette position est plus marquée que lors d'un stimulus douloureux localisé (Sotocinal et al, 2011, **tableau VI, p.56**).

Enfin, les bovins de l'étude Gleerup et al (2015 A), ayant une douleur causée par des stimuli locaux et systémiques, ont présenté un œil creux alors que ce n'était pas le cas lors des études utilisant seulement un stimulus douloureux localisé (Yamada et al, 2021; Müller et al, 2019; de Boyer des Roches et al, 2017). Ce résultat peut possiblement être dû à la diversité des types de stimuli et donc au fait que certains bovins subissent une douleur systémique dans cette étude (**tableau III, p.52**).

**En résumé**, face à un stimulus douloureux, les expressions faciales des bovins, ovins, chevaux, rongeurs et chats sont modifiées par rapport à une situation sans douleur : de nombreuses similitudes sont observées entre les bovins, les ovins et les chevaux tandis que les rongeurs et les chats partagent des expressions communes notamment au niveau des vibrisses.









Les grilles d'évaluation de la douleur composées des expressions faciales sont donc prometteuses car elles sont faciles à utiliser et nécessitent peu de temps et de formation pour les observateurs (Langford et al, 2010; Dalla Costa et al, 2014). De plus, elles semblent efficaces pour déterminer si l'animal ressent de la douleur ou non.

Cependant, les stimulus douloureux utilisés dans ces études sont principalement voire exclusivement à l'origine de douleur localisée. Le manque de littérature sur le sujet ne permet donc pas de déterminer si les expressions faciales pourraient permettre de discriminer le type de douleur.




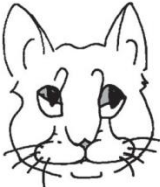

**Tableau II : Description des unités d'action pour les différentes régions chez les ovins lors de divers épisodes douloureux** (NR = non renseigné = le paramètre n'a pas été étudié ; NO = non observé = résultat non significatif lors de l'étude)

REFERENCE	SOURCE DE DOULEUR	TYPE DE DOULEUR	YEUX		NARINES/MUFLE	OREILLES	BOUCHE	VIBRISSES	MENTON	MUSCLES (MASTICATEURS ESSENTIELLEMENT)
			CONTRACTION DES PAUPIERES	TENSION AUTOUR DE L'ŒIL						
MCLENNAN ET AL. 2016	Mammite	Locale	Œil fermé / semi-fermé	NR	Nez en V, philtrum plus court	Vers le bas ou l'arrière, pavillon vers le bas, moins visible	Mâchoire droite à concave, lèvre inférieure retroussée	NR	NR	Joue convexe, arcade zygomatique marquée
	Piétain									
GUESGEN ET AL. 2016	Caudectomie	Locale	Contraction des paupières/ œil fermé	NR	Diminution taille des narines, nez en V	Vers l'arrière ou le bas, pavillon non visible	Lèvres aplaties et contractées	NR	NR	Joues plates voire creuses
HÄGER ET AL. 2017	Ostéotomie unilatérale du tibia	Locale	Œil fermé / semi-fermé	NR	NR	Aplaties à pendantes	Flehmen	NR	NR	NR
DURAND ET AL. 2019	Castration	Locale	Œil fermé / semi-fermé	NR	Rides sur le mufle	Vers l'arrière ou le bas	Lèvre supérieure ou les deux retroussées	NR	NR	NR

**Tableau III : Description des unités d'action pour les différentes régions chez les bovins lors de divers épisodes douloureux** (NR = non renseigné = le paramètre n'a pas été étudié ; NO = non observé = résultat non significatif lors de l'étude)









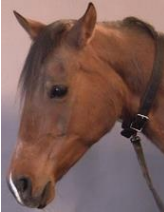

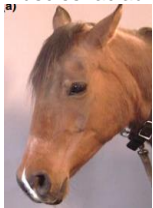




REFERENCE	SOURCE DE DOULEUR	TYPE DE DOULEUR	YEUX		NARINES/MUFLE	OREILLES	BOUCHE	VIBRISSES	MENTON	MUSCLES (MASTICATEURS ESSENTIELLEMENT)
			CONTRACTION DES PAUPIERES	TENSION AUTOUR DE L'ŒIL						
YAMADA ET AL. 2021	Castration	Locale	Œil fermé ou contraction des paupières	Elévation des sourcils = tension au-dessus de l'œil	NR	NR	Tension muscles au-dessus de la bouche	NR	NR	Tensions des muscles masticateurs + joue convexe
MÜLLER ET AL. 2019	Marque au fer chaud	Locale	NO	Sourcils interne et externe levés 	Narines dilatées 	Lâches vers l'arrière 	Bouche ouverte 	NR	NR	NO
DE BOYER DES ROCHES ET AL. 2017	Mammite à <i>E.coli</i>	Locale	NO	NR	NR	Vers le bas, distance accrue entre les 2 et pavillon vers le bas	NR	NR	NR	NR
GLEERUP ET AL. 2015 A	Boiterie, atteinte circulatoire, respiratoire, gastro-intestinale, génitale, mammite, cétose, fracture, blessure du tégument, atteinte du pied	Locale ou systémique	NR	Tension du contour des yeux, œil enfoncé 	Naseaux tendus, parfois dilatés 	Basses, sur le côté et pavillon vers l'avant 	Tonus des lèvres augmenté	NR	NR	Tension des muscles faciaux 

**Tableau IV : Description des unités d'action pour les différentes régions chez les chats lors de divers épisodes douloureux** (NR = non renseigné = le paramètre n'a pas été étudié ; NO = non observé = résultat non significatif lors de l'étude)




REFERENCE	SOURCE DE DOULEUR	TYPE DE DOULEUR	YEUX		NARINES/MUFLE	OREILLES	BOUCHE	VIBRISSES	MENTON	MUSCLES (MASTICATEURS ESSENTIELLEMENT)
			CONTRACTION DES PAUPIERES	TENSION AUTOUR DE L'ŒIL						
<b>EVANGELISTA ET AL. 2019</b>	Douleur abdominale	Systémique	Œil plissé 	NR	Nez tendu (elliptique)	Vers le bas, pavillon vers le bas 	NR	Droites, mouvement vers l'avant 	NR	NR
<b>HOLDEN ET AL. 2014</b>	Stérilisation, biopsie cutanée, fracture, douleurs abdominales, insuffisance rénale aiguë	Locale et systémique	NR	NR	Nez tendu (elliptique) 	Vers le bas et le côté, pavillon vers le bas 	NR	NR	NR	NR












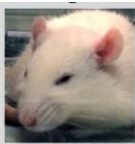


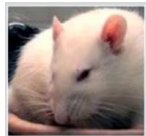

**Tableau V : Description des unités d'action pour les différentes régions chez les chevaux lors de divers épisodes douloureux** (NR = non renseigné = le paramètre n'a pas été étudié ; NO = non observé = résultat non significatif lors de l'étude)



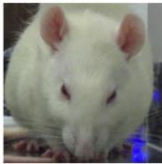

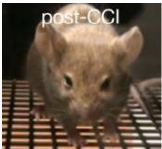
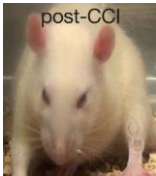
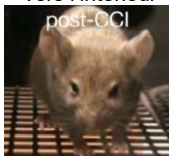

REFERENCE	SOURCE DE DOULEUR	TYPE DE DOULEUR	YEUX		NARINES/MUFLE	OREILLES	BOUCHE	VIBRISSES	MENTON	MUSCLES (MASTICATEURS ESSENTIELLEMENT)
			CONTRACTION DES PAUPIERES	TENSION AUTOUR DE L'ŒIL						
DALLA COSTA ET AL. 2014	Castration	Locale	Œil fermé ou semi-fermé 	Tension augmentée, reliefs osseux visibles 	Naseaux tendus, légèrement dilatés 	Tendues vers l'arrière 	Lèvres tendues, bouche crispée 	NR	Menton marqué 	Tension des muscles masticateurs 
VAN LOON ET AL. 2019	Traumatisme orthopédique	Locale	Œil fermé OU écarquillé	NR	Narines dilatées	Vers l'arrière	Flehmen ou grincement de dents	NR	NR	Fasciculations
GLEERUP ET AL. 2015 B	Application de capsaïcine  Garrot sur l'antébrachium	Locale	Tension des paupières, regard intense 	NR	Narines dilatées en "carré"	Asymétriques ou pavillon vers le bas 	Tension des lèvres 	NR	Tension du menton	Tension des muscles faciaux 
DALLA COSTA ET AL. 2016	Fourbure aiguë	Locale	Contraction des paupières	Tension du contour des yeux	Narines tendues	Raides vers l'arrière	Bouche tendue	NR	Menton prononcé	Tension et proéminence
ASK ET AL. 2020	LPS intra-articulaire	Locale	Contraction des paupières	Tension du contour des yeux	Narines tendues	Raides vers l'arrière	NR	NR	NR	NR
DYSON ET AL. 2017	Boiterie + monte	Locale	Tension des paupières, regard intense 	Tension du contour des yeux	Ride entre les narines + narines arrondies 	Vers l'arrière ou asymétriques 	Visibilité gencives/dents 	NR	NR	NR



<b>VAN LOON ET AL. 2017</b>	Douleur aiguë ou post-opératoire de la tête	Locale	Contraction des paupières OU œil écarquillé	NR	Narines dilatées	Vers l'arrière	Flehmen ou grincement de dents	NR	NR	Fasciculations
<b>DIEGO ET AL. 2016</b>	Ponctions folliculaires	Locale	NO	NO	NO	NO	NO	NR	NO	NO
<b>CONEGLIAN ET AL. 2020</b>	Troubles dentaires	Locale	Contraction des paupières	Tension du contour des yeux	Narines tendues 	Rigides vers l'arrière 	Bouche tendue 	NR	Menton prononcé	Tension des muscles masticateurs
<b>VAN LOON ET AL. 2014</b>	Colique aiguë	Systémique	Contraction des paupières OU œil écarquillé	NR	Narines dilatées	Vers l'arrière	Flehmen ou grincement de dents	NR	NR	Fasciculations

**Tableau VI : Description des unités d'action pour les différentes régions chez les rongeurs lors de divers épisodes douloureux** (NR = non renseigné = le paramètre n'a pas été étudié ; NO = non observé = résultat non significatif lors de l'étude)

REFERENCE + ESPECE	SOURCE DE DOULEUR	TYPE DE DOULEUR	YEUX		NARINES/MUFLE	OREILLES	BOUCHE	VIBRISSES	MENTON	MUSCLES (MASTICATEURS ESSENTIELLEMENT)
			CONTRACTION DES PAUPIERES	TENSION AUTOUR DE L'ŒIL						
MILLER ET AL. 2015 SOURIS	Entaille de l'oreille	Locale	NO	NR	NO	NO	NR	NO	NR	NO
HEINSINGER ET AL. 2020 SOURIS	Lésion moelle épinière cervicale	Locale	Contraction des paupières	NR	Renflement du nez	Oreilles vers l'arrière	NR	NR	NR	Renflement des joues
MILLER ET AL. 2016; LEACH ET AL. 2012 SOURIS	Vasectomie	Systémique	Contraction des paupières	NR	Renflement du nez	Oreilles écartées OU vers l'arrière	NR	NR	NR	Renflement des joues
LANGFORD ET AL. 2010 SOURIS	Constriction abdominale avec acide acétique	Systémique	Contraction des paupières 	NR	Renflement du nez 	Oreilles écartées OU vers l'arrière 	NR	Agglutinées OU vers l'arrière OU vers l'avant 	NR	Renflement des joues 
MITTAL ET AL. 2016 SOURIS	Drépanocytose	Systémique	Contraction des paupières 	NR	Renflement du nez 	Oreilles écartées OU vers l'arrière 	NR	Agglutinées OU vers l'arrière OU vers l'avant	NR	Renflement des joues 
CHARTIER ET AL. 2020 SOURIS	Colite et cancer colorectal	Systémique	NO	NR	NO	NO	NR	NO	NR	NO
SOTOCINAL ET AL. 2011 RAT	Injection intra-plantaire ou intra-articulaire <hr/> Laparotomie	Locale <hr/> Systémique	Œil fermé ou semi-fermé 	NR	Renflement du nez 	Repliées vers l'intérieur, penchées vers l'avant (moins marqué lors de l'injection) 	NR	Agglutinées et s'éloignent du museau 	NR	Renflement des joues 

GEORGE ET AL, 2019 RAT	Mucite	Systemique	ECHELLE NON VALIDEE							
LEUNG ET AL, 2019 RAT	Colité aiguë et chronique	Systemique	Œil fermé ou semi-fermé	NR	Renflement du nez	Repliées vers l'intérieur, penchées vers l'avant	NR	Agglutinées et s'éloignent du museau	NR	Renflement des joues
NAGAKURA ET AL. 2019 RAT	Fibromyalgie	Systemique	Œil fermé ou semi-fermé 	NR	Renflement du nez 	Repliées vers l'intérieur, penchées vers l'avant 	NR	Agglutinées et s'éloignent du museau	NR	Renflement des joues 
AKINTOLA ET AL. 2017 RAT + SOURIS	Douleur neuropathique du trijumeau	Systemique	Œil semi-fermé post-CCI 	NR	Renflement du nez post-CCI 	Vers l'arrière ou repliées vers l'intérieur post-CCI 	NR	Agglutinées et s'éloignent du museau	NR	Renflement des joues post-CCI 



## PARTIE EXPERIMENTALE

### **I. Introduction de l'étude expérimentale**

La partie bibliographique a montré qu'il y avait peu d'études traitant de l'expression faciale de la douleur chez les bovins. En effet, seuls la castration, la mammite à *E.coli*, le marquage au fer chaud ont été étudiés, ainsi qu'un mélange de stimulus au sein d'une même étude (Gleerup et al., 2015). C'est pourquoi la seconde partie de cette thèse aura pour but d'étudier les modifications de l'expression faciale des bovins laitiers dans deux contextes douloureux. La première expérience a utilisé un stimulus douloureux localisé avec une injection de LPS intra-mammaire et la seconde expérience a utilisé un stimulus douloureux systémique avec l'injection de LPS dans la veine jugulaire.

### **II. Expérience 1 : Etude des expressions faciales chez les bovins laitiers lors d'inflammation localisée**

#### **1. Objectif**

L'objectif de cette étude est de caractériser les expressions faciales de vaches lorsqu'elles ressentent de la douleur ou non, cette douleur étant provoquée par une épreuve inflammatoire mammaire.

#### **2. Matériel et méthodes**

Cette étude a été autorisée par le comité d'éthique C2EA-02 et par le Ministère de l'enseignement et de la recherche (APAFIS # 17251-2015043014541577). La directive 2010/63/EU a été respectée. Elle a été financée par le Métaprogramme GISA (Gestion Intégrée de la Santé Animale) de l'INRAE (projet LongHealth), de VetAgro Sup (projet Formation par la Recherche 2019) et de CEVA Santé Animale.

Deux thèses vétérinaires (Rautenbach, 2019; David, 2020) ont été réalisées à partir du même dispositif expérimental ; c'est pourquoi j'ai repris certains éléments de méthodes.

##### **a. Animaux**

Cette étude s'est déroulée du 4 février au 22 mars 2019, à Marcenat (Cantal, France), sur le site de l'Unité de recherche expérimentale Herbipôle de l'INRAE. Trois sessions de 4 jours ont été définies pour observer les vaches.

Les vaches laitières appartenaient à un groupe social de 28 vaches depuis début janvier 2019. Elles étaient primipares, de race Prim'Holstein, à 128,9 jours de lactation en moyenne (variation de 100 à 163 jours) au moment de l'étude. Elles étaient logées dans un parc de 244 m<sup>2</sup> comprenant 28 logettes équipés de matelas en caoutchouc et de 28 places au cornadis, une pierre à sel, une brosse rotative automatique et un abreuvoir de 2,22 mètres de long. Elles recevaient une ration totale mélangée composée de foin, regain, correcteur azoté et énergétique ainsi que de minéraux. Elle était distribuée le matin à 10h puis repoussée quatre fois manuellement (à 13h, 15h, 20h, 8h le lendemain matin).

Les 28 vaches étaient traitées deux fois par jour, à 7h30 et 16h30, dans une salle en épi de 28 places avec décrochage automatique (2 rangées de 14 places).

Afin d'éviter les comportements d'expression de chaleurs au cours de l'étude, un protocole de synchronisation a été effectué un mois avant l'étude sur les vaches non gestantes du lot. Aucune mammites n'a été détectée dans le lot au cours du mois précédant l'étude.

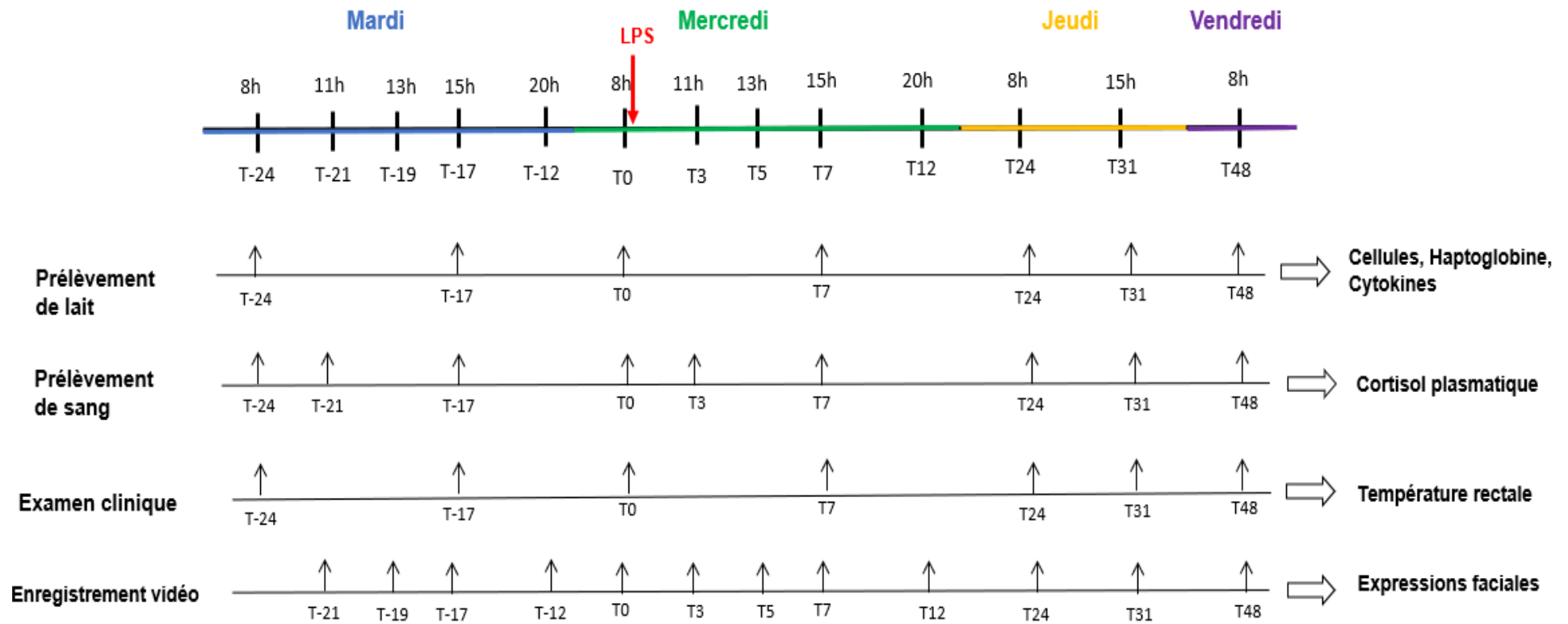
## b. Procédures

L'inflammation intra-mammaire a été provoquée sur les 28 vaches à T0 (**figure n°8**), à la fin de la traite du matin (mercredi pour chaque session), par l'infusion intra-mammaire de lipopolysaccharide (LPS) de *Escherichia coli* (*E.coli*). La solution de LPS était conditionnée en seringues stériles à utilisation unique et congelée à -20°C. Le volume était de 5mL. Chaque seringue comportait 25µg de LPS (Ultrapure LPS, *E.coli* 0111 :B4, référence : tlr-3pelps, InVivogen, Etats-Unis) dilués dans un tampon phosphate salin (PBS, *phosphate buffered saline*). Elles ont été préparées par le laboratoire de P.Germon (UMR 1282 Infectiologie et Santé Publique, INRAE Centre Val de Loire, 37380 Nouzilly). Cette concentration a été choisie car elle induit une réponse modérée qui n'excède pas 24h et elle permet de comparer nos résultats à d'autres études conduites en système à l'attache (Fitzpatrick et al, 2013; Siivonen et al, 2011; Zimov et al, 2011).

Le quartier dans lequel la solution a été infusée devait remplir plusieurs conditions :

1. Le comptage en cellules somatiques dans le lait de mélange (4 quartiers) de la semaine précédant l'épreuve devait être inférieur à 120 000/mL, les données étant fournies par le laboratoire LIAL Massif Central (Aurillac, 15).
2. L'absence macroscopique de pousse bactérienne après l'ensemencement de géloses sang de mouton (ThermoFisher Scientific®, Etats-Unis) avec une goutte de lait prélevée stérilement le matin de la veille de l'infusion (T-24) puis incubées pendant 24h à 37°C.
3. Le comptage en cellules somatiques du quartier concerné devait être inférieur à 100 000/mL, 17h avant l'infusion (T-17). Le comptage a été réalisé à l'aide d'un compteur cellulaire DCC DeLaval (DeLaval Corporate, Suède).

L'injection intra-mammaire a été réalisée par un trayeur d'Herbipôle formé, à l'aide d'une canule à trayon, en salle de traite et après décrochage de la dernière griffe, soit entre 8h21 et 8h40. Un vétérinaire était présent. Le trayeur qui a réalisé l'infusion était celui en charge des traites toute la semaine d'observation. La procédure débutait par un nettoyage aseptique de l'orifice du trayon à l'aide d'alcool isopropylique à 70%, suivi de l'introduction de la canule et de l'injection de la solution puis d'un massage de la base du trayon. La réalisation aseptique de la procédure a été vérifiée par bactériologie du lait du quartier infusé (même protocole que décrit au point 2., réalisé 12h et 24h après infusion).



**Figure 8 : Calendrier des prélèvements et des mesures lors de l'étude sur la douleur mammaire**

Les 28 vaches (numérotées de 1 à 28) ont ensuite été réparties en deux traitements expérimentaux, de manière équilibrée et aléatoire (14 vaches par traitement) :

- Un groupe de 14 vaches appelé « groupe PHY » : ces vaches ont reçu, en plus du LPS, une injection intramusculaire de sérum physiologique (0,9% de NaCl, 3mL/100kg) dans l'encolure, dans les 20 minutes suivant la sortie de traite le mercredi matin.
- Un groupe de 14 vaches appelé « groupe AINS » : ces vaches ont reçu, en plus du LPS, une injection intramusculaire d'un anti-inflammatoire non stéroïdien (Ketoprofen, 3mg/kg PV, Ketofen ®) dans l'encolure, dans les 20 minutes suivant la sortie de traite le mercredi matin. Cet AINS a été choisi car il possède une AMM chez la vache laitière et il est indiqué dans le traitement de l'inflammation, de la douleur ou de la fièvre dans les cas d'œdèmes mammaires (ANSES, 2019).

Trois séries d'observations ont été réalisées pour faciliter les manipulations :

- 4 vaches du groupe PHY (et 4 vaches du groupe AINS) ont été infusées le 6 février 2019.
- 5 vaches du groupe PHY (et 5 vaches du groupe AINS) ont été infusées le 27 février 2019.
- 5 vaches du groupes PHY (et 5 vaches du groupe AINS) ont été infusées le 20 mars 2019.

Dans la suite de notre étude, seules les vaches du groupe PHY (n=14) ont été utilisées.

### c. Points limites

L'état de santé des animaux faisait l'objet d'un suivi deux fois par jour (**figure n°8**), par des examens cliniques réalisés par un vétérinaire, après avoir placé les vaches au cornadis. Dès lors qu'un animal présentait un trouble de santé, il était soigné et le vétérinaire praticien de l'élevage était consulté pour mettre en place un traitement si besoin.

Toute vache présentant une mammite ou toute autre affection avant l'étude était exclue du protocole. Si une vache présentait une mammite pendant l'essai, elle était soignée en respectant le protocole de soins établi avec le vétérinaire praticien et elle continuait le protocole. Si une vache présentait des signes pouvant perturber les résultats de l'étude tels que des signes de boiterie ou de toute autre pathologie ou encore des signes de chaleurs, elle était retirée de l'étude.

Le point limite qui justifiait une exclusion du protocole était une température supérieure à 42,5°C pendant 4h consécutives associée à un score supérieur à 12 selon la grille de de Boyer des Roches (2017). Le vétérinaire praticien administrait alors un traitement adapté à la pathologie lors d'une consultation. Si l'état de santé revenait à la normale, l'essai était alors repris ou reconduit, sinon il était définitivement stoppé. Une fois l'étude terminée, les animaux ont tous réintégré le troupeau de l'unité expérimentale.



#### d. Observations

Les observations ont été réalisées à différents temps selon les paramètres observés, entre T-24 et T48 (**figure n°8**). Elles ont donc débuté 24h avant l'épreuve et se sont terminées 48h après. Ces temps ont été définis en croisant les données de la bibliographie (Fitzpatrick et al, 2013; Siivonen et al, 2011; Zimov et al, 2011).

##### i. Paramètres biochimiques et physiologiques

###### ❖ Prélèvement de sang

Des prélèvements de 5mL de sang ont été collectés lorsque les vaches étaient bloquées au cornadis, dans des tubes contenant du Na<sub>2</sub>-EDTA par deux vétérinaires aux temps suivants : T-24, T-21, T-17, T0, T3, T7, T24, T31, T48 (**figure n°8**). Ces prélèvements ont été centrifugés puis conservés congelés à -20°C.

La concentration en cortisol a été déterminée par un dosage ELISA par compétition au Laboratoire de Dosages Hormonaux de l'INRAE (UMR-PRC, INRA Centre Val de Loire, 37380 Nouzilly).

###### ❖ Température rectale

La température rectale a été prise en suivant la traite du matin et du soir, par un vétérinaire à l'aide d'un thermomètre électronique digital grands animaux (K-jump health Co Ltd Taiwan) aux temps suivants : T-24, T-17, T0, T7, T24, T31, T48 (**figure n°8**).

###### ❖ Prélèvement de lait

Des prélèvements de lait ont été effectués avant le début de la traite sur toutes les vaches par l'ingénieur d'études de la station INRAE Herbipôle aux 7 temps suivants : T0, T7, T24, T31, T48. Ils ont été conservés sous couvert du froid (+4°C). Ils ont permis de suivre l'évolution du comptage des cellules somatiques, de la concentration en haptoglobine et des concentrations en cytokines.

###### ○ Comptage des cellules somatiques (CCS)

Les comptages ont été effectués par Fluorescence (Fossmatic model 90 apparatus ; Foss Food Technology, Hillerod, Denmark) par le laboratoire de P.Germon (UMR 1282 Infectiologie et Santé Publique, INRA Centre Val de Loire, 37380 Nouzilly).

###### ○ Haptoglobine

La concentration en haptoglobine a été déterminée par ELISA (Bio-X Diagnostics Rochefort-Belgium) par le laboratoire UMR IHAP (Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, 31300 Toulouse, France).

###### ○ Cytokines

Le prélèvement de lait a permis le suivi des taux des cytokines suivantes : interleukine 6, interleukine 1b, interleukine 8. La concentration a été déterminée par un kit Tri-delta ELISA (Lesueur et al., 2022). Les analyses ont été effectuées à l'INRAE de Nouzilly (37380).

## ii. Expressions faciales

### ❖ Enregistrement vidéo

Le comportement des 28 vaches PHY et AINS a été enregistré par vidéo à l'aide d'un caméscope (PANASONIC CAMESCOPE HC-VX870 4K, Japon) de T-21 à T48 (**figure n°8**), soit 12 vidéos à 12 temps différents pour chaque vache : T-21, T-19, T-17, T-12, T0 (juste avant l'infusion du LPS), T3, T5, T7, T12, T24, T31, T48.

Les enregistrements vidéos ont toujours eu lieu avant les autres interventions (prise de sang, traite, etc...). Ils ont été réalisés par Alice DE BOYER DES ROCHES assistée d'une étudiante de Master 2, Charlotte BAGNARD.

Les vaches ont été filmées de manière individuelle, principalement de profil. Le bovin était filmé de loin pendant environ 2 minutes afin de s'habituer à la présence du manipulateur puis un zoom était réalisé sur la tête de l'animal pendant 1 minute. Les vidéos ont ensuite été visualisées par Laure GINGER (Doctorante en comportement animal), qui s'est chargée de découper ces vidéos de 3 minutes en séquences de 40 secondes (ou 30 secondes), prélevées pendant le zoom sur la tête de la vache.

Si la vidéo présentait une qualité médiocre ne permettant pas d'analyser correctement la séquence (tête non visible, luminosité faible, mauvais angle), celle-ci était exclue de l'étude.

### ❖ Ethogramme utilisé

Laure GINGER a réalisé un éthogramme détaillé à partir des données bibliographiques (Lambert et al, 2018; Glerup et al, 2015 A; Dalla Costa et al, 2014) ainsi que des expressions observées dans les vidéos.







Pour construire cet éthogramme, la face de la vache a été divisée en différentes zones (**ANNEXE n°1**):

- La zone orbitaire
- La zone buccale et péribuccale qui regroupe la région nasale, la région buccale, la région mandibulaire et le menton.
- La zone auriculaire

Pour chaque zone (**tableaux VII à IX**) , Laure GINGER a défini :





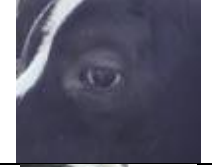





- Des états : comportement qui dure, défini par une durée.
- Des événements : interaction ponctuelle et rapide, définie par une fréquence d'apparition.

**Tableau VII : Ethogramme décrivant la zone orbitaire lors de l'étude sur l'inflammation mammaire**

NOM DU PARAMETRE	DESCRIPTION	ILLUSTRATIONS*	VARIABLE UTILISEE
<b>Œil ouvert</b>	Globe oculaire visible en entier, la paupière ne descend pas, la sclère est en partie visible.		Durée en secondes
<b>Œil mi-clos</b>	Globe oculaire visible partiellement, la paupière est semi-fermée.		Durée en secondes
<b>Œil clos</b>	Globe oculaire non visible, la paupière est complètement visible.		Durée en secondes
<b>Œil écarquillé</b>	Globe oculaire et sclère visibles entièrement, la paupière n'est pas visible.		Durée en secondes
<b>Œil non visible</b>	Œil non visible (vache qui tourne la tête, élément extérieur qui masque l'œil, caméra éloignée, mauvaise luminosité, ...).		Durée en secondes
<b>Clignement</b>	Paupière qui s'abaisse et se relève aussitôt, en moins d'une seconde.		Fréquence (nombre/40 secondes)
<b>Contraction</b>	Paupière qui s'abaisse et se relève plus lentement avec une contraction de la paupière.		Fréquence (nombre/40 secondes)
<b>Larme</b>	Larme qui s'écoule de l'œil ouvert.		Fréquence (nombre/40 secondes)

\*Photographies : © UMR-Herbivores équipe CARAIBE

**Tableau VII (suite) : Ethogramme décrivant la zone orbitaire lors de l'étude sur l'inflammation mammaire**

NOM DU PARAMETRE	DESCRIPTION	ILLUSTRATIONS*	VARIABLE UTILISEE
<b>Œil humide</b>	Film lacrymal visible.		Présence
	Pas de film lacrymal.		Absence
	Non visible.		Non visible
<b>Écoulement de l'œil</b>	Œil qui suinte/coule au niveau du coin médial. Il peut être plus ou moins humide.		Présence
	Pas d'écoulement de l'œil.		Absence
	Non visible.		Non visible
<b>Œil creux</b>	Œil enfoncé dans l'orbite, creux possible au-dessus/en-dessous de la paupière.		Présence
	Pas d'enfoncement de l'œil dans l'orbite.		Absence
	Non visible.		Non visible
<b>Gonflement de l'arcade sourcilière</b>	L'arcade osseuse est plus proéminente qu'à l'accoutumée.		Présence
	L'arcade a un volume normal.		Absence
	Non visible.		Non visible
<b>Stries de l'arcade sourcilière</b>	L'arcade présente des stries en partie médiale.		Présence
	Pas de stries, l'arcade sourcilière est lisse.		Absence
	Non visible.		Non visible

\*Photographies : © UMR-Herbivores équipe CARAIBE

**Tableau VIII : Ethogramme décrivant la zone buccale et péri-buccale lors de l'étude sur l'inflammation mammaire**

NOM DU PARAMETRE	DESCRIPTION	ILLUSTRATIONS*	VARIABLE UTILISEE
<b>Mufle immobile</b>	Le mufle ne fait pas de mouvements depuis au moins deux secondes.		Durée en secondes
<b>Mufle mobile</b>	Le mufle effectue des mouvements : retoussement, dilatation des narines, etc...		Durée en secondes
<b>Mufle mobile mange</b>	Le mufle est en mouvement car la vache est en train de manger.		Durée en secondes
<b>Mufle mobile rumine</b>	Le mufle est en mouvement car la vache rumine. On observe des mouvements latéraux de la mâchoire inférieure.		Durée en secondes
<b>Mufle non visible</b>	Mufle non visible car la vache tourne la tête ou élément extérieur masquant le mufle, caméra trop éloignée, luminosité faible, etc.		Durée en secondes
<b>Mouvements du mufle</b>	Mouvement du mufle du bas vers le haut, retoussement.		Fréquence (nombre/40 secondes)
<b>Dilatations de narine</b>	Les narines s'écartent l'une de l'autre et augmentent de volume.		Fréquence (nombre/40 secondes)
<b>Écoulement du mufle</b>	Liquide s'écoulant des narines, jetage (muqueux, purulent, mixte).		Présence
	Mufle sans écoulement, pouvant être humide.		Absence
	Non visible.		Non visible
<b>Muscles/veines proéminents</b>	Muscles et veines du chanfrein bien visibles, contours marqués.		Présence
	Chanfrein lisse.		Absence
	Non visible.		Non visible

\*Photographies : © UMR-Herbivores équipe CARAIBE

Au total, 11 positions d'oreilles (**tableau IX**) ont été définies, selon 3 axes :

- L'axe horizontal qui représente la vache de la tête à la queue :
  - Oreille vers l'avant : la pointe de l'oreille est dirigée vers le museau de la vache.
  - Oreille vers l'arrière : la pointe de l'oreille est dirigée vers l'arrière de la vache.
  - Oreille au milieu : la pointe de l'oreille est sur un axe perpendiculaire à l'axe horizontal.
  
- L'axe vertical qui représente l'axe entre le sol et le ciel :
  - Oreille vers le haut : la pointe de l'oreille est orientée vers le ciel.
  - Oreille vers le bas : la pointe de l'oreille est orientée vers le sol.
  - Oreille au centre : la pointe de l'oreille est en position centrale.
  
- L'orientation du pavillon de l'oreille lorsque l'observateur est face à la vache :
  - Pavillon vers l'avant : le pavillon est visible en entier.
  - Pavillon vers l'arrière : le pavillon n'est pas visible.
  - Pavillon vers le côté : le pavillon est orienté parallèlement à l'axe horizontal, il est visible en partie.
  - Pavillon vers le bas : il est visible en partie et il est orienté vers le sol.

**Tableau IX : Ethogramme décrivant la zone auriculaire lors de l'étude sur l'inflammation mammaire**

NOM DU PARAMETRE + ABBREVIATION	AXE HORIZONTAL	AXE VERTICAL	ORIENTATION DU PAVILLON	ILLUSTRATIONS*	VARIABLE UTILISEE
<b>Oreille 1</b> avHav	Vers l'avant	Vers le haut	Vers l'avant		Durée en secondes
<b>Oreille 2</b> avCav	Vers l'avant	Au centre	Vers l'avant		Durée en secondes
<b>Oreille 3</b> miHav	Au milieu	Vers le haut	Vers l'avant		Durée en secondes
<b>Oreille 4</b> miCav	Au milieu	Au centre	Vers l'avant		Durée en secondes

\*Photographies : © UMR-Herbivores équipe CARAIBE

**Tableau IX (suite): Ethogramme décrivant la zone auriculaire lors de l'étude sur l'inflammation mammaire**

NOM DU PARAMETRE + ABREVIATION	AXE HORIZONTAL	AXE VERTICAL	ORIENTATION DU PAVILLON	ILLUSTRATIONS*	VARIABLE UTILISEE
<b>Oreille 5</b> miBav	Au milieu	Vers le bas	Vers l'avant		Durée en secondes
<b>Oreille 6</b> arHar	Vers l'arrière	Vers le haut	Vers l'arrière		Durée en secondes
<b>Oreille 7</b> arHco	Vers l'arrière	Vers le haut	Vers le côté		Durée en secondes
<b>Oreille 8</b> arHbas	Vers l'arrière	Vers le haut	Vers le bas		Durée en secondes
<b>Oreille 9</b> arCav	Vers l'arrière	Au centre	Vers l'avant		Durée en secondes
<b>Oreille 10</b> arBco	Vers l'arrière	Vers le bas	Vers le côté		Durée en secondes
<b>Oreille 11</b>	L'oreille est non visible car elle est masquée par un élément extérieur.				Durée en secondes

\*Photographies : © UMR-Herbivores équipe CARAIBE



### ❖ Analyse des vidéos

L'analyse des 168 vidéos (12 temps, 14 vaches) a été effectuée par Maëllis BOROT à l'aide du logiciel de codage The Observer XT 14 (Noldus Information Technology, Pays-Bas). Les vidéos ont été codées sans que l'observateur ne connaisse le statut de la vache (challengee ou non) ainsi que le moment de l'enregistrement.

#### e. Travail préliminaire sur les données brutes

### Positions d'oreilles

Suite à une étude préliminaire (David, 2020) et pour simplifier la multitude de positions d'oreilles, les 11 positions initiales ont été regroupées en 5 positions plus générales. Ces nouvelles positions sont décrites dans le **tableau X**.

**Tableau X : Ethogramme décrivant les positions d'oreilles finalement utilisées lors de l'étude sur l'inflammation mammaire**

NOM DU PARAMETRE	POSITIONS REGROUPEES ET DESCRIPTION	ILLUSTRATIONS*	VARIABLE UTILISEE
<b>OREILLE A</b>	Oreille 1 + Oreille 2 Vers l'avant		Durée en secondes
<b>OREILLE B</b>	Oreille 3 + Oreille 4 Au milieu, position médiane		Durée en secondes
<b>OREILLE C</b>	Oreille 5 Position basse		Durée en secondes
<b>OREILLE D</b>	Oreille 6 + Oreille 7 + Oreille 8 Vers l'arrière et le haut		Durée en secondes
<b>OREILLE E</b>	Oreille 9 + Oreille 10 Vers l'arrière et centre/bas		Durée en secondes
<b>OREILLE NON VISIBLE</b>	Oreille 11 Oreille non visible		Durée en secondes

\*Photographies : © UMR-Herbivores équipe CARAIBE



## Transformation des données

Les données obtenues (durées pour les états, fréquences pour les évènements) après le codage avec The Observer XT 14 ne suivant pas une loi normale, elles ont été transformées en variables binaires pour la suite des analyses statistiques. Le seuil permettant de transformer ces données continues en données binaires a été établi pour chaque indicateur. Le seuil de chaque indicateur a été défini en utilisant la médiane des données de l'ensemble des temps avant épreuve (*ANNEXE n°2*). Les indicateurs initialement codés en absence/présence (œil humide, œil creux, écoulement de l'œil, écoulement du mufle, arcade gonflée, arcade striée, muscles proéminents) n'ont pas subi de transformation.

Pour chaque observation, si une vache présentait une donnée dont la valeur était située en dessous du seuil, la modalité m1 lui était attribuée vs la modalité m2 si elle présentait une donnée dont la valeur était égale ou supérieure au seuil.

Les seuils établis sont regroupés dans le **tableau XI**.

**Tableau XI : Seuils et modalités des états codés en durée et des évènements codés en fréquence pour l'étude sur l'inflammation mammaire (sec = secondes ; nb = nombre)**

<b>NOM DU PARAMETRE</b>	<b>SEUIL</b>	<b>MODALITE M1</b>	<b>MODALITE M2</b>
<i>Région orbitaire</i>			
<b>Œil ouvert</b>	39 (sec)	[0 ;39 sec[	[39 ;40 sec[
<b>Œil mi-clos</b>	1 (sec)	[0 ;1 sec[	[1 ;40 sec[
<b>Œil clos</b>	1 (sec)	[0 ;1sec[	[1 ;40 sec[
<b>Œil écarquillé</b>	1 (sec)	[0 ;1 sec[	[1 ;40 sec[
<b>Clignement</b>	3 (nb)	[0 ;3[	[3 ;20[
<b>Contraction</b>	1 (nb)	[0 ;1[	[1 ;5[
<b>Larme</b>	1 (nb)	[0 ;1[	[1 ;5[
<i>Région buccale/ péribuccale</i>			
<b>Mufle immobile</b>	2 (sec)	[0 ;2 sec[	[2 ;40 sec[
<b>Mufle mobile</b>	1 (sec)	[0 ;1 sec[	[1 ;40 sec[
<b>Mufle mobile mange</b>	1 (sec)	[0 ;1 sec[	[1 ;40 sec[
<b>Mufle mobile rumine</b>	1 (sec)	[0 ;1 sec[	[1 ;40 sec[
<b>Mouvements du mufle</b>	1 (nb)	[0 ;1[	[1 ;11[
<b>Dilatations des narines</b>	1 (nb)	[0 ;1[	[1 ;20[
<i>Région auriculaire</i>			
<b>Oreille A</b>	1 (sec)	[0 ;1 sec[	[1 ;40 sec[
<b>Oreille B</b>	10 (sec)	[0 ;10 sec[	[10 ;40 sec[
<b>Oreille C</b>	1 (sec)	[0 ;1 sec[	[1 ;40 sec[
<b>Oreille D</b>	4 (sec)	[0 ;4 sec[	[4 ;40 sec[
<b>Oreille E</b>	1 (sec)	[0 ;1 sec[	[1 ;40 sec[

## **Echantillon final**

L'échantillon final comportait 336 vidéos enregistrées pour les 28 vaches, soit 168 vidéos pour notre étude (les 12 vidéos des 14 vaches du groupe PHY prises à 12 temps). Le nombre final de vidéos étudiées était de 165 pour les vaches du groupe PHY car certaines vidéos ont dû être supprimées en raison de leur qualité, d'expressions de chaleurs ou de boiterie (**tableau XII**).

Afin d'utiliser seulement les vidéos avec un temps d'observation suffisant, nous avons supprimé certaines vidéos de l'analyse. Pour les variables binaires, nous avons procédé de la façon suivante :

- Chaque zone (œil, mufle, oreille) comportait un paramètre « non visible » qui faisait partie du codage lors du traitement des vidéos (« œil non visible », « mufle non visible », « oreille non visible »).
- Un seuil a été établi pour « œil non visible », « mufle non visible », « oreille non visible » en fonction du seuil le plus restrictif de leur zone. Par exemple, pour la zone orbitaire, le seuil le plus restrictif était celui d' « œil ouvert » (39 secondes), ainsi le seuil de « œil non visible » a été établi à 1 seconde.
- Les vidéos qui présentaient une durée du paramètre « non visible » supérieure au seuil établi étaient supprimées de l'analyse statistique de toute la zone au temps concerné. Par exemple, une vidéo qui présentait une durée du paramètre « œil non visible » de 3 secondes était supprimée de l'analyse statistique de la zone orbitaire au temps concerné par cette vidéo.

Pour les paramètres codés en absence/présence, si le paramètre était codé « non visible », la vidéo était exclue de l'analyse statistique pour le paramètre en question au temps donné. Le nombre de vidéos finalement conservé pour chaque temps est mentionné dans le **tableau XII**.

**Tableau XII : Nombre de vidéos supprimées par temps et nombre final de vidéos utilisées par temps et par indicateur lors de l'étude sur l'inflammation mammaire**

HEURES	11H	13H	15H	20H	8H	11H	13H	15H	20H	8H	15H	8H
TEMPS	T-21	T-19	T-17 *	T-12	T0*	T3	T5	T7	T12	T24	T31	T48
<b>VIDEOS TOTALES ENREGISTREES</b>	14	14	13	14	14	14	14	14	14	14	14	12
<b>VIDEOS RETIREES AVANT CODAGE</b>	0	0	0 <sup>a</sup>	0	0 2 <sup>b</sup>	0	0	1 <sup>a</sup>	0	0	1 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>
<b>VIDEOS UTILISEES</b>												
<b>ŒIL OUVERT</b>	13	14	11 (vs T7) 12 (vs T31)	13	14 (vs T24) 12 (vs T48)	13	14	11	13	14	12	12
<b>ŒIL MI-CLOS</b>	13	14	11 (vs T7) 12 (vs T31)	13	14 (vs T24) 12 (vs T48)	13	14	11	13	14	12	12
<b>ŒIL CLOS</b>	13	14	11 (vs T7) 12 (vs T31)	13	14 (vs T24) 12 (vs T48)	13	14	11	13	14	12	12
<b>ŒIL ECARQUILLE</b>	13	14	11 (vs T7) 12 (vs T31)	13	14 (vs T24) 12 (vs T48)	13	14	11	13	14	12	12
<b>CLIGNEMENT</b>	13	14	11 (vs T7) 12 (vs T31)	13	14 (vs T24) 12 (vs T48)	13	14	11	13	14	12	12
<b>CONTRACTION</b>	13	14	11 (vs T7) 12 (vs T31)	13	14 (vs T24) 12 (vs T48)	13	14	11	13	14	12	12
<b>LARME</b>	13	14	11 (vs T7) 12 (vs T31)	13	14 (vs T24) 12 (vs T48)	13	14	11	13	14	12	12
<b>MUFLE IMMOBILE</b>	14	14	13 (vs T7) 13 (vs T31)	14	14 (vs T24) 12 (vs T48)	14	14	13	14	14	13	12
<b>MUFLE MOBILE</b>	14	14	13 (vs T7) 13 (vs T31)	14	14 (vs T24) 12 (vs T48)	14	14	13	14	14	13	12
<b>MUFLE MOBILE MANGE</b>	14	14	13 (vs T7) 13 (vs T31)	14	14 (vs T24) 12 (vs T48)	14	14	13	14	14	13	12
<b>MUFLE MOBILE RUMINE</b>	14	14	13 (vs T7) 13 (vs T31)	14	14 (vs T24) 12 (vs T48)	14	14	13	14	14	13	12

a. A T-17, la vache n° 26 a été retirée de l'étude car la vidéo était de qualité insatisfaisante. Elle a donc été également retirée des temps T7 et T31 pour permettre la comparaison lors de l'analyse statistique.

b. A T48, la vache n°17 a été retirée de l'étude car elle exprimait un comportement de chaleurs ; à T48, la vache n°11 a été retirée également pour cause de toux. Ces deux vaches ont donc été retirées du temps T0 pour permettre l'analyse statistique comparant T0 et T48.

**Tableau XII (suite) : Nombre de vidéos supprimées par temps et nombre final de vidéos utilisées par temps et par indicateur lors de l'étude sur l'inflammation mammaire**

TEMPS	T-21	T-19	T-17 *	T-12	T0*	T3	T5	T7	T12	T24	T31	T48
MOUVEMENTS DU MUFLE	14	14	13 (vs T7) 13 (vs T31)	14	14 (vs T24) 12 (vs T48)	14	14	13	14	14	13	12
DILATATIONS DES NARINES	14	14	13 (vs T7) 13 (vs T31)	14	14 (vs T24) 12 (vs T48)	14	14	13	14	14	13	12
OREILLE A	14	14	13 (vs T7) 13 (vs T31)	14	13 (vs T24) 11 (vs T48)	14	14	13	14	13	13	11
OREILLE B	14	14	13 (vs T7) 13 (vs T31)	14	13 (vs T24) 11 (vs T48)	14	14	13	14	13	13	11
OREILLE C	14	14	13 (vs T7) 13 (vs T31)	14	13 (vs T24) 11 (vs T48)	14	14	13	14	13	13	11
OREILLE D	14	14	13 (vs T7) 13 (vs T31)	14	13 (vs T24) 11 (vs T48)	14	14	13	14	13	13	11
OREILLE E	14	14	13 (vs T7) 13 (vs T31)	14	13 (vs T24) 11 (vs T48)	14	14	13	14	13	13	11
ŒIL HUMIDE	13	12	11 (vs T7) 11 (vs T31)	8	9 (vs T24) 8 (vs T48)	13	12	11	8	9	11	8
ŒIL CREUX	14	14	13 (vs T7) 13 (vs T31)	14	14 (vs T24) 12 (vs T48)	14	14	13	14	14	13	12
ÉCOULEMENT DE L'ŒIL	14	13	13 (vs T7) 13 (vs T31)	14	13 (vs T24) 12 (vs T48)	14	13	13	14	13	13	12
ARCADE GONFLEE	14	14	13 (vs T7) 13 (vs T31)	14	14 (vs T24) 12 (vs T48)	14	14	13	14	14	13	12
ARCADE STRIEE	14	14	11 (vs T7) 11 (vs T31)	11	9 (vs T24) 7 (vs T48)	14	14	11	11	9	11	7
MUSCLES PROEMINENTS	14	14	13 (vs T7) 12 (vs T31)	13	12 (vs T24) 10 (vs T48)	14	14	13	13	12	12	10
ÉCOULEMENT DU MUFLE	8	13	11 (vs T7) 10 (vs T31)	12	11 (vs T24) 8 (vs T48)	8	13	11	12	11	10	8

\*Les colonnes T-17 et T0 sont divisées en deux pour la comparaison avec les temps T7 et T31 pour T-17 et T24 et T48 pour T0.

## f. Analyses statistiques

Toutes les analyses statistiques ont été effectuées avec le logiciel R, version 4.1.0 (2021).

### i. Paramètres biochimiques et physiologiques

Le traitement de ces données et leur analyse statistique a été réalisé par L.GINGER (Ginger *et al*, soumis).

Les données des dosages du cortisol plasmatique et du comptage des cellules somatiques ont été transformées en logarithme 10 avant d'être analysées afin de satisfaire aux hypothèses de normalité.

Pour la température rectale, afin de tenir compte du rythme circadien, deux modèles distincts ont été utilisés :

- Avant la distribution de l'alimentation aux horaires du matin : T-24, T0, T24, T48.
- Après la distribution de l'alimentation aux horaires de l'après-midi : T-17, T7, T31.

L'effet du temps sur ces trois paramètres a été analysé par un modèle linéaire mixte avec pour facteur fixe le temps et pour facteurs aléatoires la série et l'animal. La fonction *lmer* du package *lme4* sur R a été utilisée. Les intervalles de confiance pour le cortisol et les comptages en cellules somatiques ont été calculés avec le package *emmeans*. Les conditions du modèle ont été vérifiées à posteriori. La significativité de l'effet fixe, pour un paramètre, a été fixée lorsque l'intervalle de confiance à 95% de ce paramètre ne contenait pas 0.

Les données des cytokines et de l'haptoglobine suivaient une distribution non normale. Des analyses non paramétriques ont donc été utilisées. Pour les cytokines, les temps T7 et T24 ont été comparés par un test des rangs signés de Wilcoxon. Les autres temps (T0, T31, T48) n'ont pas été analysés car les concentrations n'atteignaient pas le seuil de quantification (IL6 = 468 pg/mL, IL1b = 93 pg/mL et IL8 = 246 pg/mL). Pour l'haptoglobine, dans un premier temps, un test de Friedman a été réalisé afin d'étudier l'effet du temps sur la concentration d'haptoglobine ; puis dans un second temps, un test de la somme des rangs de Wilcoxon a été effectué afin de comparer les temps deux à deux.

Le seuil de significativité a été établi à 0,05 et les valeurs de P comprises entre 0,05 et 0,1 ont été considérées comme des « tendances ».

### ii. Expressions faciales

Pour étudier les changements d'expressions faciales aux différents moments avant et après l'épreuve inflammatoire chez la vache laitière, nous avons comparé les données des vaches du groupe PHY avant épreuve et après épreuve. Ces comparaisons ont été réalisées aux mêmes heures de la journée, car le comportement des animaux peut varier avec le rythme circadien :

- à 8h (T0 vs T24 ; T0 vs T48)
- à 11h (T-21 vs T3)
- à 13h (T-19 vs T5)
- à 15h (T-17 vs T7 ; T-17 vs T31)
- à 20h (T-12 vs T12).

Pour tous ces paramètres, un test de McNemar a été réalisé pour tester la discordance des variables binaires rassemblées dans le **tableau XI** et des événements codés en absence/présence en fonction du statut des animaux (challengé *versus* non challengé). Le seuil de significativité était de 0,05. Nous avons considéré une p-value comprise entre 0,05 et 0,1 comme « tendant vers la significativité ».

Enfin, une analyse factorielle discriminante (AFD) a été réalisée sur l'ensemble des variables de l'éthogramme des expressions faciales et à tous les temps. Cette analyse permet de mettre en évidence la combinaison de variables qui explique que les groupes (dans notre cas : les temps d'observation) diffèrent les uns des autres. Pour interpréter les composantes discriminantes de l'analyse, nous nous sommes concentrés sur les variables dont le coefficient de corrélation absolu était supérieur à 0,4.

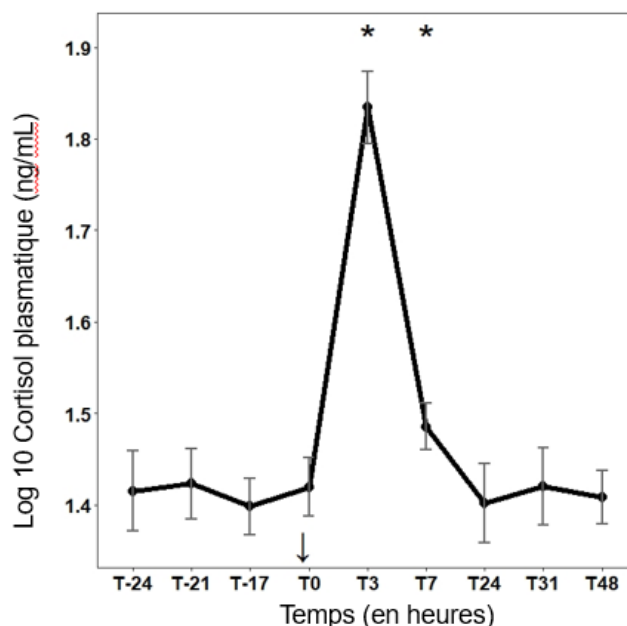
### 3. Résultats

#### a. Paramètres biochimiques et physiologiques

Les résultats ont été obtenus par les analyses statistiques réalisées par L.GINGER (Ginger et al., soumis).

#### ❖ Cortisol plasmatique

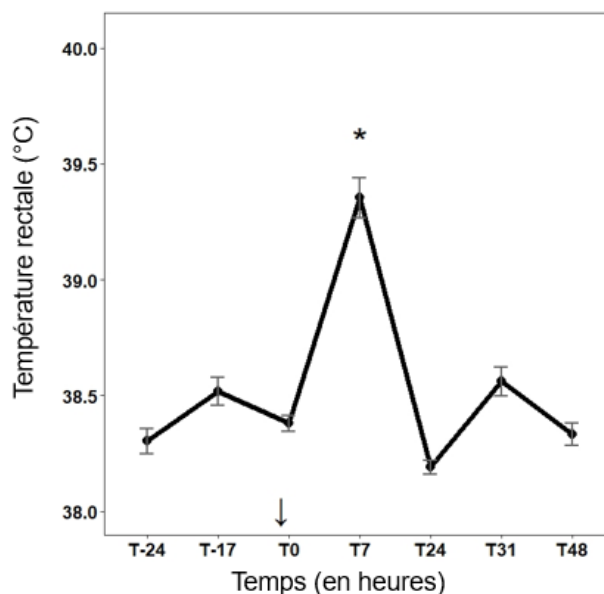
Pour les vaches du groupe PHY (n=14), une élévation du taux de cortisol plasmatique a pu être observée au cours des sept heures qui ont suivi l'injection de LPS et de sérum physiologique. En effet, comparé à T-24 (concentration de 26,20 ng/mL), la concentration de cortisol plasmatique a significativement augmenté en T3 jusqu'à 69,18 ng/mL (IC 95% = [48,98-97,72]) ainsi qu'en T7 jusqu'à 30,90 ng/mL (IC 95% = [21,88-43,65]) (**figure n°9**).



**Figure 9 : Changements (moyenne ± ES) au cours du temps de la concentration en cortisol plasmatique en ng/mL (les \* indiquent une augmentation significative de la concentration en T3 et T7 comparé à T-24 ; la flèche indique le moment de l'épreuve; utilisation d'un modèle linéaire mixte)**

### ❖ Température rectale

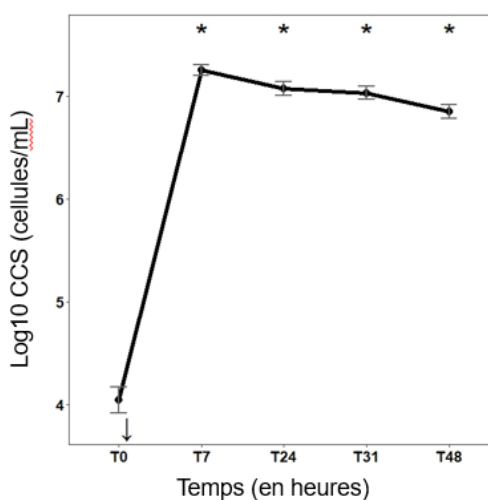
Comparé à T-17 (38,52°C [38,38-38,65°C]), la température rectale a significativement augmenté en T7 de 0,84 degrés celsius (IC 95% = [0,66-1,01]), mais pas après (**figure n°10**).



**Figure 10 : Changements (moyenne  $\pm$  ES) au cours du temps de la température rectale en degrés celsius (les \* indiquent une augmentation significative de la température en T7 comparé à T-17 ; la flèche indique le moment de l'épreuve ; utilisation d'un modèle linéaire mixte)**

### ❖ Comptage des cellules somatiques (CCS)

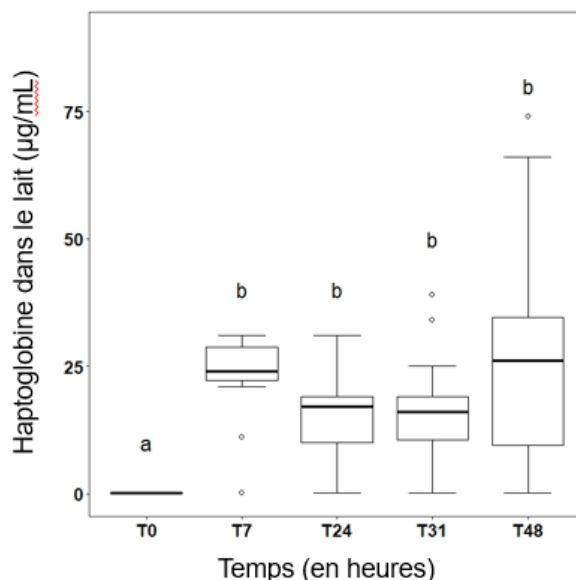
Comparé à T0, les concentrations de CCS ont significativement augmenté de T7 à T48. Elles ont été multipliées par 1621,81 (IC 95% = [1023,29-2511,89]) à T7, par 1071,52 (IC 95% = [691,83-1698,24]) à T24, par 977,24 (IC 95% = [616,00-1513,56]) à T31 et par 645,65 (IC 95% = [407,38-1023,29]) à T48 (**figure n°11**).



**Figure 11 : Changements (moyenne  $\pm$  ES) au cours du temps du comptage en cellules somatiques en cellules/mL (les \* indiquent une augmentation significative des CCS en T7, T24, T31 et T48 comparé à T0 ; la flèche indique le moment de l'épreuve ; utilisation d'un modèle linéaire mixte)**

### ❖ Haptoglobine

Les concentrations d'haptoglobine ont augmenté significativement de T0 à T48 (P= 1,21\*10<sup>-5</sup>). Comparé à T0, les concentrations étaient significativement plus élevées à T7 (P= 0,15\*10<sup>-4</sup>), à T24 (P= 0,13\*10<sup>-3</sup>), à T31 (P = 0,15\*10<sup>-4</sup>) ainsi qu'à T48 (P=0,13\*10<sup>-3</sup>) (**figure n°12**).



**Figure 12 : Changements au cours du temps de la concentration d'haptoglobine dans le lait en µg/mL** (les lettres minuscules indiquent des différences significatives en T7, T24, T31 et T48 comparé à T0 ; la flèche indique le moment de l'épreuve ; utilisation d'un test de Friedman et d'un test de la somme des rangs de Wilcoxon)

### ❖ Cytokines

Comparé à T24, les concentrations de IL6 et IL8 étaient significativement plus élevées à T7 (P= 0,001 et P < 0,001) tandis que la concentration d'IL1b avait tendance à être plus élevée en T7 (P=0,078) (**tableau XIII**).

**Tableau XIII : Changements (médiane et 1<sup>er</sup>-3<sup>ème</sup> quartiles) des concentrations en IL6, IL1b, IL8 en pg/mL, 7h et 24h après l'épreuve inflammatoire (injection de LPS intra-mammaire)** (un test des rangs signés de Wilcoxon a permis de tester l'effet du temps sur les variations de concentration)

		T7	T24	EFFET DU TEMPS T7 VS T24	
				V	P-value
<b>IL6</b> (PG/ML)	Médiane	1942	468	105	0,001
	1 <sup>er</sup> -3 <sup>ème</sup> quartile	[1764-3015]	[468-516]		
<b>IL1B</b> (PG/ML)	Médiane	159	93	81	0,078
	1 <sup>er</sup> -3 <sup>ème</sup> quartile	[70,3-228]	[93-106]		
<b>IL8</b> (PG/ML)	Médiane	2747	568	102	<0,001
	1 <sup>er</sup> -3 <sup>ème</sup> quartile	[1687-7025]	[511-688]		



## b. Expressions faciales

### i. *Variation de l'expression faciale avant-après épreuve*

#### ❖ **Région orbitaire : états et évènements codés en fréquence**

Le **tableau XIV** décrit, avant et après épreuve, l'expression des paramètres de la région orbitaire. Il n'y avait pas de modification significative de l'expression faciale avant et après l'épreuve pour l'œil ouvert, l'œil mi-clos, l'œil clos, l'œil écarquillé, les contractions, les larmes (Test de McNemar, p-value > 0,05).

Les vaches avaient tendance à être moins nombreuses à cligner des yeux plus de 3 fois à T31 comparé à T-17 (p-value = 0,074). En effet, 4 vaches clignaient de l'œil moins de 3 fois avant et après l'épreuve ; 3 vaches clignaient de l'œil plus de 3 fois avant et après l'épreuve ; 5 vaches clignaient de l'œil plus de 3 fois avant l'épreuve mais moins de 3 fois après l'épreuve.

#### ❖ **Région buccale et péribuccale : états et évènements codés en fréquence**

Le **tableau XV** décrit, avant et après épreuve, l'expression des paramètres de la région buccale et péribuccale. Il n'y avait pas de modification significative de l'expression faciale avant et après l'épreuve pour le mufle mobile, le mufle mobile rumine, la dilatation des narines et les mouvements du mufle (Test de McNemar, p-value > 0,05).

Les vaches avaient le mufle mobile car elles mangeaient plus longtemps 17 heures avant l'épreuve comparé à 31 heures après l'épreuve : en effet sur les 13 vaches observées, il y avait 6 vaches qui avaient le mufle mobile moins de 1 seconde car elles mangeaient en T-17 et en T31, 1 vache qui avait le mufle mobile plus de 1 seconde car elle mangeait en T-17 et en T31 mais il y avait également 6 vaches qui avaient le mufle mobile plus de 1 seconde car elles mangeaient en T-17 et qui avaient un mufle mobile lié à la prise alimentaire moins de 1 seconde en T31 (p-value = 0,041).

Le mufle avait tendance à être plus longtemps immobile en T3 qu'en T-21 (p-value = 0,074) : 8 vaches avaient le mufle immobile moins de 2 secondes en T-21 et en T3, 1 vache avait le mufle immobile plus de 2 secondes en T-21 et en T3 tandis que 5 vaches avaient le mufle immobile moins de 2 secondes en T-21 alors qu'elles le gardaient immobile plus de 2 secondes en T3.

#### ❖ **Région auriculaire : états**

Le **tableau XVI** décrit, avant et après épreuve, l'expression des paramètres de la région auriculaire. Il n'y avait pas de modification significative de l'expression faciale avant et après l'épreuve pour les positions B à E (Test de McNemar, p-value > 0,05).

Cependant, les vaches avaient tendance à avoir plus longtemps les oreilles dans la position A (position vers l'avant) au temps T7 comparé à T-17 (p-value = 0,074) : il y avait 8 vaches qui avaient les oreilles dans la position A moins de 1 seconde en T-17 et en T7 tandis que 5 vaches avaient cette position d'oreille moins de 1 seconde en T-17 et plus de 1 seconde en T7.

#### ❖ **Région oculaire et péribuccale : évènement codés en absence/présence**

Le **tableau XVII** décrit, avant et après épreuve, l'expression des paramètres de la zone oculaire et péribuccale codés en présence/absence. Il n'y avait pas de modification significative de l'expression faciale avant et après l'épreuve pour l'œil humide, l'œil creux, l'écoulement de l'œil, l'arcade gonflée, l'arcade striée, l'écoulement du mufle et les muscles proéminents (Test de McNemar, p-value > 0,05).

**Tableau XIV : Table de concordance des vaches du groupe PHY exprimant la modalité m1 et la modalité m2 pour chaque paramètre de l'œil avant (T-21, T-19, T-17, T-12, T0) et après épreuve (T3, T5, T7, T12, T24, T31, T48) et résultats du test de McNemar (K-value et p-value) (NA= non applicable ; les cases en gras sont les résultats significatifs ou en tendance ; les cases grisées sont les exemples explicités sous le tableau)**

		APRES CHALLENGE																											
TEMPS	AVANT CHALLENGE T-21, T-19, T-17, T-12, T0	T3 = 11h				T5 = 13h				T7 = 15h				T12 = 20h				T24 = 8h				T31 = 15h				T48 = 8h			
		m1	m2	K value	p-value	m1	m2	K value	p-value	m1	m2	K value	p-value	m1	m2	K value	p-value	m1	m2	K value	p-value	m1	m2	K value	p-value	m1	m2	K value	p-value
Œil ouvert	[0-39[ m1	0	2	1,125	0,289	6	4	0,8	0,371	2	1	1,5	0,221	4	3	0,125	0,724	6	4	0,167	0,683	3	1	0,25	0,617	6	3	0	1
	[39-40] m2	6	5			1	3			5	3			5	1			2	2			3	5			3	0		
Œil mi-clos	[0-1[ m1	5	6	1,125	0,289	3	1	0,8	0,371	4	4	0,167	0,683	2	5	0,571	0,450	3	2	0	1	6	3	0,25	0,617	1	3	0	1
	[1-40] m2	2	0			4	6			2	1			2	4			3	6			1	2			2	6		
Œil clos	[0-1[ m1	12	1	0	1	12	1	0	1	10	0	NA		7	3	0	1	12	2	0,5	0,480	8	3	0,25	0,617	11	1	0	1
	[1-40] m2	0	0			1	0			0	1			3	0			0	0			1	0			0	0		
Œil écarquillé	[0-1[ m1	13	0	NA		14	0	NA		10	1	0	1	12	0	0	1	13	0	0	1	10	1	0	1	11	0	0	1
	[1-40] m2	0	0			0	0			0	0			1	0			1	0			1	0			1	0		
Clignement	[0-3[ m1	1	3	0	1	9	2	0	1	2	2	0	1	5	4	0	1	5	5	0	1	4	0	3,2	0,074	5	3	0	1
	[3-20] m2	4	5			2	1			2	5			3	1			4	0			5	3			4	0		
Contraction	[0-1[ m1	7	3	0	1	6	2	0	1	2	3	0	1	6	3	0	1	6	3	0	1	5	1	1,5	0,221	4	3	0	1
	[1-5] m2	2	1			2	4			4	2			2	2			4	1			5	1			2	3		
Larme	[0-1[ m1	13	0	NA		11	3	1,333	0,248	10	1	0	1	13	0	NA		14	0	NA		12	0	NA		12	0	NA	
	[1-5] m2	0	0			0	0			0	0			0	0			0	0			0	0			0	0		

NB : par exemple, si l'on compare les temps T-21 et T3 (case grisée) pour le paramètre œil ouvert : il n'y avait aucune vache qui ouvraient l'œil moins de 39 secondes en T-21 et en T3 ; 2 vaches ouvraient l'œil moins de 39 secondes en T-21 et plus de 39 secondes en T3 ; 6 vaches ouvraient l'œil plus de 39 secondes en T-21 et moins de 39 secondes en T3 et enfin 5 vaches ouvraient l'œil plus de 39 secondes en T-21 et en T3 : les vaches « discordantes » sont donc les 2 vaches présentant la modalité m1 en T-21 et m2 en T3 ainsi que les 6 vaches présentant la modalité m2 en T-21 et m1 en T3 ; la k-value associée à cette table de discordance est de 1,125 et la p-value de 0,289.

**Tableau XV : Table de concordance des vaches du groupe PHY exprimant la modalité m1 et la modalité m2 pour chaque paramètre du mufle avant (T-21, T-19, T-17, T-12, T0) et après épreuve (T3, T5, T7, T12, T24, T31, T48) et résultats du test de McNemar (K-value et p-value) (les cases en gras sont les résultats significatifs ou en tendance ; les cases grisées sont les exemples explicités sous le tableau)**

TEMPS		AVANT CHALLENGE T-21, T-19, T-17, T-12, T0		APRES CHALLENGE																											
				T3 = 11h		T5 = 13h		T7 = 15h		T12 = 20h		T24 = 8h		T31 = 7h		T48 = 8h															
		m1	m2	K value	p-value	m1	m2	K value	p-value	m1	m2	K value	p-value	m1	m2	K value	p-value	m1	m2	K value	p-value	m1	m2	K value	p-value	m1	m2	K value	p-value		
Mufle immobile	[0-2[	m1	8	5	<b>3,2</b>	<b>0,074</b>	1	5	0,125	0,724	4	4	0,8	0,371	1	4	0,1	0,752	1	2	0,167	0,683	4	4	0,8	0,371	1	1	0	1	
	[2-40]	m2	0	1			3	5			1	4			6	3			4	7			1	4			2	8			
Mufle mobile	[0-1[	m1	11	2	0	1	7	5	1,5	0,221	6	4	0	1	6	3	0,125	0,724	8	2	0,167	0,683	6	4	0,167	0,683	6	3	0,25	0,617	
	[1-40]	m2	1	0			1	1			3	0			5	0			4	0			2	1			1	2			
Mufle mobile mange	[0-1[	m1	2	3	0,167	0,683	13	0	0	1	5	1	1,5	0,221	8	4	0,167	0,683	12	2	0,5	0,480	6	0	<b>4,167</b>	<b>0,041</b>	10	2	0,5	0,480	
	[1-40]	m2	4	5			1	0			5	2			2	0			0	0			6	1			0	0			
Mufle mobile rumine	[0-1[	m1	7	3	0	1	2	0	2,25	0,134	7	3	0	1	4	5	1,5	0,221	0	6	0	1	4	6	2,286	0,131	3	2	0,167	0,683	
	[1-40]	m2	3	1			4	8			2	1			1	4			5	3			1	2			4	3			
Dilatation narines	[0-1[	m1	13	0	0	1	10	3	0,25	0,617	10	2	0	1	9	1	0,8	0,371	12	0	0,5	0,480	10	2	0	1	9	1	0	1	
	[1-20]	m2	1	0			1	0			1	0			4	0			2	0			1	0			2	0			
Mouvements du mufle	[0-1[	m1	13	1	0	1	10	3	0,25	0,617	11	1	0	1	10	2	0	1	9	1	0,8	0,371	10	2	0	1	8	1	0,25	0,617	
	[1-11]	m2	0	0			1	0			1	0			1	1			4	0			1	0			3	0			

NB : par exemple, si l'on compare les temps T-17 et T7 (case grisée) pour le paramètre mufle immobile : il y avait 4 vaches qui ne bougeaient pas le mufle (« mufle immobile ») moins de 2 secondes en T-17 et en T7 ; 4 vaches ne bougeaient pas le mufle moins de 2 secondes en T-17 et plus de 2 secondes en T7 ; 1 vache ne bougeait pas le mufle plus de 2 secondes en T-17 et moins de 2 secondes en T7 et enfin 4 vaches ne bougeaient pas le mufle plus de 2 secondes en T-17 et en T7 : les vaches « discordantes » sont donc les 4 vaches présentant la modalité m1 en T-17 et m2 en T7 ainsi que la vache présentant la modalité m2 en T-17 et m1 en T7 ; la k-value associée à cette table de discordance est de 0,8 et la p-value de 0,371.

**Tableau XVI : Table de concordance des vaches du groupe PHY exprimant la modalité m1 et la modalité m2 pour chaque paramètre de l'oreille avant (T-21, T-19, T-17, T-12, T0) et après épreuve (T3, T5, T7, T12, T24, T31, T48) et résultats du test de McNemar (K-value et p-value) (NA= non applicable ; les résultats en gras sont les résultats significatifs ou en tendance ; les cases grisées sont les exemples explicités sous le tableau)**

APRES CHALLENGE																														
TEMPS	AVANT CHALLENGE T-21, T-19, T-17, T-12, T0		T3 = 11h				T5 = 13h				T7 = 15h				T12 = 20h				T24 = 8h				T31 = 15h				T48 = 8h			
		m1	m2	K-value	p-value	m1	m2	K-value	p-value	m1	m2	K-value	p-value	m1	m2	K-value	p-value	m1	m2	K-value	p-value	m1	m2	K-value	p-value	m1	m2	K-value	p-value	
Oreille A	[0-1[	m1	11	0	1,333	0,248	8	5	1,5	0,221	8	5	<b>3,2</b>	<b>0,074</b>	11	0	0,5	0,480	10	2	0	1	11	2	0,5	0,480	9	1	0	1
	[1-40]	m2	3	0			1	0			0	0			2	1			1	0			0	0			0	0		
Oreille B	[0-10[	m1	3	2	0	1	3	6	0,1	0,752	4	2	0,167	0,683	3	2	0,571	0,450	7	2	0	1	5	1	2,286	0,131	5	2	0,167	0,683
	[10-40]	m2	1	8			4	3			5	4			3	1			6	1			4	0			0	0		
Oreille C	[0-1[	m1	11	3	1,333	0,248	11	1	0	1	11	1	0	1	11	1	0	1	10	2	0	1	12	0	0	1	11	0	NA	
	[1-40]	m2	0	0			1	0			1	0			1	1			0	1			1	0			1	1		
Oreille D	[0-4[	m1	7	3	0	1	4	1	0	1	4	1	0	1	6	3	0,125	0,724	0	5	0,125	0,724	2	3	0,25	0,617	2	1	0	1
	[4-40]	m2	3	1			2	6			5	0			3	5			1	7			2	6			2	6		
Oreille E	[0-1[	m1	8	2	0,167	0,683	8	1	1,5	0,221	4	5	0,125	0,724	5	5	0,125	0,724	10	1	0	1	4	5	0,125	0,724	8	2	0,5	0,480
	[1-40]	m2	4	0			1	3			1	3			1	1			1	3			1	3			1	0		

*NB : par exemple, si l'on compare les temps T0 et T48 (case grisée) pour le paramètre Oreille C : il y avait 11 vaches qui présentaient la position « oreille C » moins de 1 seconde en T0 et en T48 et 0 vaches dans les 3 autres cases : il n'y avait donc pas de vaches « discordantes », le test de Mc Nemar n'est donc pas réalisable.*

**Tableau XVII : Table de concordance des vaches du groupe PHY exprimant la modalité m1 et la modalité m2 pour chaque évènement codé en absence/présence avant (T-21, T-19, T-17, T-12, T0) et après épreuve (T3, T5, T7, T12, T24, T31, T48) et résultats du test de McNemar (K-value et p-value) (NA= non applicable ; les cases grisées sont les exemples explicités sous le tableau)**

TEMPS		APRES CHALLENGE																															
		AVANT CHALLENGE T-21, T-19, T-17, T-12, T0				T3 = 11h				T5 = 13h				T7 = 15h				T12 = 20h				T24 = 8h				T31 = 15h				T48 = 8h			
		m1	m2	K value	p-value	m1	m2	K value	p-value	m1	m2	K value	p-value	m1	m2	K value	p-value	m1	m2	K value	p-value	m1	m2	K value	p-value	m1	m2	K value	p-value				
Œil humide	NON	m1	8	2	0	1	4	3	7	2	0,5	0,480	6	2	0,5	0,480	7	1	0	1	8	1	0	1	5	2	0,5	0,480					
	OUI	m2	3	0			3	2	0	1	0	2	0	0			1	0			0	2			0	1							
Œil creux	NON	m1	4	3	0	1	2	4	2	4	0,167	0,683	2	4	0	1	4	3	2	2	0,167	0,683	2	4	0	1	1	2	0	1			
	OUI	m2	4	3			2	6	3	4			3	4	0	1	2	5	4	6			4	3	0	1	3	6	0	1			
Ecoulement de l'œil	NON	m1	13	0	0	1	10	3	11	1	1,333	0,248	11	1	0	1	13	1	13	0	NA	12	0	0	1	12	0	NA					
	OUI	m2	1	0			0	0	1	0			1	0			0	0	0	0			1	0	0	0							
Ecoulement du mufler	NON	m1	7	1	0	1	9	2	9	1	0	1	10	0	0	1	10	0	10	0	0	1	7	2	0,5	0,480	7	0	0	1			
	OUI	m2	0	0			1	1	1	0			1	1			1	0	0	1			0	1	1	0	1	0	0	1			
Arcade striée	NON	m1	4	3	0	1	8	2	5	2	0	1	9	0	0,5	0,480	6	2	6	1	0	1	6	1	0	1	5	1	0	1			
	OUI	m2	2	5			3	1	3	1			2	0			1	0	2	2			2	2	0	1	1	0	0	1			
Arcade gonflée	NON	m1	2	2	0	1	2	1	2	2	0	1	1	2	0,167	0,683	1	3	0	1	2	2	0,5	0,480	0	4	0,8	0,371					
	OUI	m2	1	9			2	9	1	8			4	7			3	7	0	9			0	9	1	7							
Muscles proéminents	NON	m1	10	2	0	1	11	1	9	1	0	1	10	0	1,333	0,248	10	1	10	1	0	1	7	2	0	1	9	0	0	1			
	OUI	m2	1	1			2	0	2	1			3	0			1	0	2	1			2	1	0	1	1	0					

NB : par exemple, si l'on compare les temps T-12 et T12 (case grisée) pour le paramètre arcade gonflée : il y avait 1 vache qui ne présentait pas l'arcade gonflée en T-12 et en T12 ; il y avait 2 vaches qui présentaient l'arcade gonflée en T12 alors qu'elles ne l'avaient pas en T-12 ; 4 vaches présentaient l'arcade gonflée en T-12 alors qu'elles ne l'avaient plus en T12 et enfin 7 vaches avaient l'arcade gonflée à la fois en T-12 et en T12 : les vaches « discordantes » sont donc les 2 vaches présentant la modalité NON en T-12 et OUI en T12 ainsi que les 4 vaches présentant la modalité OUI en T-12 et NON en T12 ; la k-value associée à cette table de discordance est de 0,167 et la p-value de 0,683.

## ii. Résultats de l'analyse discriminante

La discrimination des 12 temps a été testée (**tableau XVIII et figure n°13**). Les composantes 1 et 2 représentaient, respectivement, 19,3 % et 15,2 %, soit 34,5 % de la variance totale expliquée par le modèle.

La composante 1 était principalement expliquée par les trois indicateurs suivants : le mufler mobile mange [0 ;1[ (0,742 = corrélation de la variable à l'axe de 74,2%), les clignements [0 ;1[ (0,508), le mufler immobile [10 ;40[ (0,483) pour les valeurs positives et par le mufler mobile mange [1 ;40[ (-0,742), les clignements [1 ; 20[ (-0,508), le mufler immobile [0 ;10[ (-0,483) et l'arcade striée présente (-0,420) pour les valeurs négatives (**tableau XVIII**).

La composante 2 s'expliquait principalement par les indicateurs suivants : larmes [1-5[ (0,609), l'oreille A [1 ;40[ (0,451) et la présence d'écoulement de l'œil (0,435) pour les valeurs positives et par les larmes [0 ;1[ (-0,609), l'oreille A [0 ;1[ (-0,451) et l'absence d'écoulement de l'œil (-0,483) pour les valeurs négatives (**tableau XVIII**).

La **figure 13A** montre deux groupes d'indicateurs corrélés entre eux, et qui ont le plus contribué à discriminer les 12 temps :

- (i) le mufler mobile mange (m1 en valeurs positives, m2 en valeurs négatives) et les clignements dans une moindre mesure (m1 en valeurs positives, m2 en valeurs négatives) ,
- (ii) les larmes (m1 en valeurs négatives, m2 en valeurs positives), l'écoulement de l'œil (présence en valeurs négatives, absence en valeurs positives) et la position de l'oreille A (m1 en valeurs négatives, m2 en valeurs positives) .

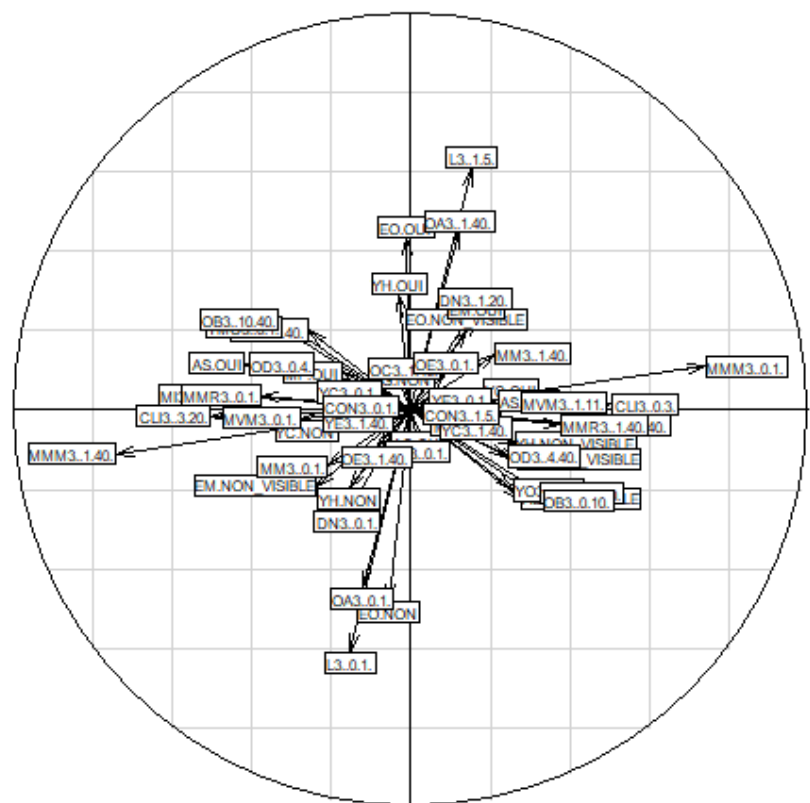
La **figure 13B** montre que tous les groupes hormis T5 CHALLENGED et dans une moindre mesure T0 NOT CHALLENGED avaient tendance à obtenir des scores globalement moyens sur les indicateurs du groupe (i) et du groupe (ii).

Dans le quart inférieur droit du plan factoriel, le groupe T0 NOT CHALLENGED avait tendance à avoir les valeurs les plus élevées pour les indicateurs du groupe (i) soit le mufler mobile mange [0 ;1[, les clignements [0 ;1[ et le mufler immobile [10 ;40[.

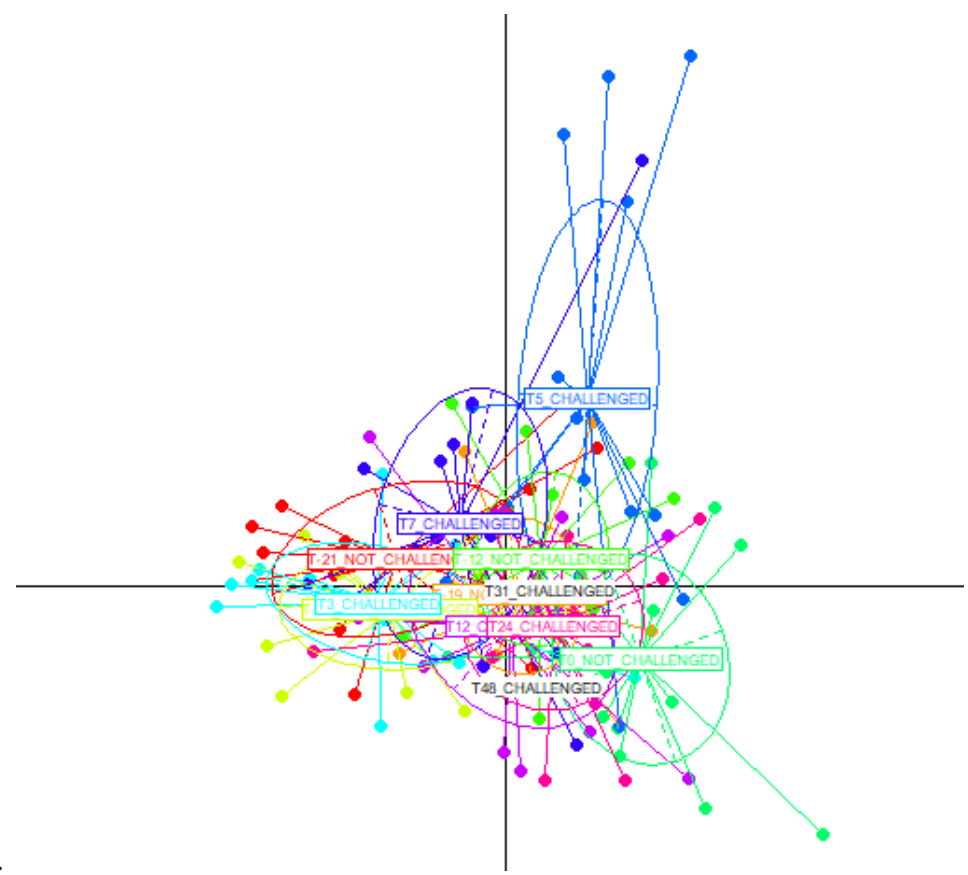
Dans le quart supérieur droit, le groupe T5 CHALLENGED avait tendance à avoir des valeurs supérieures pour les indicateurs du groupe (ii) soit les larmes [1 ;5[, la présence d'écoulement de l'œil et l'oreille A [1 ;40[.

**Tableau XVIII : Analyse factorielle discriminante sur les expressions faciales des vaches du groupe PHY : proportion de variance expliquée par chaque composante, et corrélations de chaque variable à la composante.**

	<b>Composante 1</b>	<b>Composante 2</b>
<b>Pourcentage de variabilité expliquée (%)</b>	19,3	15,2
<b>Contribution de chaque variable à la composante</b>		
MUFLE MOBILE MANGE [0-1[	<b>0,742</b>	0,110
CLIGNEMENT [0-1[	<b>0,508</b>	0,015
MUFLE IMMOBILE [10-40[	<b>0,483</b>	-0,040
MUFLE MOBILE RUMINE [1-40[	0,379	-0,038
OREILLE B [0-1[	0,333	-0,229
YEUX MI-CLOS [20-40[	0,324	-0,208
ARCADE STRIEE : NON VISIBLE	0,279	-0,224
MOUVEMENT MUFLE [1-11[	0,279	0,021
MUSCLES PROEMINENTS : NON VISIBLE	0,270	-0,125
YEUX HUMIDES : NON VISIBLE	0,265	-0,083
YEUX OUVERTS [0-20[	0,259	-0,202
OREILLE D [1-40[	0,244	-0,116
ARCADE STRIEE : NON	0,220	0,025
MUFLE MOBILE [1-40[	0,213	0,141
YEUX CREUX : OUI	0,182	0,052
ECOULEMENT MUFLE : OUI	0,164	0,231
DILATATIONS NARINES [1-20[	0,161	0,254
LARME [1-5[	0,154	<b>0,609</b>
ECOULEMENT OEIL : NON VISIBLE	0,141	0,201
OREILLE A [1-40[	0,123	<b>0,451</b>
OREILLE E [0-1[	0,087	0,094
YEUX CLOS [20-40[	0,075	-0,045
ECOULEMENT MUFLE : NON	0,063	-0,022
MUSCLES PROEMINENTS : NON	0,052	-0,037
YEUX ECARQUILLES [0-1[	0,047	0,027
CONTRACTION [1-5[	0,031	-0,012
ARCADE GONFLEE : OUI	0,019	-0,054
OREILLE C [0-1[	0,016	-0,076
ECOULEMENT OEIL : OUI	-0,013	<b>0,435</b>
OREILLE C [1-40[	-0,016	0,076
ARCADE GONFLEE : NON	-0,019	0,054
YEUX HUMIDES : OUI	-0,029	0,294
CONTRACTION [0-1[	-0,031	0,012
YEUX ECARQUILLES [1-40[	-0,047	-0,027
ECOULEMENT OEIL : NON	-0,056	<b>-0,483</b>
YEUX CLOS [0-20[	-0,075	0,045
OREILLE E [1-40[	-0,087	-0,094
OREILLE A [0-1[	-0,123	<b>-0,451</b>
LARME [0-1[	-0,154	<b>-0,609</b>
YEUX HUMIDES : NON	-0,156	-0,198
DILATATIONS NARINES [0-1[	-0,161	-0,254
MUSCLES PROEMINENTS : OUI	-0,175	0,095
YEUX CREUX : NON	-0,182	-0,052
MUFLE MOBILE [0-1[	-0,213	-0,141
ECOULEMENT MUFLE : NON VISIBLE	-0,238	-0,192
OREILLE D [0-1[	-0,244	0,116
YEUX OUVERTS [20-40[	-0,259	0,202
MOUVEMENT MUFLE [0-1[	-0,279	-0,021
YEUX MI-CLOS [0-20[	-0,324	0,208
OREILLE B [1-40[	-0,333	0,229
MUFLE MOBILE RUMINE [0-1[	-0,379	0,038
ARCADE STRIEE : OUI	<b>-0,420</b>	0,117
MUFLE IMMOBILE [0-10[	<b>-0,483</b>	0,040
CLIGNEMENT [1-20[	<b>-0,508</b>	-0,015
MUFLE MOBILE MANGE [1-40[	<b>-0,742</b>	-0,110



A.



B.

**Figure 13 : A. Carte factorielle des variables, B. Carte factorielle des individus\* de l'expérience sur l'inflammation localisée (observation de 14 individus de T-21 soit 21 heures avant l'épreuve à T48 soit 48 heures après l'épreuve)**

\* T48\_CHALLENGED signifie qu'il s'agit des vaches au temps 48 et en situation d'épreuve inflammatoire



#### 4. Discussion

Cette étude sur 14 vaches laitières Prim'Holstein a mis en évidence des changements significatifs (et quelques tendances) patho-physiologiques (augmentation du cortisol plasmatique, de la température rectale et du CCS dans les 3 à 7 heures suivant l'épreuve, augmentation de l'haptoglobine de 7 à 48 hpi et des cytokines à 7 hpi) et de l'expression faciale, au cours d'une épreuve inflammatoire mammaire.

Le matin avant l'épreuve (groupe T0 NOT CHALLENGED), les vaches étaient plus nombreuses à avoir leur muflle immobile plus longtemps, à avoir le muflle mobile lors de l'alimentation moins longtemps et elles étaient moins nombreuses à cligner des yeux. 5h après l'infusion de LPS (période aiguë de l'inflammation), les vaches étaient plus nombreuses à présenter des larmes, un écoulement de l'œil et des oreilles vers l'avant (position « oreille A »). Après l'épreuve, les modifications patho-physiologiques concernaient : l'augmentation de la concentration en cortisol plasmatique, de la température rectale et du comptage en cellules somatiques dans les 3 à 7 heures après infusion, l'augmentation des concentrations d'haptoglobine dans le lait de T7 à T48, la concentration en cytokines plus importante en T7 qu'en T24. Concernant l'expression faciale, au cours des 40s d'observation, les vaches bougeaient moins longtemps le muflle pendant la prise alimentaire. Elles avaient également tendance à moins cligner des yeux, à garder le muflle immobile plus longtemps et à présenter des oreilles vers l'avant plus longtemps.

Nos résultats devraient être confrontés à ceux d'études complémentaires qui utilisent d'autres doses de LPS, avec des épreuves utilisant des bactéries vivantes et en faisant également l'étude sur des cas de mammites spontanées. Cela nous permettrait de vérifier leur validité dans d'autres contextes.

##### a. Réponse physiologique et clinique

L'infusion de 25 µg de LPS dans la mamelle a induit, chez les vaches, une élévation de la concentration en cortisol plasmatique de 3 à 7 heures post-infusion (hpi), de la température rectale à 7 hpi et des CCS de 7 hpi à 48 hpi. La concentration en haptoglobine dans le lait a également augmenté de 7 à 48 hpi et les concentrations en cytokines étaient élevées à 7 hpi comparé à 24 hpi : cependant ces deux derniers paramètres n'ont pas été étudiés lors d'autre étude sur les mammites bovines (de Boyer des Roches et al., 2017), il n'est donc pas possible de les comparer.

L'infusion de 25 µg de LPS dans la mamelle a provoqué une augmentation X3 de la concentration en cortisol plasmatique entre 3 et 7 heures après l'épreuve, passant de 26,30 ng/mL avant épreuve à 69,18 ng/mL à 3 hpi et à 30,90 ng/mL à 7 hpi. Dans une autre étude où les vaches ont reçu 25 µg de LPS (Zimov et al, 2011), la concentration de cortisol a doublé, passant de 150 ng/mL avant épreuve à 300 ng/mL dans les 6 heures suivant l'épreuve. L'augmentation de la concentration du cortisol plasmatique dans notre étude était donc globalement plus marquée comparé aux données de la bibliographie.

Après infusion de 25 µg de LPS, la température rectale des vaches est passée de 38,52°C en T-17 à 39,36°C à 7 hpi. Cette élévation semble légèrement moindre que celles rapportées à 6 hpi par Zimov et al (2011)(40°C) et Fitzpatrick et al (2013)(supérieure à 41°), utilisant pourtant la même dose de LPS, et entre 6 hpi et 10 hpi par Banting et al (2008) (40,5°C) et par Siivonen et al (2011) (39,2°C), utilisant une dose moindre (respectivement 20µg et 10µg). Nous aurions donc pu nous attendre à

une augmentation plus marquée de la température dans notre cas. Cela peut s'expliquer par la précision et le type de thermomètre utilisé (Thermomètre électronique Vemco ® Minilog 8 pour Fitzpatrick et al, 2013, thermomètre K-jump health Co Ltd dans notre étude, non précisé pour les autres). Cela peut aussi s'expliquer par une différence de réponse inflammatoire en fonction de la souche bactérienne utilisée comme source de LPS : *E.coli* O111 :B4 pour notre étude et Fitzpatrick et al (2013), *E.coli* O26 :B6 pour Banting et al (2008) et Zimov et al (2011) et enfin *E.coli* O55 :B5 pour Siivonen et al (2011). Dans notre cas, l'élévation de température était globalement modérée.

Le comptage de cellules somatiques (CCS) a été multiplié par 20 dans les 7 hpi, jusqu'à atteindre 17 millions de cellules/mL alors que le comptage de départ (à T0) était de 10 000 cellules/mL. Cette élévation de CCS est plus marquée que dans les études précédemment citées, passant de 300 milliers de cellules/mL avant épreuve à 2 millions de cellules/mL à 6hpi dans l'étude de Fitzpatrick et al (2013) et à 3 millions de cellules/mL à 6 hpi dans l'étude de Zimov et al (2011). L'intensité de la réaction peut dépendre de la souche bactérienne à l'origine du LPS. L'augmentation du CCS dans notre étude était marquée.

## b. Variations des expressions faciales lors de douleur

### i. Région orbitaire

Au cours des 40s d'observation, les vaches avaient tendance à moins cligner des yeux 31 heures après l'épreuve par rapport à 17 heures avant l'épreuve. A notre connaissance, ce paramètre n'a jamais été étudié dans les autres études s'intéressant à la douleur chez les bovins. En revanche, une étude (Gleerup et al, 2015 A) a rapporté que les vaches avaient le regard fixe lorsqu'elles étaient dans une situation douloureuse (les vaches souffraient de mammite, boiterie, atteinte circulatoire, gastro-intestinale, etc), ce qui corrobore notre résultat. Nos résultats suggèrent donc que la fréquence de clignement de l'œil pourrait être un indicateur prometteur permettant de détecter la présence de douleur chez les bovins.

Nous n'avons pas été en mesure de montrer une variation de durée de fermeture de l'œil - qu'elle soit totale ou partielle - avant et après épreuve. Nous aurions pu nous attendre à ce que les bovins ferment plus les yeux lors d'une situation douloureuse. En effet, de nombreuses espèces de mammifères ferment les yeux ou les « plissent » lors de douleur (chez le rat lors d'injection intra-articulaire ou de laparotomie (Sotocinal et al, 2011), la souris lors de constriction abdominale avec acide acétique (Langford et al, 2010), le cheval lors d'application de capsaïcine ou d'un garrot sur le membre antérieur (Gleerup et al, 2015 B), les ovins lors de mammite et de piétain (McLennan et al, 2016) et le chat lors de douleur abdominale (Evangelista et al, 2019)). Ainsi, l'organe concerné (les membres ou la mamelle) ou/et les types de douleur (localisée pour certains rats, le cheval et les ovins ; systémique pour certains rats, le chat et la souris) pourraient moduler l'expression du comportement « œil fermé ». Des études complémentaires chez les bovins nous permettraient de tester cette hypothèse.

Nous n'avons pas pu mettre en évidence de différence significative avant et après épreuve pour le paramètre arcade gonflée. Nous aurions pu nous attendre à ce que les bovins aient plus l'arcade gonflée après l'épreuve car certains mammifères présentent des reliefs osseux plus marqués au niveau de l'arcade (chez le cheval (Dalla Costa et al, 2014)) et une tension augmentée (chez le taureau (Yamada et al,

2021)) lors d'une situation douloureuse. Dans ces études, les animaux ont subi une castration (Dalla Costa et al., 2014; Yamada et al., 2021). Là encore, nous pourrions supposer que le gonflement de l'arcade dépende du type d'organe concerné. Des études complémentaires chez les bovins nous permettraient de tester cette hypothèse.

## *ii. Région buccale et péribuccale*

Les vaches étaient moins nombreuses à présenter un muflle mobile lié à la prise d'alimentation 31 heures après l'épreuve par rapport à 17 heures avant l'épreuve. Ce résultat semble confirmer les résultats d'une autre étude traitant de mammite chez les bovins (Siivonen et al, 2011) : les vaches mangeaient plus dans les 4 à 8 heures qui suivent l'épreuve inflammatoire. Cependant, une autre étude traitant également de la mammite chez les bovins (Zimov et al, 2011) a également rapporté que les vaches mangeaient moins pendant les 9 heures qui suivent l'infusion de LPS dans la mamelle. Cette différence de résultats peut s'expliquer par la différence de logement des animaux, puisque dans notre cas elles étaient en stabulation libre alors que dans les études de Siivonen et al et Zimov et al, elles étaient en stabulation entravée : ceci peut donc influencer le budget temps consacré à l'alimentation.

Nous n'avons pas pu observer de différence significative concernant le nombre de vaches qui présentait une mobilité du muflle liée à la rumination entre avant et après épreuve. Or, d'autres études impliquant la mammite comme stimulus douloureux ont rapporté que les vaches rumaient moins dans les quelques heures qui suivent l'infusion bien que cela ne se répercute pas sur la durée journalière de la rumination (Siivonen *et al.*, 2011; Zimov *et al.*, 2011). Cela peut s'expliquer par la différence de logement des animaux, puisque dans notre cas elles étaient en stabulation libre alors que dans l'étude de Fitzpatrick et al, elles étaient en stabulation entravée : ceci peut donc influencer le budget temps consacré à l'alimentation.

Nous n'avons pas été en mesure de montrer de différence significative pour l'écoulement du muflle dans notre étude. A notre connaissance, il n'y a pas de données bibliographiques sur le sujet, quelle que soit l'espèce. En revanche, une étude sur la douleur chez la vache a montré que les vaches en douleur ou non avaient une « propreté des naseaux » équivalente (Gleerup et al, 2015 A). Il semblerait donc que ce paramètre ne soit pas pertinent pour différencier une vache qui ressent de la douleur ou non.

Nous n'avons pas été en mesure de montrer de différence significative concernant la dilatation des narines ou les muscles proéminents dans notre étude. Plusieurs espèces de mammifères présentent des narines dilatées (chez le cheval suite à un traumatisme orthopédique (Van Loon et al, 2019) ; chez les bovins suite à une marque au fer chaud (Müller et al, 2019)) ou encore une tension des muscles masticateurs/faciaux (chez le cheval lors de troubles dentaires et de la castration (Coneglian et al, 2020; Dalla Costa et al, 2014) ; chez les bovins suite à la castration (Yamada et al, 2021)). Ainsi, l'organe concerné (testicules 6lors de la castration, dents, membre, mamelle dans notre étude) pourrait moduler l'expression des comportements « dilatation des narines » et « muscles proéminents ». Des études complémentaires chez les bovins nous permettraient de tester cette hypothèse.

### iii. Région auriculaire

Les vaches avaient tendance à avoir les oreilles vers l'avant 7 heures après l'épreuve comparé à 17h avant l'épreuve. Ce résultat peut paraître surprenant car d'autres études ont montré que plusieurs espèces présentaient au contraire les oreilles en position basse ou vers l'arrière lors de situation douloureuse. Ces observations concernent notamment le cheval suite à une castration et à l'application de capsaïcine ou d'un garrot sur le membre antérieur (Dalla Costa et al, 2014; Gleerup et al, 2015 B), les ovins suite à une mammite, du piétain ou la caudectomie (McLennan et al, 2016; Guesgen et al, 2016). Elles concernent également la souris lorsqu'elles sont atteintes de drépanocytose (Mittal et al, 2016) ; cependant l'origine de la douleur dans ce cas-là est une douleur systémique, ce qui peut expliquer cette différence. La variation des positions d'oreille est donc peut-être dépendante de l'espèce ainsi que de l'intensité, du type de douleur et de l'organe concerné.

### ANALYSE DISCRIMINANTE

Le groupe T0 NOT CHALLENGED se différenciait de certains groupes (principalement de T-21 NOT CHALLENGED, T3 CHALLENGED, T5 CHALLENGED et T7 CHALLENGED) par le fait que les vaches présentaient moins longtemps l'indicateur « mufler mobile mange », clignaient moins fréquemment des yeux et gardaient le mufler immobile plus longtemps. Cette différence avec les groupes T3, T5 et T7 CHALLENGED peut s'expliquer par le fait qu'à T0 les vaches n'ont pas encore subi l'épreuve inflammatoire. Le fait que ce groupe se distingue également de T-21 NOT CHALLENGED peut s'expliquer par le fait que T-21 correspond à 11h tandis que T0 correspond à 8h : le comportement est donc différent en raison de la différence d'horaires.

Lors de l'inflammation aiguë (T5), les vaches se différenciaient des autres moments par une fréquence de larmes augmentée et par la présence d'écoulement de l'œil. Elles avaient également les oreilles plus souvent vers l'avant que les autres groupes (position d'oreille A). Là encore, cela pose question par rapport aux données de la bibliographie qui rapporte que les animaux, lorsqu'ils subissent une épreuve douloureuse, ont les oreilles en position basse ou vers l'arrière, notamment lors de la castration chez les chevaux (Dalla costa et al, 2014) ou encore de l'application de capsaïcine ou de garrot sur le membre (Gleerup et al, 2015 B) et de la mammite et du piétain ainsi que la caudectomie chez les ovins (McLennan et al, 2016; Guesgen et al, 2016). Les positions d'oreille lors d'une épreuve douloureuse sont donc peut-être dépendant du stimulus et/ou de l'espèce ; cela paraît donc difficile de les utiliser en tant qu'indicateur de la douleur au vu de la variabilité des réponses.

### c. Bilan et limites de l'étude

Plusieurs raisons pourraient expliquer nos résultats tels que la présence des oreilles vers l'avant à T7 ou encore l'absence de différence significative constatée pour certains indicateurs (par exemple la fermeture de l'œil ou encore la dilatation des narines et la proéminence des muscles) ou pour certains temps : le modèle de douleur utilisé, la méthode d'observation, la difficulté concernant le codage de certains événements et enfin le choix des seuils.

Premièrement, le modèle de douleur était un modèle de douleur modérée, ce qui n'était pas toujours le cas dans les autres études : en effet, la castration (Dalla Costa et al, 2014), la caudectomie (Guesgen et al, 2016), le fourchet (McLennan et al, 2016),

l'injection d'acide acétique 0,9% (Langford et al, 2010) et la douleur suite à une laparotomie (Sotocinal et al, 2011) sont des douleurs d'intensité moyenne à forte (Remnant et al, 2017). Ceci peut expliquer que nous n'ayons pas observé de variations significatives pour certains indicateurs alors qu'ils sont rapportés dans la bibliographie (par exemple, la fermeture totale ou partielle des yeux).

Deuxièmement, la durée des enregistrements différaient avec les autres études. Nos vidéos duraient de 2 à 3 minutes puis elles étaient fractionnées en séquence de 40 secondes. Nous avons donc analysé ces vidéos sous format « vidéo ». Dans d'autres études, les enregistrements étaient plus longs (30 minutes pour Dalla Costa et al (2014), 6 minutes pour Evangelista et al (2019)) puis les auteurs ont extrait les photos « les plus utiles » (1 à 2 photos par cheval avant et après épreuve pour Dalla Costa *et al* ; 3 photos par chat pour Evangelista *et al*). Les auteurs jugeaient une photo comme étant pertinente lorsque l'animal était de face ou de profil, immobile et lorsqu'elle contenait uniquement la face. Cette différence de support d'observation (photo vs vidéo) et la manière de choisir une photo ajoutent un biais de sélection que nous n'avons pas dans notre étude et peut expliquer la différence de résultats obtenus. La durée différente des vidéos enregistrées peut aussi expliquer cette différence de résultats.

Troisièmement, la méthode d'enregistrement des vidéos que nous avons utilisée (comescope sur pied) impliquait d'avoir un observateur relativement proche des animaux tandis que dans d'autres études, il n'y avait pas d'observateur, seulement une caméra fixée dans l'environnement de vie de l'animal (Sotocinal et al, 2011; Langford et al, 2010; Evangelista et al, 2019; Glerup et al, 2015 B). La présence humaine a donc pu modifier la réaction des bovins (Dalla Costa et al., 2014).

Quatrièmement, certains indicateurs étaient difficiles à coder en raison de la qualité des vidéos ou de l'angle de vue. C'était notamment le cas pour l'œil humide (suppression de 1 à 6 vidéos sur 14) et l'arcade striée (suppression de 2 à 5 vidéos sur 14). La difficulté venait parfois de la couleur de la tête de la vache, puisque certains détails étaient plus compliqués à voir lorsque la tête était recouverte par des poils noirs ; ceci ressort dans d'autres études, les expressions faciales étant plus compliquées à voir sur les chats avec les poils noirs (Evangelista et al, 2019) par exemple. Un meilleur éclairage lors du tournage de certaines vidéos pourrait permettre d'éviter cette difficulté.

Cinquièmement, les seuils que nous avons définis peuvent être remis en question. Nous avons fait le choix de fixer le seuil par rapport à la médiane de l'ensemble des données des temps avant épreuve afin de pouvoir comparer si la répartition des vaches par rapport à cette médiane variait après épreuve mais nous aurions pu fixer le seuil de manière différente ; par exemple, la durée d'observation étant de 40 secondes, nous aurions pu fixer le seuil à la moitié, soit 20 secondes afin de comparer avant et épreuve s'il y avait plus de vaches avant ou après la moitié de ce temps d'observation.

Sixièmement, nous avons étudié la durée des états alors que dans les autres études, c'est l'absence/présence des paramètres qui était étudiée puisque l'étude se faisait sur photographie. Il pourrait donc être pertinent de faire la même chose dans notre cas pour pouvoir comparer nos résultats. Aussi, il est plus facile de coder l'absence/présence d'un indicateur que sa durée précise, les résultats sont donc plus fiables.

#### d. Conclusion

Cette première étude a permis de montrer que l'expression faciale de bovins confrontés à une inflammation mammaire varie. En effet, à 31 hpi, les bovins ont une mobilité du mufle liée à la prise alimentaire qui dure moins longtemps que 17h avant l'épreuve. De plus, ils ont tendance à moins cligner des yeux à 31 hpi comparé à 17h avant épreuve. Ils ont également tendance à avoir le mufle plus longtemps immobile à 3hpi comparé à 21h avant infusion et à présenter des oreilles vers l'avant plus longtemps à 7 hpi que 17h avant l'épreuve. Nous avons également montré qu'avant l'épreuve les vaches étaient plus nombreuses à avoir leur mufle immobile plus longtemps, à avoir le mufle mobile lors de l'alimentation moins longtemps et elles étaient moins nombreuses à cligner des yeux alors que 5h après l'infusion de LPS (période aiguë de l'inflammation), les vaches étaient plus nombreuses à présenter des larmes, un écoulement de l'œil et des oreilles vers l'avant (position « oreille A »).

Nous avons aussi montré que des modifications patho-physiologiques avaient lieu : l'augmentation de la concentration en cortisol plasmatique, de la température rectale et du comptage en cellules somatiques dans les 3 à 7 heures après infusion, l'augmentation des concentrations d'haptoglobine dans le lait de T7 à T48, la concentration en cytokines plus importante en T7 qu'en T24.



### **III. Expérience 2 : Etude des expressions faciales chez les bovins laitiers lors d'inflammation généralisée**

#### **1. Objectif**

Etant donné l'absence d'étude sur les changements d'expressions faciales chez les bovins lors d'une situation de douleur systémique, cette étude a pour but de comparer les expressions faciales de vaches avant et après avoir subi une épreuve inflammatoire généralisée via une injection de LPS dans la veine jugulaire.

#### **2. Matériel et méthodes**

Le protocole et les procédures ont été autorisés par le comité d'éthique pour les expériences sur les animaux d'Ile de France (APAFIS # 11503-2017091411167913 v5). La directive 2010/63/EU a été respectée. L'étude a été financée par le Métaprogramme GISA (Gestion Intégrée de la Santé Animale) de l'INRAE (projet LongHealth), ainsi que grâce à la fourniture de capteurs par NewMedria®.

Un article en cours d'écriture (Ledoux et al., soumis) a été réalisé à partir du même dispositif expérimental ; c'est pourquoi j'ai repris certains éléments de méthodes.

##### **a. Animaux**

Cette étude s'est déroulée du 28 novembre au 21 décembre 2017 sur le site expérimental de l'INRAE à Bressonvilliers en France. Deux sessions de 3 jours ont été définies pour observer les vaches.

Les vaches utilisées pour cette étude étaient au nombre de 14 : six vaches étaient âgées de 10 à 15 ans (« vieilles vaches ») et huit vaches étaient âgées de 6 ans (« jeunes vaches »). Toutes étaient de race Prim'Holstein et ont été élevées ensemble depuis leur naissance. Elles ont toutes été obtenues par clonage d'un même génotype par transfert nucléaire somatique. Les vaches étaient logées sur aire paillée. Deux enclos étaient situés face à face, l'un avec le groupe des « vieilles vaches », l'autre avec le groupe des « jeunes vaches » dans lequel était également logées neuf autres vaches de la même race et du même âge mais non issues du clonage et non concernées par l'étude. L'enclos des « vieilles vaches » mesurait 15,4m x 32m (493m<sup>2</sup>) tandis que celui des « jeunes vaches » mesurait 18m x 28m (504 m<sup>2</sup>). Les vaches recevaient une ration mixte composée d'ensilage de maïs, de farine de soja et de concentrés, ration qui répondait aux besoins de vaches taries. Elle était distribuée le matin à 10h puis repoussée trois fois (14h30, 20h30, 7h30 le lendemain matin). L'eau était à disposition ad libitum.

Afin d'éviter les comportements d'expression de chaleurs au cours de l'étude, nous avons réalisé cette étude pendant la phase lutéale des vaches. Pour cela, elles ont été soumises à un protocole de synchronisation des chaleurs : implant auriculaire pendant 10 jours associé à des injections intramusculaires simultanées ; le premier jour, une injection de busréline (2,5mL, CRESTARPACK®, INTERVET, Beaucauzé, France) suivie de prostaglandine (2mL, ESTRUMATE®, INTERVET, Beaucauzé, France) quelques jours plus tard. Enfin, le jour du retrait de l'implant, une injection de 400 UI d'eCG a également été effectuée (SYNCRO-PART PMSG 400 UI BOVINS-OVINS-CAPRINS, CEVA SANTE ANIMALE, Libourne, France). L'ovulation a été contrôlée au septième jour par palpation du corps jaune.

## b. Procédures

Les vaches étaient leur propre témoin : il y avait deux sessions d'observation de trois jours consécutifs (une en novembre et une en décembre) et les vaches étaient challengées lors d'une des sessions et non challengées lors de l'autre session.

L'inflammation généralisée a été provoquée par une injection de LPS (0,5 µg/kg de LPS ultrapur, *E.coli* 0111 :B4, InVivogen, Toulouse, France) dans la veine jugulaire à 9h30 du matin le jour de l'épreuve. Cette injection a été effectuée par un chercheur vétérinaire juste après le temps nommé T0 (**figure n°14**).

Les vaches ont été réparties en 4 lots : les lots 1 et 2 comportaient deux jeunes vaches et une vieille vache, les lots 3 et 4 étaient composés de deux jeunes et deux vieilles vaches. Concernant le lot 1, les vaches ont été challengées avec le LPS le premier jour de la première session tandis que le lot 2 a été challengé le lendemain. Les lots 3 et 4 n'étaient pas challengés lors de cette session (situation de contrôle). Lors de la seconde session, trois semaines plus tard, le lot 3 était challengé le premier jour et les vaches du lot 4 ont subi l'épreuve le lendemain. Les lots 1 et 2 étaient à leur tour en situation non challengée.

Les vaches ont toutes été manipulées pendant les trois jours précédents les mesures expérimentales après les avoir bloquées au cornadis, afin de les habituer aux chercheurs et aux procédures.





### c. Points limites

Toutes les procédures ont été réalisées par des manipulateurs expérimentés. Si une vache présentait une température rectale supérieure à 41,5°C ou un examen clinique vétérinaire anormal sur une période de 24h avant le début de l'expérience, un anti-inflammatoire non stéroïdien (méloxicam 0,5 mg/kg en intraveineux) était administré. Si ces mêmes états étaient atteints au cours de l'expérience, que ce soit en situation d'épreuve ou de contrôle, alors la vache était exclue de l'expérience. De même, si une vache présentait des signes pouvant perturber les résultats de l'étude tels que des signes de boiterie, de toute autre pathologie ou encore des signes de chaleurs, elle était exclue de l'étude.

### d. Observations

Les observations ont été réalisées à différents temps selon les paramètres observés : les temps sont numérotés de T0 à T24 (**figure n°14**), que ce soit lors de la session de contrôle (nommés « Tx NOT CHALLENGED ») ou lors de la session d'épreuve (nommés « Tx CHALLENGED »).

#### i. Paramètres biochimiques et physiologiques

Le temps T0 CHALLENGED, correspondant au moment juste avant l'injection de LPS, servait de niveau de contrôle pour les examens cliniques et les prélèvements sanguins qui n'ont été effectués que lors de la phase d'épreuve inflammatoire.

#### ❖ Prélèvement de sang

Des prélèvements sanguins ont été effectués lorsque les vaches étaient bloquées au cornadis, dans des tubes contenant du Na2-EDTA par ponction de la veine coccygienne par un vétérinaire aux temps T0, T3, T6, T12 et T24 de la situation d'épreuve (**figure n°14**). Ces prélèvements ont ensuite été centrifugés (3000g pendant 20 min à 4°C) pour recueillir le plasma et le congeler à -20°C.

Ces prélèvements ont eu lieu après les enregistrements vidéos utilisés pour les expressions faciales.

#### ○ Cortisol plasmatique

La concentration en cortisol a été déterminée par dosage enzymatique lors des temps T0, T3, T6, T12 et T24 en situation d'épreuve (UMRH équipe CARAIBE) (**figure n°14**).

#### ○ Haptoglobine

La concentration en haptoglobine a été déterminée par immunoprécipitation à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, aux temps T0, T12 et T24 lors de l'épreuve (**figure n°14**).

#### ○ Cytokines

Les concentrations en IL6, IL1b et TNF-  $\alpha$  ont été déterminées par le test MilliPlex cMAP (Merck Millipore) et les données ont été enregistrées sur un cytomètre en flux MAGPIX grâce au logiciel Xponent (LUMINEX), à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, aux temps T0, T3, T6, T12 et T24 en situation d'épreuve (**figure n°14**).

### ❖ Température rectale

La température rectale a été prise par un vétérinaire à l'aide d'un thermomètre (K-jump health Co Ltd Taiwan) lors des temps T0, T3, T6, T12 et T24 en situation d'épreuve (**figure n°14**).

#### ii. *Expressions faciales*

### ❖ Enregistrement vidéo

Les vaches ont été filmées de T0 à T24 lors de chacune des deux sessions (une en situation de contrôle, une en situation d'épreuve, **figure n°14**) à l'aide d'une caméra vidéo numérique (Sony DCR-SR15E, Sony Corporation, Chine) afin d'observer des changements dans leur expression faciale. Cela représente donc 10 vidéos par vache.

Les enregistrements vidéos ont toujours eu lieu avant les autres interventions (prise de sang, examen clinique, etc...). Ils ont été réalisés par Alice DE BOYER DES ROCHES, assistée par une technicienne, Charline PONTLEVOY.

Les vaches ont été filmées de manière individuelle, principalement de profil. Le bovin était filmé pendant environ 2 minutes en entier pour s'habituer à la présence du manipulateur, puis un zoom de 1 minute était réalisé sur la tête de l'animal. Les vidéos ont ensuite été visualisées par Maëli BOROT, étudiante en école vétérinaire qui s'est chargée de découper ces vidéos de 3 minutes en séquences de 40 secondes, prélevées durant la séquence de zoom sur la tête de la vache.

Si une vidéo présentait une qualité médiocre ne permettant pas d'analyser correctement la séquence (tête non visible, luminosité faible, mauvais angle), elle était retirée de l'étude.

### ❖ Ethogramme utilisé

Les vidéos enregistrées ont été observées une première fois par Maëli BOROT afin d'examiner si de nouvelles expressions faciales étaient exprimées par les vaches de cette étude par rapport à l'éthogramme utilisé lors de l'expérience précédente.

Pour construire cet éthogramme, la face de la vache a été divisée en différentes zones (*ANNEXE n°1*):




- La zone orbitaire
- La zone buccale et péribuccale qui regroupe la région nasale, la région buccale, la région mandibulaire et le menton.
- La zone auriculaire

Chaque zone présente ensuite :

- Des états : comportement qui dure, défini par une durée.
- Des évènements : interaction ponctuelle et rapide, définie par une fréquence d'apparition.












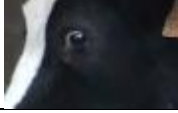
Ces états et évènements sont décrits dans les **tableaux XIX à XXI**.

**Tableau XIX : Ethogramme décrivant la zone orbitaire lors de l'étude sur l'inflammation systémique**

NOM DU PARAMETRE	DESCRIPTION	ILLUSTRATIONS*	VARIABLE UTILISEE
<b>Œil ouvert</b>	Globe oculaire visible en entier, la paupière ne descend pas, la sclère est en partie visible.		Durée en secondes
<b>Œil mi-clos</b>	Globe oculaire visible partiellement, la paupière est semi-fermée.		Durée en secondes
<b>Œil clos</b>	Globe oculaire non visible, la paupière est complètement visible.		Durée en secondes
<b>Œil écarquillé</b>	Globe oculaire et sclère visibles entièrement, la paupière n'est pas visible.		Durée en secondes
<b>Œil non visible</b>	Œil non visible (vache qui tourne la tête, élément extérieur qui masque l'œil, caméra éloignée, mauvaise luminosité, ...).		Durée en secondes
<b>Blanc de l'œil &lt; 25%</b>	Le blanc de l'œil occupe moins de 25% du globe oculaire.		Durée en secondes
<b>Blanc de l'œil non visible</b>	Blanc de l'œil non visible (vache qui tourne la tête, élément extérieur qui masque l'œil, caméra éloignée, mauvaise luminosité, ...).		Durée en secondes
<b>Clignement</b>	Paupière qui s'abaisse et se relève aussitôt, en moins d'une seconde.		Fréquence (nombre/40 secondes)
<b>Contraction</b>	Paupière qui s'abaisse et se relève plus lentement avec une contraction de la paupière.		Fréquence (nombre/40 secondes)
<b>Larme</b>	Larme qui s'écoule de l'œil ouvert.		Fréquence (nombre/40 secondes)






\*Photographies : © UMR-Herbivores équipe CARAIBE

**Tableau XIX (suite): Ethogramme décrivant la zone orbitaire lors de l'étude sur l'inflammation systémique**

NOM DU PARAMETRE	DESCRIPTION	ILLUSTRATIONS*	VARIABLE UTILISEE
<b>Œil humide</b>	Film lacrymal visible.		Présence
	Pas de film lacrymal.		Absence
	Non visible.		Non visible
<b>Écoulement de l'œil</b>	Œil qui suinte/coule au niveau du coin médial. Il peut être plus ou moins humide.		Présence
	Pas d'écoulement de l'œil.		Absence
	Non visible.		Non visible
<b>Œil creux</b>	Œil enfoncé dans l'orbite, creux possible au-dessus/en-dessous de la paupière.		Présence
	Pas d'enfoncement de l'œil dans l'orbite.		Absence
	Non visible.		Non visible
<b>Gonflement de l'arcade sourcilière</b>	L'arcade osseuse est plus proéminente qu'à l'accoutumée.		Présence
	L'arcade a un volume normal.		Absence
	Non visible.		Non visible
<b>Stries de l'arcade sourcilière</b>	L'arcade présente des stries en partie médiale.		Présence
	Pas de stries, l'arcade sourcilière est lisse.		Absence
	Non visible.		Non visible
<b>Œil rouge</b>	Le contour du globe oculaire apparaît rosé ou rouge.		Présence
	Le contour du globe oculaire est blanc.		Absence
	Non visible.		Non visible

\*Photographies : © UMR-Herbivores équipe CARAIBE

**Tableau XX : Ethogramme décrivant la zone buccale et péri-buccale lors de l'étude sur l'inflammation systémique**

NOM DU PARAMETRE	DESCRIPTION	ILLUSTRATIONS*	VARIABLE UTILISEE
<b>Mufle immobile</b>	Le mufle ne fait pas de mouvements depuis au moins deux secondes.		Durée en secondes
<b>Mufle mobile</b>	Le mufle effectue des mouvements : retoussement, dilatation des narines, etc...		Durée en secondes
<b>Mufle mobile mange</b>	Le mufle est en mouvement car la vache est en train de manger.		Durée en secondes
<b>Mufle mobile rumine</b>	Le mufle est en mouvement car la vache rumine. On observe des mouvements latéraux de la mâchoire inférieure.		Durée en secondes
<b>Mufle non visible</b>	Mufle non visible car la vache tourne la tête ou élément extérieur masquant le mufle, caméra trop éloignée, luminosité faible, etc.		Durée en secondes
<b>Mouvements du mufle</b>	Mouvement du mufle du bas vers le haut, retoussement.		Fréquence (nombre/40 secondes)
<b>Dilatations de narine</b>	Les narines s'écartent l'une de l'autre et augmentent de volume.		Fréquence (nombre/40 secondes)
<b>Contractions du mufle</b>	Tension dans la région du mufle, pouvant se produire seule ou être répétée plusieurs fois.		Fréquence (nombre/40 secondes)
<b>Coups de langue</b>	La vache passe sa langue sur son mufle.		Fréquence (nombre/40 secondes)
<b>Ecoulement du mufle</b>	Liquide s'écoulant des narines, jetage (muqueux, purulent, mixte).		Présence
	Mufle sans écoulement, pouvant être humide.		Absence
	Non visible.		Non visible
<b>Muscles/veines proéminents</b>	Muscles et veines du chanfrein bien visibles, contours marqués.		Présence
	Chanfrein lisse.		Absence
	Non visible.		Non visible

\*Photographies : © UMR-Herbivores équipe CARAIBE

Au total, 14 positions d'oreilles (**tableau XXI**) ont été décrites, selon 3 axes :

- L'axe horizontal qui représente la vache de la tête à la queue :
  - Oreille vers l'avant : la pointe de l'oreille est dirigée vers le museau de la vache.
  - Oreille vers l'arrière : la pointe de l'oreille est dirigée vers l'arrière de la vache.
  - Oreille au milieu : la pointe de l'oreille est sur un axe perpendiculaire à l'axe horizontal.
  
- L'axe vertical qui représente l'axe entre le sol et le ciel :
  - Oreille vers le haut : la pointe de l'oreille est orientée vers le ciel.
  - Oreille vers le bas : la pointe de l'oreille est orientée vers le sol.
  - Oreille au centre : la pointe de l'oreille est en position centrale.
  
- L'orientation du pavillon de l'oreille lorsque l'observateur est face à la vache :
  - Pavillon vers l'avant : le pavillon est visible en entier.
  - Pavillon vers l'arrière : le pavillon n'est pas visible.
  - Pavillon vers le côté : le pavillon est orienté parallèlement à l'axe horizontal, il est visible en partie.
  - Pavillon vers le bas : le pavillon est visible en partie et il est orienté vers le sol.

**Tableau XXI : Ethogramme décrivant la zone auriculaire lors de l'étude sur l'inflammation systémique**

NOM DU PARAMETRE + ABBREVIATION	AXE HORIZONTAL	AXE VERTICAL	ORIENTATION DU PAVILLON	ILLUSTRATIONS*	VARIABLE UTILISEE
<b>Oreille 1</b> avHav	Vers l'avant	Vers le haut	Vers l'avant		Durée en secondes
<b>Oreille 2</b> avCav	Vers l'avant	Au centre	Vers l'avant		Durée en secondes
<b>Oreille 3</b> miHav	Au milieu	Vers le haut	Vers l'avant		Durée en secondes
<b>Oreille 4</b> miCav	Au milieu	Au centre	Vers l'avant		Durée en secondes
<b>Oreille 5</b> miBav	Au milieu	Vers le bas	Vers l'avant		Durée en secondes

\*Photographies : © UMR-Herbivores équipe CARAIBE



**Tableau XXI (suite) : Ethogramme décrivant la zone auriculaire lors de l'étude sur l'inflammation systémique**

NOM DU PARAMETRE + ABBREVIATION	AXE HORIZONTAL	AXE VERTICAL	ORIENTATION DU PAVILLON	ILLUSTRATIONS*	VARIABLE UTILISEE
<b>Oreille 6</b> arHar	Vers l'arrière	Vers le haut	Vers l'arrière		Durée en secondes
<b>Oreille 7</b> arHco	Vers l'arrière	Vers le haut	Vers le côté		Durée en secondes
<b>Oreille 8</b> arHbas	Vers l'arrière	Vers le haut	Vers le bas		Durée en secondes
<b>Oreille 9</b> arCav	Vers l'arrière	Au centre	Vers l'avant		Durée en secondes
<b>Oreille 10</b> arBco	Vers l'arrière	Vers le bas	Vers le côté		Durée en secondes
<b>Oreille 11</b>	L'oreille est non visible car elle est masquée par un élément extérieur.				Durée en secondes
<b>Oreille 12</b> avBav	Vers l'avant	Vers le bas	Vers l'avant		Durée en secondes
<b>Oreille 13</b> arHav	Vers l'arrière	Vers le haut	Vers l'avant		Durée en secondes
<b>Oreille 14</b> ASYM	Les deux oreilles sont dans une position différente				Durée en secondes

\*Photographies : © UMR-Herbivores équipe CARAIBE



### ❖ Analyse des vidéos

L'analyse des 140 vidéos (10 temps, 14 vaches) a été effectuée par MaëliSS BOROT à l'aide du logiciel de codage The Observer XT 14 (Noldus Information Technology, Pays-Bas). Les vidéos ont été codées sans que l'observateur ne connaisse le statut de la vache (situation de contrôle ou d'épreuve) ni le moment de l'enregistrement.

#### e. Travail préliminaire sur les données brutes

### Positions d'oreilles

Suite à une étude préliminaire (David, 2020) et pour simplifier la multitude de positions d'oreilles, les 14 positions initiales ont été regroupées pour former 6 positions plus générales. Ces nouvelles positions sont décrites dans le **tableau XXII**.

**Tableau XXII : Ethogramme décrivant les positions d'oreilles finalement utilisées lors de l'étude sur l'inflammation systémique**

NOM DU PARAMETRE	POSITIONS REGROUPEES ET DESCRIPTION	ILLUSTRATIONS*	VARIABLE UTILISEE
<b>OREILLE A</b>	Oreille 1 + Oreille 2 Vers l'avant		Durée en secondes
<b>OREILLE B</b>	Oreille 3 + Oreille 4 Au milieu, position médiane		Durée en secondes
<b>OREILLE C</b>	Oreille 5 + Oreille 12 Position basse		Durée en secondes
<b>OREILLE D</b>	Oreille 6 + Oreille 7 + Oreille 8 + Oreille 13 Vers l'arrière et le haut		Durée en secondes
<b>OREILLE E</b>	Oreille 9 + Oreille 10 Vers l'arrière et centre/bas		Durée en secondes
<b>OREILLES ASYMETRIQUE S</b>	Oreille 14 Asymétriques		Durée en secondes
<b>OREILLE NON VISIBLE</b>	Oreille 11 Oreille non visible		Durée en secondes

\*Photographies : © UMR-Herbivores équipe CARAIBE

## Transformation des données

Les données obtenues (durées pour les états, fréquences pour les évènements) après le codage avec The Observer XT 14 ne suivant pas une loi normale, elles ont été transformées en variables binaires pour la suite des analyses statistiques. Le seuil permettant de transformer ces données continues en données binaires a été établi pour chaque indicateur. Le seuil de chaque indicateur a été défini en utilisant la médiane des données de l'ensemble des temps avant épreuve (*ANNEXE n°3*). Les indicateurs codés en absence/présence (œil creux, œil humide, œil rouge, écoulement de l'œil, écoulement du mufle, arcade striée, arcade gonflée, muscles proéminents) n'ont pas subi de transformation.

Pour chaque observation, si une vache présentait une donnée dont la valeur était située en dessous du seuil, la modalité m1 lui était attribuée vs la modalité m2 si elle présentait une donnée dont la valeur était égale ou supérieure au seuil. Les seuils établis sont regroupés dans le **tableau XXIII**.

**Tableau XXIII : Seuils et modalités des états codés en durée et des évènements codés en fréquence pour l'étude sur l'inflammation systémique** (sec = secondes ; nb = nombre)

NOM DU PARAMETRE	SEUIL	MODALITE M1	MODALITE M2
<i>Région orbitaire</i>			
Œil ouvert	37 (sec)	[0 ;37 sec[	[37 ;40 sec[
Œil mi-clos	1 (sec)	[0 ;1 sec[	[1 ;40 sec[
Œil clos	1 (sec)	[0 ;1sec[	[1 ;40 sec[
Œil écarquillé	1 (sec)	[0 ;1 sec[	[1 ;40 sec[
Visibilité blanc œil ≥25%	1 (sec)	[0 ;1 sec[	[1 ;40 sec[
Visibilité blanc œil <25%	31 (sec)	[0 ;31 sec[	[31 ;40 sec[
Clignement	5 (nb)	[0 ;5[	[5 ;20[
Contraction	1 (nb)	[0 ;1[	[1 ;5[
Larme	1 (nb)	[0 ;1[	[1 ;5[
<i>Région buccale/ péribucale</i>			
Mufle immobile	6 (sec)	[0 ;6 sec[	[6 ;40 sec[
Mufle mobile	1 (sec)	[0 ;1 sec[	[1 ;40 sec[
Mufle mobile mange	1 (sec)	[0 ;1 sec[	[1 ;40 sec[
Mufle mobile rumine	1 (sec)	[0 ;1 sec[	[1 ;40 sec[
Mouvements du mufle	1 (nb)	[0 ;1[	[1 ;11[
Dilatations des narines	1 (nb)	[0 ;1[	[1 ;20[
Contractions du mufle	1 (nb)	[0 ;1[	[1 ;20[
Coups de langue	1 (nb)	[0 ;1[	[1 ;20[
<i>Région auriculaire</i>			
Oreille A	1 (sec)	[0 ;1 sec[	[1 ;40 sec[
Oreille B	2 (sec)	[0 ;2 sec[	[2 ;40 sec[
Oreille C	1 (sec)	[0 ;1 sec[	[1 ;40 sec[
Oreille D	5 (sec)	[0 ;5 sec[	[5 ;40 sec[
Oreille E	1 (sec)	[0 ;1 sec[	[1 ;40 sec[
Oreilles asymétriques	3 (sec)	[0 ;3 sec[	[3 ;40 sec[

## **Echantillon final**

L'échantillon total comportait 140 vidéos enregistrées pour notre étude, 70 en situation de contrôle et 70 en situation d'épreuve. Une vache du groupe des jeunes vaches a été exclue de l'analyse en raison d'une luxation de la hanche entre les deux sessions : elle a donc dû être euthanasiée. Le nombre final de vaches incluses dans l'étude était donc de 13 et le nombre de vidéos enregistrées était de 128 (**tableau XXIV**).

Afin d'utiliser seulement les vidéos avec un temps d'observation suffisant, nous avons supprimé certaines vidéos de l'analyse. Pour les variables binaires, nous avons procédé de la façon suivante :

- Chaque zone (œil, mufle, oreille) comportait un paramètre « non visible » qui faisait partie du codage lors du traitement des vidéos (« œil non visible », « mufle non visible », « oreille non visible »).
- Un seuil a été établi pour « œil non visible », « mufle non visible », « oreille non visible » en fonction du seuil le plus restrictif de leur zone. Par exemple, pour la zone orbitaire, le seuil le plus restrictif était celui d'« œil ouvert » (39 secondes), ainsi le seuil de « œil non visible » a été établi à 1 seconde.
- Les vidéos qui présentaient une durée du paramètre « non visible » supérieure au seuil établi étaient supprimées de l'analyse statistique de toute la zone au temps concerné. Par exemple, une vidéo qui présentait une durée du paramètre « œil non visible » de 3 secondes était supprimée de l'analyse statistique de la zone orbitaire au temps concerné par cette vidéo.

Pour les paramètres codés en absence/présence, si le paramètre était codé « non visible », la vidéo était exclue de l'analyse statistique pour le paramètre en question au temps donné. Le nombre de vidéos finalement conservé pour chaque temps est mentionné dans le **tableau XXIV**.

Les données des temps T0 not challenged et T0 challenged ont également été supprimées pour les analyses du fait qu'à T0 challenged, les vaches n'avaient pas encore reçu l'injection de LPS ; la comparaison avec le temps T0 not challenged n'était donc pas très pertinente.

**Tableau XXIV : Nombre de vidéos supprimées par temps et nombre final de vidéos utilisées par temps et par indicateur lors de l'étude sur l'inflammation généralisée (NC = not challenged ; C = challenged)**

TEMPS	T3 NC	T6 NC	T12 NC	T24 NC	T3 C	T6 C	T12 C	T24 C
<b>VIDEOS TOTALES ENREGISTREES</b>	13	13	13	13	12	13	12	13
<b>VIDEOS RETIREES AVANT CODAGE</b>	1 <sup>a</sup>	0	1 <sup>b</sup>	0	0 <sup>a</sup>	0	0 <sup>b</sup>	0
<b>VIDEOS UTILISEES</b>								
<b>ŒIL OUVERT</b>	11	10	5	4	11	10	5	4
<b>ŒIL MI-CLOS</b>	11	10	5	4	11	10	5	4
<b>ŒIL CLOS</b>	11	10	5	4	11	10	5	4
<b>ŒIL ECARQUILLE</b>	11	10	5	4	11	10	5	4
<b>BLANC ŒIL ≥ 25%</b>	9	11	2	1	9	11	2	1
<b>BLANC ŒIL &lt; 25%</b>	9	11	2	1	9	11	2	1
<b>CLIGNEMENT</b>	11	10	5	4	11	10	5	4
<b>CONTRACTION</b>	11	10	5	4	11	10	5	4
<b>LARME</b>	11	10	5	4	11	10	5	4
<b>MUFLE IMMOBILE</b>	12	12	12	13	12	12	12	13
<b>MUFLE MOBILE</b>	12	12	12	13	12	12	12	13
<b>MUFLE MOBILE MANGE</b>	12	12	12	13	12	12	12	13
<b>MUFLE MOBILE RUMINE</b>	12	12	12	13	12	12	12	13
<b>MOUVEMENTS DU MUFLE</b>	12	12	12	13	12	12	12	13
<b>DILATATIONS DES NARINES</b>	12	12	12	13	12	12	12	13
<b>COUPS DE LANGUE</b>	12	12	12	13	12	12	12	13
<b>CONTRACTIONS DU MUFLE</b>	12	12	12	13	12	12	12	13

a. A T3 Challenged, la vache n° 245 a été retirée de l'étude car la vidéo était manquante. Elle a donc été également retirée du temps T3 Not Challenged pour permettre la comparaison lors de l'analyse statistique.

b. A T6 Challenged, la vache n°1126 a été retirée de l'étude car la vidéo était de qualité insatisfaisante. Elle a donc été également retirée du temps T6 Not Challenged pour permettre la comparaison lors de l'analyse statistique.

**Tableau XXIV (suite) : Nombre de vidéos supprimées par temps et nombre final de vidéos utilisées par temps et par indicateur lors de l'étude sur l'inflammation généralisée (NC = not challenged ; C = challenged)**

TEMPS	T3 NC	T6 NC	T12 NC	T24 NC	T3 C	T6 C	T12 C	T24 C
<b>VIDEOS UTILISEES</b>								
OREILLE A	12	13	12	13	12	13	12	13
OREILLE B	12	13	12	13	12	13	12	13
OREILLE C	12	13	12	13	12	13	12	13
OREILLE D	12	13	12	13	12	13	12	13
OREILLE E	12	13	12	13	12	13	12	13
OREILLES ASYMETRIQUES	12	13	12	13	12	13	12	13
ŒIL HUMIDE	12	13	3	2	12	13	3	2
ŒIL CREUX	12	13	5	8	12	13	5	8
ŒIL ROUGE	11	12	0	1	11	12	0	1
ECOULEMENT DE L'ŒIL	12	13	0	2	12	13	0	2
ARCADE GONFLEE	12	13	9	9	12	13	9	9
ARCADE STRIEE	11	13	3	5	11	13	3	5
ECOULEMENT DU MUFLE	11	10	11	12	11	10	11	12
MUSCLES PROEMINENTS	12	13	12	13	12	13	12	13

## f. Analyses statistiques

Toutes les analyses statistiques ont été effectuées avec le logiciel R, version 4.1.0 (2021).

### i. Paramètres biochimiques et physiologiques

Le traitement de ces données et leur analyse statistique a été réalisé par D.LEDOUX (Ledoux et al., soumis).

Les données concernant le cortisol plasmatique, l'IL-6 et le TNF- $\alpha$  ont été transformées en logarithme 10 avant d'être analysées afin de satisfaire les conditions de distribution normale et d'homogénéité des résidus.

Les changements dans le temps des concentrations du cortisol plasmatique, des cytokines, de l'haptoglobine et de la température rectale ont ensuite été modélisés à l'aide de modèles linéaires à effet mixte avec le temps, l'âge et leur interaction comme effets fixes et « vache » comme effet aléatoire, à l'aide de la fonction *lmer* du package *lme4* sur R. Le package *emmeans* a été utilisé pour calculer les moyennes des moindres carrés.

La significativité de l'effet fixe d'un paramètre a été définie lorsque la valeur t avait une valeur absolue supérieure ou égale à 2 et que les valeurs de p ajustée étaient inférieures ou égales à 0,05 (Bates et al., 2015).

### ii. Expressions faciales

Pour étudier les changements d'expressions faciales aux différents moments avant et après l'épreuve inflammatoire généralisée chez la vache laitière, nous avons comparé les données de chaque vache obtenues lors de la session de contrôle et lors de la session d'épreuve, aux mêmes heures de la journée car le comportement des animaux peut varier avec le rythme circadien :

- T3 not challenged VS T3 challenged
- T6 not challenged VS T6 challenged
- T12 not challenged VS T12 challenged
- T24 not challenged VS T24 challenged.

Pour tous les paramètres, un test de McNemar a été réalisé pour tester la discordance des variables binaires rassemblées dans le **tableau XXIII** et des événements codés en absence/présence en fonction du statut des animaux (challengé *versus* non challengé). Le seuil de significativité était de 0,05. Nous avons considéré une p-value comprise entre 0,05 et 0,1 comme « tendant vers la significativité ».

Enfin, une analyse factorielle discriminante (AFD) a été réalisée sur l'ensemble des variables de l'éthogramme des expressions faciales et aux temps T3, T6, T12 et T24 des deux situations. Cette analyse repose sur le fait que les individus d'un même temps et d'un même état (par exemple T3 et NOT CHALLENGED) forment un groupe : elle permet donc de mettre en évidence la combinaison de variables qui fait que ces groupes diffèrent les uns des autres. L'analyse a été effectuée sur toutes les variables de l'éthogramme des expressions faciales, sur les 8 groupes de vaches (4 temps, 2 états). Pour interpréter les composantes discriminantes de l'analyse factorielle discriminante, nous nous sommes concentrés sur des variables dont le coefficient de corrélation absolu est supérieur à 0,4.

### 3. Résultats

#### a. Paramètres biochimiques et physiologiques

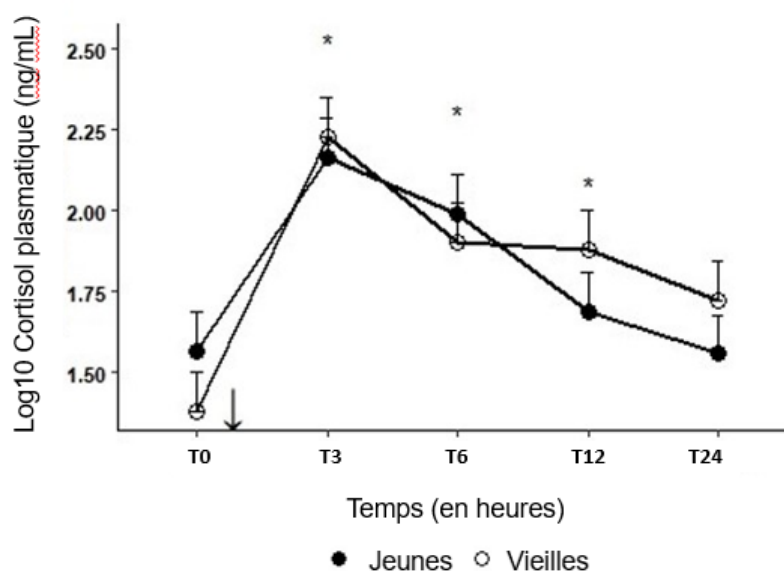
Ces résultats ont été obtenus grâce aux analyses statistiques réalisées par D.LEDOUX (Ledoux et al., soumis).

##### ❖ Cortisol plasmatique

Pour les jeunes vaches, comparé à T0 ( $37,2 \pm 1,3$  ng/mL), la concentration de cortisol plasmatique a significativement augmenté en T3 ( $144,5 \pm 1,3$  ng/mL ;  $P=0,0003$ ). La concentration est revenue à sa valeur initiale à T12.

Pour les vieilles vaches, comparé à T0 ( $24,0 \pm 1,3$  ng/mL), la concentration de cortisol plasmatique a significativement augmenté en T3 ( $169,8 \pm 1,3$  ng/mL ;  $P=0,0003$ ). La concentration est revenue à sa valeur initiale à T24 (**figure n°15**).

Aucune différence n'a été montrée entre les deux catégories d'âge pour la concentration en cortisol.

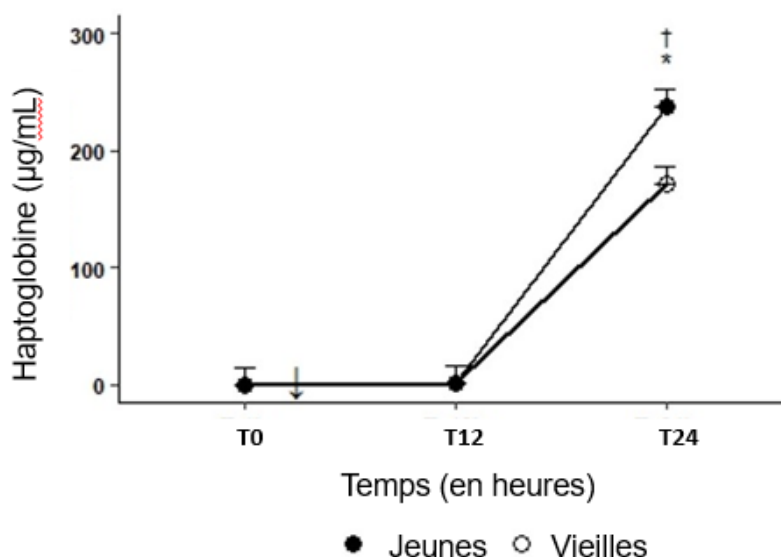


**Figure 15 : Changements (moyenne  $\pm$  ES) au cours du temps de la concentration en cortisol plasmatique en ng/mL (les \* indiquent les différences significatives par rapport à T0 ; les points noirs représentent les jeunes vaches, les blancs représentent les vieilles vaches ; la flèche correspond au moment de l'épreuve ; utilisation d'un modèle linéaire mixte)**

### ❖ Haptoglobine

Comparé à T0 ( $0,0 \pm 14,9 \mu\text{g/mL}$  pour les jeunes et les vieilles vaches), la concentration plasmatique d'haptoglobine était significativement augmentée à T24 pour les jeunes vaches ( $237,9 \pm 14,9 \mu\text{g/mL}$  ;  $P < 0,0001$ ) et pour les vieilles vaches ( $172,1 \pm 14,9 \mu\text{g/mL}$  ;  $P < 0,0001$ ) (**figure n°16**).

L'augmentation était significativement moins marquée chez les vaches âgées que chez les jeunes vaches ( $P = 0,04$ ).



**Figure 16 : Changements (moyenne  $\pm$  ES) au cours du temps de la concentration en haptoglobine plasmatique en  $\mu\text{g/mL}$  (les \* indiquent les différences significatives par rapport à T0 ; les points noirs représentent les jeunes vaches, les blancs représentent les vieilles vaches ; les † indiquent une différence significative entre les jeunes et les vieilles vaches ; la flèche correspond au moment de l'épreuve ; utilisation d'un modèle linéaire mixte)**

### ❖ Cytokines

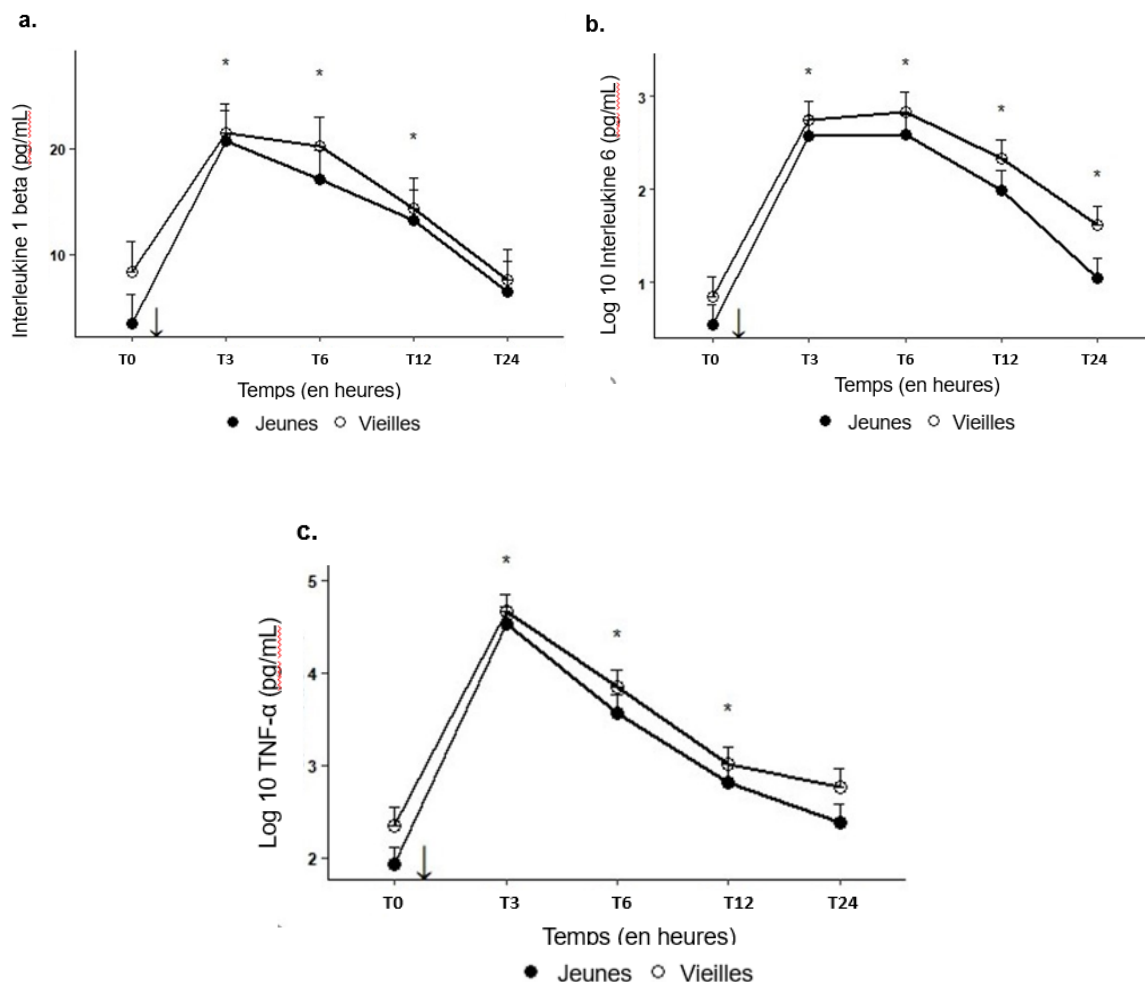
Pour le groupe des jeunes vaches, comparé à T0 ( $3,5 \pm 1,6 \text{ pg/mL}$ ), la concentration plasmatique en IL6 a significativement augmenté en T3 ( $377,6 \pm 1,6 \text{ pg/mL}$  ;  $P < 0,0001$ ). La concentration en IL1b a également significativement augmenté en T3 ( $20,7 \pm 2,8 \text{ pg/mL}$  ;  $P = 0,0001$ ) comparé à T0 ( $2,5 \pm 2,8 \text{ pg/mL}$ ). Enfin, la concentration en TNF-  $\alpha$  en T3 ( $33\,884,4 \pm 1,5 \text{ pg/mL}$  ;  $P < 0,0001$ ) était également significativement augmentée par rapport à la concentration en T0 ( $85,1 \pm 1,5 \text{ pg/mL}$ ).

Concernant le groupe des vieilles vaches, comparé à T0 ( $7,0 \pm 1,6 \text{ pg/mL}$ ), la concentration plasmatique en IL6 a significativement augmenté en T3 ( $548,3 \pm 1,6 \text{ pg/mL}$  ;  $P < 0,0001$ ). La concentration en IL1b a également significativement augmenté en T3 ( $21,5 \pm 2,8 \text{ pg/mL}$  ;  $P < 0,005$ ) comparé à T0 ( $8,4 \pm 2,8 \text{ pg/mL}$ ). Enfin, la concentration en TNF-  $\alpha$  en T3 ( $44\,668,4 \pm 1,5 \text{ pg/mL}$  ;  $P < 0,0001$ ) était également significativement augmentée par rapport à la concentration en T0 ( $223,9 \pm 1,5 \text{ pg/mL}$ ).



Les valeurs sont revenues au niveau de référence à T24 sauf pour l'IL6 pour laquelle l'augmentation était encore significative ( $40,6 \pm 1,6$  pg/mL avec  $P=0,03$ ) pour les vieilles vaches (**figure n°17**).

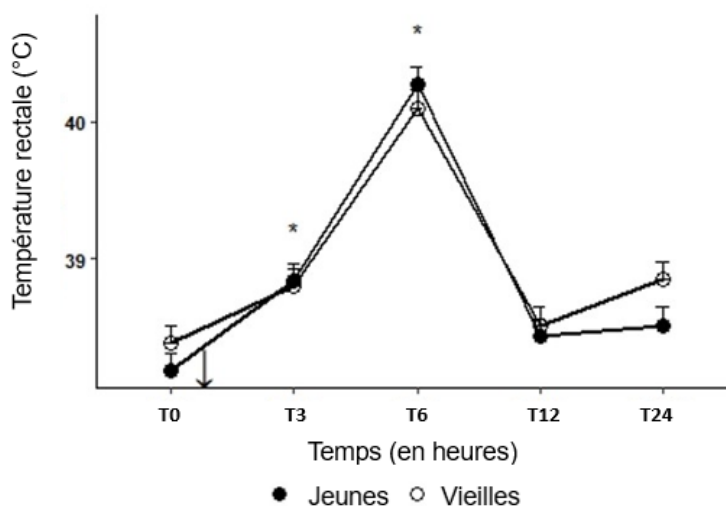
Aucune différence n'a été montrée entre les deux catégories d'âge pour la concentration en cytokines.



**Figure 17 : Changements (moyenne  $\pm$  ES) au cours du temps de la concentration en cytokines en pg/mL : a pour l'IL1b, b pour l'IL6 et c pour le TNF- $\alpha$  (les \* indiquent les différences significatives par rapport à T0 ; les points noirs représentent les jeunes vaches, les blancs représentent les vieilles vaches ; la flèche correspond au moment de l'épreuve ; utilisation d'un modèle linéaire mixte)**

## ❖ Température rectale

Comparé à T0 ( $38,2 \pm 0,1$  °C), la température rectale a augmenté significativement à T3 pour les jeunes vaches ( $38,8 \pm 0,1$  °C ;  $P=0,02$ ). Elle a également augmenté de façon significative à T6 pour les jeunes vaches ( $40,3 \pm 0,1$  °C ;  $P<0,0001$ ) et pour les vieilles vaches ( $40,1 \pm 0,1$  °C vs  $38,4 \pm 0,1$  °C à T0 ;  $P<0,0001$ ) (**figure n°18**).



**Figure 18 : Changements (moyenne  $\pm$  ES) au cours du temps de la température rectale en degré celsius (les \* indiquent les différences significatives par rapport à T0 ; les points noirs représentent les jeunes vaches, les blancs représentent les vieilles vaches ; la flèche correspond au moment de l'épreuve ; utilisation d'un modèle linéaire mixte)**

### b. Expressions faciales

#### i. Variation de l'expression faciale avant-après épreuve

##### ❖ Région orbitaire : états et évènements codés en fréquence

Concernant les paramètres de la région orbitaire œil ouvert, œil mi-clos, œil clos, clignement, contraction, larme, il n'y avait pas de variation significative avant et après l'épreuve (**tableau XXV**) (Test de McNemar,  $p$ -value  $> 0,05$  dans tous les cas).

En revanche, les vaches avaient l'œil plus longtemps écarquillé trois heures après l'épreuve (T3 Challenged) comparé à la même heure en situation de contrôle (T3 not Challenged) : 4 vaches présentaient l'œil écarquillé moins de 1 seconde lorsqu'elles étaient non challengées et lorsqu'elles l'étaient tandis que 7 vaches avaient l'œil écarquillé plus de 1 seconde trois heures après l'épreuve alors qu'elles avaient l'œil écarquillé moins de 1 seconde lors du temps T3 NOT CHALLENGED ( $p$ -value=0,023).

De plus, les vaches avaient moins longtemps le blanc de l'œil qui occupait moins de 25% de la surface du globe oculaire trois heures après l'épreuve (T3 Challenged) par rapport à une situation sans épreuve (T3 not Challenged) : 2 vaches présentaient un blanc de l'œil qui occupait moins de 25% du globe oculaire pendant moins de 31 secondes lors des deux temps T3 (challengé et en situation de contrôle) ; 1 vache avait le blanc de l'œil qui occupait moins de 25% de la surface du globe oculaire pendant plus de 31 secondes lors des deux temps T3 ; enfin, 6 vaches présentaient un blanc de l'œil qui occupait moins de 25% du globe oculaire pendant moins de 31

secondes alors que lors du temps T3 NOT CHALLENGED leur blanc de l'œil occupait moins de 25% de la surface du globe oculaire pendant plus de 31 secondes ( $p$ -value =0,041).

Au même temps, les vaches avaient tendance à avoir le blanc de l'œil qui occupait plus de 25% du globe oculaire plus longtemps lors de la comparaison 3h après l'épreuve (T3 Challenged) à la même heure lors de la situation de contrôle (T3 not Challenged) ( $p$ -value =0,074) : en effet, 5 vaches présentaient un blanc de l'œil occupant plus de 25% du globe plus de 1 seconde trois heures après l'épreuve alors que ce n'était pas le cas au même horaire avant l'épreuve.

#### ❖ Région buccale et péri-buccale : états et évènements codés en fréquence

Il n'y avait pas de changements significatifs concernant le mufle mobile rumine, la dilatation des narines, les mouvements du mufle, les coups de langue et les contractions du mufle au niveau de la région buccale avant et après l'épreuve (**tableau XXVI**) (Test de Mc Nemar,  $P > 0.05$  dans tous les cas).

Les vaches ont le mufle plus longtemps immobile 6h après l'épreuve (T6 Challenged) comparé à la situation de contrôle (T6 not Challenged) ( $p$ -value=0,027) : 9 vaches présentaient le mufle immobile plus de 6 secondes lors de la situation d'épreuve alors qu'elles gardaient le mufle immobile moins de 6 secondes lors de la situation de contrôle ; 1 vache présentait le mufle immobile moins de 6 secondes lors de la situation d'épreuve alors que son mufle était immobile plus de 6 secondes lors de la situation de contrôle ; enfin, 2 vaches ont gardé le mufle immobile plus de 6 secondes lors des deux situations.

Les vaches ont également tendance à avoir le mufle plus longtemps immobile 12h et 24h après l'épreuve (T12 et T24 Challenged) comparé aux mêmes heures lors de la situation de contrôle (T12 et T24 not Challenged) : aux deux temps, 5 vaches présentaient le mufle immobile plus de 6 secondes après épreuve alors que cela durait moins de 6 secondes au même horaire sans épreuve ( $p$ -value = 0,074 dans les 2 cas).

Les vaches présentaient un mufle mobile plus longtemps trois heures après l'épreuve (T3 Challenged) comparé au même horaire avant l'épreuve (T3 not Challenged) ( $p$ -value = 0,041) : 4 vaches présentaient le mufle mobile moins de 1 seconde lors des deux temps ; 2 vaches présentaient le mufle mobile plus de 1 seconde lors des deux temps ; enfin 6 vaches présentaient un mufle mobile moins de 1 seconde lors du temps T3 NOT CHALLENGED alors qu'elles avaient le mufle mobile plus de 1 seconde trois heures après l'épreuve.

Enfin, les vaches ont le mufle moins longtemps mobile lors de la prise alimentaire trois heures après l'épreuve (T3 Challenged) comparé à la même heure lors de la situation de contrôle (T3 not Challenged) ( $p$ -value = 0,023) : sur 12 vaches observées, 5 vaches présentaient un mufle mobile lié à la prise alimentaire moins de 1 seconde lors du temps T3 des deux situations (contrôle et épreuve) tandis que 7 vaches présentaient un mufle mobile lié à l'alimentation plus de 1 seconde lors du temps T3 NOT CHALLENGED alors que cela durait moins de 1 seconde lors du temps T3 CHALLENGED.

### ❖ Région auriculaire : états

Il n'y avait pas de changements significatifs concernant les positions d'oreille au niveau de la région auriculaire avant et après épreuve (**tableau XXVII**) (Test de Mc Nemar,  $P > 0.05$  dans tous les cas).

### ❖ Région oculaire et buccale/péribuccale : évènements codés en absence/présence

Nous n'avons pas mis en évidence de différence significative entre avant et après épreuve concernant l'œil humide, l'écoulement de l'œil, l'arcade gonflée, l'arcade striée, l'écoulement du mufle et les muscles proéminents (**tableau XXVIII**) (Test de Mc Nemar,  $P > 0.05$  dans tous les cas).

Les vaches présentaient plus fréquemment un œil creux six heures après l'épreuve (T6 Challenged) comparé au même horaire lorsqu'elles n'étaient pas en situation d'épreuve (T6 not Challenged) ( $p\text{-value} = 0,013$ ) : 3 vaches présentaient un œil non creux lors des deux situations (épreuve et contrôle) ; 2 vaches présentaient un œil creux à la fois lors de la situation de contrôle et lors de l'épreuve à T6 ; enfin, 8 vaches présentaient un œil creux à T6 CHALLENGED alors qu'elles ne l'avaient pas lors de la situation de contrôle, à la même heure.

Les vaches avaient plus souvent l'œil rouge à T3 lors de la situation d'épreuve (T3 Challenged) comparé à la situation de contrôle (T3 not Challenged) ( $p\text{-value} = 0,013$ ) : 2 vaches ne présentaient pas l'œil rouge lors des deux situations ; 1 vache présentait l'œil rouge lors des deux situations ; enfin, 8 vaches présentaient un œil rouge lors de la situation d'épreuve alors qu'elles ne l'avaient pas au même horaire lors de la situation de contrôle.

Les vaches avaient également tendance à avoir plus souvent l'œil rouge six heures après l'épreuve (T6 Challenged) comparé à la même heure en situation de contrôle (T6 not Challenged) ( $p\text{-value} = 0,074$ ) : 7 vaches ne présentaient pas l'œil rouge lors des deux situations tandis que 5 vaches n'ayant pas l'œil rouge lors de la situation de contrôle l'avaient lors de la situation d'épreuve.

**Tableau XXV : Table de concordance des vaches de l'étude sur l'inflammation généralisée exprimant la modalité m1 et la modalité m2 pour chaque paramètre de l'œil avant et après épreuve et résultats du test de McNemar (K-value et p-value) (NA= non applicable ; les cases en gras sont les résultats significatifs ou en tendance ; les cases grisées sont les exemples explicités sous le tableau)**

SIGNS		SIGNS AFTER CHALLENGE																	
		SIGNS BEFORE CHALLENGE T3, T6, T12, T24		T3 = 11h				T6 = 14h				T12 = 20h				T24 = 8h			
		m1	m2	K value	p-value	m1	m2	K value	p-value	m1	m2	K value	p-value	m1	m2	K value	p-value		
Œil ouvert	[0-37[ m1	2	2	0	1	1	2	0,167	0,683	1	1	0	1	0	2	0,5	0,480		
	[37-40] m2	3	4			4	3			2	1			0	2				
Œil mi-clos	[0-1[ m1	6	1	0,8	0,371	4	3	0	1	2	2	0,5	0,480	2	0	0,5	0,480		
	[1-40] m2	4	0			2	1			0	1			2	0				
Œil clos	[0-1[ m1	11	0	NA		9	1	0	1	4	0	0	1	4	0	NA			
	[1-40] m2	0	0	0	0	1	0			0	0								
Œil écarquillé	[0-1[ m1	4	7	5,143	0,023	9	1	0	1	5	0	NA		4	0	NA			
	[1-40] m2	0	0			0	0			0	0	0	0						
Blanc œil ≥ 25%	[0-1[ m1	0	5	3,2	0,074	4	3	0	1	1	0	0	1	1	0	NA			
	[1-40] m2	0	4			2	2			1	0			0	0				
Blanc œil < 25%	[0-31[ m1	2	0	4,167	0,041	1	3	0,25	0,617	0	1	0	1	0	0	NA			
	[31-40] m2	6	1			1	6			0	1			0	1				
Clignement	[0-5[ m1	1	3	0	1	0	4	0,167	0,683	4	0	0	1	3	0	0	1		
	[5-20] m2	3	4			2	4			1	0			1	0				
Contraction	[0-1[ m1	5	2	0	1	2	6	2,286	0,131	4	1	0	1	1	1	0	1		
	[1-5] m2	1	3			1	1			0	0			2	0				
Larme	[0-1[ m1	11	0	NA		10	0	NA		5	0	NA		4	0	NA			
	[1-5] m2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		

NB : par exemple, si l'on compare les temps T3 en situation de contrôle et d'épreuve (case grisée) pour le paramètre œil ouvert : il y avait 2 vaches qui ouvraient l'œil moins de 37 secondes en contrôle et en épreuve ; 2 vaches ouvraient l'œil moins de 37 secondes en situation de contrôle et plus de 37 secondes en situation d'épreuve ; 3 vaches ouvraient l'œil plus de 37 secondes en T3 NOT CHALLENGED et moins de 37 secondes en T3 CHALLENGED et enfin 4 vaches ouvraient l'œil plus de 37 secondes lors des deux situations : les vaches « discordantes » sont donc les 2 vaches présentant la modalité m1 en situation de contrôle et m2 en situation d'épreuve ainsi que les 3 vaches présentant la modalité m2 en situation de contrôle et m1 en situation d'épreuve ; la k-value associée à cette table de discordance est de 0 et la p-value de 1.

**Tableau XXVI : Table de concordance des vaches de l'étude sur l'inflammation généralisée exprimant la modalité m1 et la modalité m2 pour chaque paramètre du mufle avant et après épreuve et résultats du test de McNemar (K-value et p-value) (NA= non applicable ; les cases en gras sont les résultats significatifs ou en tendance ; les cases grisées sont les exemples explicités sous le tableau)**

SIGNS		SIGNS AFTER CHALLENGE																			
		SIGNS BEFORE CHALLENGE T3, T6, T12, T24				T3 =11h				T6 = 14h				T12 = 20h				T24 = 8h			
		m1	m2	K value	p-value	m1	m2	K value	p-value	m1	m2	K value	p-value	m1	m2	K value	p-value				
Mufle immobile	[0-6[ m1	2	6	1,125	0,289	0	9	<b>4,9</b>	<b>0,027</b>	3	5	<b>3,2</b>	<b>0,074</b>	1	5	<b>3,2</b>	<b>0,074</b>				
	[6-40] m2	2	2			1	2			0	4			0	7						
Mufle mobile	[0-1[ m1	4	6	<b>4,167</b>	<b>0,041</b>	4	3	0	1	7	2	0	1	5	1	2,286	0,131				
	[1-40] m2	0	2			2	3			3	0			6	1						
Mufle mobile mange	[0-1[ m1	5	0	<b>5,143</b>	<b>0,023</b>	9	0	1,333	0,248	10	0	0,5	0,480	13	0	NA					
	[1-40] m2	7	0			3	0			2	0			0	0						
Mufle mobile rumine	[0-1[ m1	10	0	0,5	0,480	7	0	2,25	0,134	2	3	0,125	0,724	6	1	1,5	0,221				
	[1-40] m2	2	0			4	1			5	2			5	1						
Coups de langue	[0-1[ m1	9	2	0	1	9	1	0	1	10	0	0	1	9	0	2,25	0,134				
	[1-20] m2	1	0			2	0			1	1			4	0						
Contractions mufle	[0-1[ m1	9	3	1,333	0,248	11	0	0	1	12	0	NA		12	1	0	1				
	[1-20] m2	0	0			1	0			0	0			0							
Dilatation narines	[0-1[ m1	8	4	2,25	0,134	10	2	0,5	0,480	12	0	NA		11	1	0	1				
	[1-20] m2	0	0			0	0			0	0			1	0						
Mouvements mufle	[0-1[ m1	8	2	0	1	7	1	0	1	8	3	0,25	0,617	10	0	1,333	0,248				
	[1-11] m2	2	0			2	2			1	0			3	0						

NB : par exemple, si l'on compare les temps T12 CHALLENGED et T12 NOT CHALLENGED (case grisée) pour le paramètre contractions du mufle : sur les 12 vaches observées, les 12 présentaient 0 contractions du mufle lors des deux situations : il n'y avait donc pas de vaches discordantes ; la k-value et la p-value ne pouvaient donc pas être calculées.

**Tableau XXVII : Table de concordance des vaches de l'étude sur l'inflammation généralisée exprimant la modalité m1 et la modalité m2 pour chaque position d'oreille avant et après épreuve et résultats du test de McNemar (K-value et p-value) (NA= non applicable ; les cases en gras sont les résultats significatifs ou en tendance ; les cases grisées sont les exemples explicités sous le tableau)**

SIGNS AFTER CHALLENGE																		
SIGNS	SIGNS BEFORE CHALLENGE T3, T6, T12, T24		T3 = 11h				T6 = 14h				T12 = 20h				T24 = 8h			
			m1	m2	K value	p-value	m1	m2	K value	p-value	m1	m2	K value	p-value	m1	m2	K value	p-value
Oreille A	[0-1[	m1	4	2	0,571	0,450	1	3	0,125	0,724	6	1	0	1	10	2	0	1
	[1-40]	m2	5	1			5	4			2	3			1	0		
Oreille B	[0-2[	m1	3	1	0	1	2	4	0	1	3	2	0	1	6	3	0	1
	[2-40]	m2	2	6			3	4			2	5			2	2		
Oreille C	[0-1[	m1	11	1	0	1	11	2	0,5	0,480	10	2	0,5	0,480	13	0	NA	
	[1-40]	m2	0	0			0	0			0	0			0	0		
Oreille D	[0-5[	m1	2	4	0,167	0,683	7	3	0,25	0,617	4	2	0,571	0,450	2	3	0,125	0,724
	[5-40]	m2	2	4			1	2			5	1			5	3		
Oreille E	[0-1[	m1	11	0	0	1	9	3	0,25	0,617	9	1	0	1	8	4	0,8	0,371
	[1-40]	m2	1	0			1	0			2	0			1	0		
Oreille ASYM	[0-3[	m1	3	4	0,167	0,683	4	1	2,286	0,131	7	2	0	1	4	2	0,167	0,683
	[3-40]	m2	2	3			6	2			3	0			4	3		

NB : si l'on compare les temps T6 CHALLENGED et T6 NOT CHALLENGED (case grisée) pour le paramètre Oreille C : il y avait 11 vaches qui présentaient la position « oreille C » moins de 1 seconde lors de la situation de contrôle et d'épreuve tandis que 2 vaches présentaient la position d'oreille C plus de 1 seconde lors de la situation d'épreuve et moins de 1 seconde lors de la situation de contrôle : il y a donc une seule vache discordante : la k-value associée est de 0,5 et la p-value est de 0,480.

**Tableau XXVIII : Table de concordance des vaches de l'étude sur l'inflammation généralisée exprimant la modalité m1 et la modalité m2 pour chaque évènement codé en absence/présence avant et après épreuve et résultats du test de McNemar (K-value et p-value) (NA= non applicable ; les cases en gras sont les résultats significatifs ou en tendance ; les cases grisées sont les exemples explicités sous le tableau)**

SIGNS		SIGNS AFTER CHALLENGE																	
		SIGNS BEFORE CHALLENGE T3, T6, T12, T24		T3 = 11H				T6 =14h				T12 = 20h				T24 =8h			
				m1	m2	K value	p-value	m1	m2	K value	p-value	m1	m2	K value	p-value	m1	m2	K value	p-value
<b>Œil humide</b>	NON	m1	8	1	0	1	10	1	0	1	2	0	0	1	1	1	0	1	
	OUI	m2	2	1			0	2			1	0			0	0			
<b>Œil creux</b>	NON	m1	2	5	0,57	0,450	3	8	<b>6,125</b>	<b>0,013</b>	1	0	NA	1	4	0,8	0,371		
	OUI	m2	2	3			0	2			0	4			1	2			
<b>Ecoulement de l'œil</b>	NON	m1	11	0	0	1	12	0	0	1	NA	NA	2	0	NA	NA	NA		
	OUI	m2	1	0			1	0					0	0					
<b>Œil rouge</b>	NON	m1	2	8	<b>6,125</b>	<b>0,013</b>	7	5	<b>3,2</b>	<b>0,074</b>	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA		
	OUI	m2	0	1			0	0											
<b>Ecoulement du mufle</b>	NON	m1	11	0	NA	NA	10	0	NA	NA	11	0	NA	11	1	0	1		
	OUI	m2	0	0			0	0			0	0		0	0				
<b>Arcade striée</b>	NON	m1	8	0	0,5	0,480	8	1	0,25	0,617	1	0	0	1	2	2	0	1	
	OUI	m2	2	1			3	1			1	1			1	0			
<b>Arcade gonflée</b>	NON	m1	4	2	0	1	5	3	0	1	2	2	0	1	1	4	0,8	0,371	
	OUI	m2	2	4			2	3			1	4			1	3			
<b>Muscles proéminents</b>	NON	m1	12	0	NA	NA	13	0	NA	NA	9	1	0	1	12	0	0	1	
	OUI	m2	0	0			0	0			2	0			1	0			

**NB : lors de la comparaison des temps T24 CHALLENGED et T24 NOT CHALLENGED (case grisée) pour le paramètre « œil rouge » : il restait seulement 1 vidéo exploitable donc la table de discordance n'a pas pu être réalisée, tout comme le test de Mc Nemar.**



## ii. Résultats de l'analyse discriminante

La discrimination des 8 groupes (4 temps et 2 états, car suppression de T0) a été testée (**tableau XXIX et figure n°19**). Les composantes 1 et 2 représentaient, respectivement, 24,7 % et 20,9 %, soit 45,6 % de la variance totale expliquée par le modèle.

La composante 1 était principalement expliquée par les indicateurs suivants : présence des yeux rouges (0,782 ; = corrélation de la variable à l'axe de 78,2%), les yeux écarquillés [1 ; 40[ (0,691), la visibilité du blanc de l'œil supérieure à 25% [1 ; 40[ (0,552), l'absence d'écoulement de l'œil (0,464) et la dilatation des narines [1 ; 20[ (0,402) pour les valeurs positives ; les yeux écarquillés [0 ; 1[ (-0,691), la visibilité du blanc de l'œil supérieure à 25% [0 ; 1[ (-0,552) et la dilatation des narines [0 ; 1[ (-0,402) pour les valeurs négatives.

La composante 2 s'expliquait principalement par les indicateurs suivants : absence des yeux rouges (0,658), l'absence d'écoulement de l'œil (0,625), les clignements de l'œil [5 ; 20[ (0, 565), le mufle mobile mange [1 ; 40[ (0,497) et la position d'oreille A [1 ; 40[ (0,426) pour les valeurs positives ; les clignements de l'œil [0 ; 5[ (-0, 565), le mufle mobile mange [0 ; 1[ (-0,497) et la position d'oreille A [0 ; 1[ (- 0,426) pour les valeurs négatives (**tableau XXIX**).

La **figure n°19A** montre deux groupes d'indicateurs corrélés qui contribuaient le plus à discriminer les 8 groupes :

- (i) la présence des yeux rouges, l'œil écarquillé (m1 en valeurs négatives, m2 en valeurs positives) ,
- (ii) l'absence des yeux rouges, le mufle mobile mange (m1 en valeurs négatives, m2 en valeurs positives) et la position de l'oreille A (m1 en valeurs négatives, m2 en valeurs positives) .

La **figure n°19B** montre que les groupes T12 CHALLENGED/NOT CHALLENGED et T24 CHALLENGED/ NOT CHALLENGED avaient tendance à obtenir des scores globalement moyens sur les indicateurs du groupe (i) et du groupe (ii).

Dans le quart inférieur droit du plan factoriel, le groupe T3 CHALLENGED avait tendance à avoir les valeurs les plus élevées pour les indicateurs du groupe (i) soit la présence des yeux rouges et l'œil écarquillé [1 ; 40[.

Dans le quart supérieur gauche, le groupe T3 NOT CHALLENGED et dans une moindre mesure le groupe T6 NOT CHALLENGED avaient tendance à avoir des valeurs supérieures pour les indicateurs du groupe (ii) soit l'absence d'œil rouge, le mufle mobile mange [1 ; 40[ et l'oreille A [1 ; 40[ .

**Tableau XXIX : Analyse factorielle discriminante sur les expressions faciales des vaches de l'expérience sur l'inflammation généralisée : proportion de variance expliquée par chaque composante, et corrélations de chaque variable à la composante**

	<b>Axe 1</b>	<b>Axe 2</b>
<b>Pourcentage de variabilité expliquée</b>	<b>24,7</b>	<b>20,9</b>
<b>Contribution de chaque variable à la composante</b>		
YEUX ROUGES : OUI	<b>0,782</b>	-0,008
YEUX ECARQUILLES [1-40[	<b>0,691</b>	-0,153
VISIBILITE BLANC SUP 25 [1-40[	<b>0,552</b>	0,307
ECOULEMENT OEIL : NON	<b>0,464</b>	<b>0,625</b>
DILATATIONS NARINES [1-20[	<b>0,402</b>	-0,114
CLIGNEMENT [5-20[	0,344	<b>0,565</b>
MUFLE MOBILE [1-40[	0,315	-0,049
ARCADE STRIEE : NON	0,307	0,204
MUFLE MOBILE RUMINE [0-1[	0,299	0,099
CONTRACTION MUFLE [1-20[	0,289	-0,095
CONTRACTION [1-5[	0,266	0,250
YEUX CREUX : OUI	0,236	-0,074
MUFLE MOBILE MANGE [0-1[	0,175	<b>-0,497</b>
OREILLE D [5-40[	0,161	-0,117
VISIBILITE BLANC INF 25 [0-31[	0,145	-0,357
OREILLE C [1-40[	0,136	-0,051
MUSCLES PROEMINENTS : NON	0,112	0,031
YEUX MI-CLOS [0-1[	0,111	-0,060
MUFLE IMMOBILE [6-40[	0,111	-0,262
OREILLE E [0-1[	0,101	0,018
ECOULEMENT MUFLE : NON	0,099	-0,125
ARCADE GONFLEE : NON	0,088	0,233
OREILLE B [2-40[	0,086	0,147
OREILLES ASYMETRIQUES [3-40[	0,069	0,055
YEUX HUMIDES : OUI	0,052	0,161
YEUX CLOS [1-40[	0,042	0,076
COUP LANGUE[1-20[	0,034	-0,058
YEUX OUVERTS [37-40[	0,029	0,191
MOUVEMENT MUFLE [1-11[	0,021	0,083
OREILLE A [0-1[	0,018	<b>-0,426</b>
ARCADE GONLFEE : OUI	0,007	-0,066
LARME [0-1[	0,000	0,000
OREILLE A [1-40[	-0,018	<b>0,426</b>
MOUVEMENT MUFLE [0-1[	-0,021	-0,083
YEUX OUVERTS [0-37[	-0,029	-0,191
COUP LANGUE [0-1[	-0,034	0,058
YEUX CLOS [0-1[	-0,042	-0,076
OREILLES ASYMETRIQUES [0-3[	-0,069	-0,055
ECOULEMENT OEIL : OUI	-0,074	0,218
ECOULEMENT MUFLE : NON VISIBLE	-0,075	0,181
ECOULEMENT MUFLE : OUI	-0,076	-0,112
ARCADE STRIEE : OUI	-0,083	0,161
YEUX CREUX : NON	-0,084	0,321
OREILLE B [0-2[	-0,086	-0,147
OREILLE E [1-40[	-0,101	-0,018
MUFLE IMMOBILE [0-6[	-0,111	0,262
YEUX MI-CLOS [1-40[	-0,111	0,060
MUSCLES PROEMINENTS : OUI	-0,112	-0,031
OREILLE C [0-1[	-0,136	0,051
YEUX ROUGES : NON	-0,139	<b>0,658</b>
VISIBILITE BLANC INF 25 [31-40[	-0,145	0,357
OREILLE D [0-5[	-0,161	0,117
MUFLE MOBILE MANGE [1-40[	-0,175	<b>0,497</b>
ARCADE GONFLEE : NON VISIBLE	-0,175	-0,309
YEUX CREUX : NON VISIBLE	-0,232	-0,358
CONTRACTION [0-1[	-0,266	-0,250
CONTRACTION MUFLE [0-1[	-0,289	0,095
ARCADE STRIEE : NON VISIBLE	-0,294	-0,398
MUFLE MOBILE RUMINE [1-40[	-0,299	-0,099
MUFLE MOBILE [0-1[	-0,315	0,049
CLIGNEMENT [0-5[	-0,344	<b>-0,565</b>
YEUX HUMIDES : NON VISIBLE	-0,366	<b>-0,569</b>
DILATATIONS NARINES [0-1[	<b>-0,402</b>	0,114
ECOULEMENT OEIL : NON VISIBLE	<b>-0,448</b>	<b>-0,698</b>
YEUX ROUGES : NON VISIBLE	<b>-0,456</b>	<b>-0,663</b>
VISIBILITE BLANC SUP 25 [0-1[	<b>-0,552</b>	-0,307
YEUX ECARQUILLES [0-1[	<b>-0,691</b>	0,153



#### 4. Discussion

Cette étude sur 13 vaches laitières a mis en évidence des changements significatifs (et quelques tendances) patho-physiologiques (augmentation du cortisol plasmatique à 3 et 6hpi, de l'haptoglobine à 24hpi, des cytokines à 3hpi et de la température rectale à 3 et 6hpi) et de l'expression faciale au cours d'une épreuve inflammatoire systémique.

Après l'épreuve, les modifications physio-pathologiques concernaient : l'augmentation du cortisol plasmatique, de la température rectale et des cytokines dans les 3 à 6 heures après infusion de LPS et de la concentration en haptoglobine à 24 hpi. Concernant l'expression faciale, au cours des 40 secondes d'observation, à 3hpi, les vaches étaient plus nombreuses à présenter un écarquillement de l'œil plus de 1 seconde et l'œil rouge et elles étaient moins nombreuses à avoir un blanc de l'œil occupant moins de 25% de la surface du globe oculaire pendant moins de 31 secondes. Elles étaient également plus nombreuses à présenter un mufler mobile lors de la prise alimentaire pendant moins de 1 seconde alors qu'elles étaient plus nombreuses à présenter un mufler mobile hors activité alimentaire pendant plus de 1 seconde. En T6, les vaches étaient plus nombreuses à garder plus longtemps le mufler immobile et à avoir présenté l'œil creux et elles avaient tendance à avoir plus souvent l'œil rouge.

Nous avons également montré qu'en T3 CHALLENGED, les vaches se différenciaient des autres par la présence des yeux rouges et de l'œil écarquillé plus de 1 seconde. En T3 et T6 NOT CHALLENGED, les vaches se différenciaient par l'absence d'œil rouge et par un temps plus conséquent de l'indicateur mufler mobile mange ainsi qu'un temps plus important du paramètre oreille A (c'est-à-dire oreilles vers l'avant).

Nos résultats devraient être confrontés à ceux d'études complémentaires qui utilisent d'autres dosages de LPS, avec des épreuves utilisant des bactéries vivantes ainsi qu'en utilisant des cas de douleur systémique spontanée. Cela nous permettrait de vérifier leur validité dans d'autres contextes.

##### a. Réponse physiologique et clinique

L'infusion de 0,5 µg/kg de LPS dans la veine jugulaire a induit, chez les vaches, une élévation de la concentration en cortisol plasmatique entre 3 et 6 hpi, une augmentation de la température rectale à 6 hpi, une augmentation de la concentration en haptoglobine plasmatique à 24 hpi ainsi qu'une augmentation des concentrations en cytokines à 3 hpi.

Après l'infusion de LPS, la concentration en cortisol plasmatique a été multipliée par 4 à 6 selon l'âge des vaches, entre 3 et 6 hpi. L'augmentation de la concentration en cortisol plasmatique a donc été plus conséquente que dans l'expérience précédente et que dans l'étude de Zimov et al (2011 ; multiplié par 2). Cela peut être lié à l'intensité de la réponse inflammatoire qui est plus marquée dans notre étude puisque c'est une douleur généralisée.

L'infusion de LPS a également été à l'origine d'une augmentation significative de la température rectale 6 heures après l'épreuve jusqu'à 40,1°C à 40,3°C en fonction de l'âge des vaches. Cela correspond aux données de la bibliographie (40°C dans Zimov et al, 2011, plus de 41°C dans Fitzpatrick et al, 2013). L'augmentation de la température rectale est donc plutôt marquée lors de notre expérience sur l'inflammation systémique.

La concentration en haptoglobine a également augmenté à 24 hpi et les cytokines ont atteint un taux significatif à 3 hpi. L'augmentation de l'haptoglobine plusieurs heures après un événement douloureux se retrouve dans d'autres études chez les ovins (castration, Durand et al, 2019) ; elle est aussi présente lors de mammites chez les bovins (de Boyer des Roches et al., 2017) entre 32 et 80 heures après l'épreuve. Cette différence d'horaire concernant l'augmentation de la concentration en haptoglobine peut s'expliquer par la différence de stimulus (localisé pour la mammite, systémique pour notre étude).

## b. Variations des expressions faciales lors de douleur

### i. Région orbitaire

Au cours des 40 secondes d'observation, les vaches étaient plus nombreuses à écarquiller l'œil plus longtemps à 3 hpi alors que ce n'était pas le cas lors de la situation de contrôle ; elles étaient également plus nombreuses à avoir un blanc de l'œil occupant moins de 25% du globe oculaire pendant moins de temps et elles avaient tendance à avoir plus longtemps le blanc de l'œil occupant plus de 25% du globe oculaire : en conclusion, à 3hpi, les vaches ont l'œil plus longtemps écarquillé et cela implique que l'on voit plus longtemps le blanc de l'œil occupant plus de 25% de la surface du globe oculaire. Il y a peu de données bibliographiques sur le sujet mais une autre étude ayant étudié ce paramètre n'a pas obtenu de résultats significatifs (Gleerup et al, 2015 A).

Nous n'avons pas été en mesure de montrer de différence significative avant et après épreuve pour la durée de fermeture de l'œil, qu'elle soit totale ou partielle bien que ce soit un résultat récurrent dans la bibliographie (chez le rat lors d'injection intra-articulaire ou de laparotomie (Sotocinal et al, 2011), la souris lors de constriction abdominale avec de l'acide acétique (Langford et al, 2010), le cheval lors d'application de capsaïcine ou d'un garrot sur le membre antérieur (Gleerup et al, 2015 B), les ovins lors de mammite ou de piétain (McLennan et al, 2016) et le chat lors de douleur abdominale (Evangelista et al, 2019)). Cela peut s'expliquer par le fait que nous n'utilisons pas le même stimulus douloureux : en effet certaines de ces études impliquent un stimulus douloureux systémique (notamment pour le chat, la souris ou certains rats) et d'autres impliquent un stimulus douloureux localisé appliqué sur un membre (certains rats ou encore le cheval et les ovins).

Les vaches avaient plus fréquemment l'œil creux à 6 heures après épreuve ainsi que l'œil rouge à T3 CHALLENGED alors qu'elles ne l'avaient pas en situation de contrôle. Cependant, il n'existe pas de données bibliographiques permettant de confronter ces résultats. L'œil creux et la sclère teintée de rouge semblent donc être des indicateurs de la douleur systémique.

## *ii. Région buccale et péribuccale*

Les vaches étaient moins nombreuses à présenter un mufle mobile lié à la prise d'alimentation à 3 hpi par rapport à la situation de contrôle. Ce résultat semble confirmer ceux obtenus par Zimov et al (2011) lors de mammite chez les bovins ainsi que ceux obtenus dans notre expérience précédente. Il semblerait donc que les vaches en situation de douleur présentent moins longtemps le mufle mobile lié à une prise alimentaire.

Les vaches avaient également un mufle plus longtemps mobile en dehors des activités alimentaires lors de la situation d'épreuve à T3 (par rapport à T3 NOT CHALLENGED) alors qu'elles avaient le mufle plus longtemps immobile à T6 (comparé à T6 NOT CHALLENGED). Il y a peu de données bibliographiques concernant ces paramètres permettant une comparaison. Un mufle immobile plus de 6 secondes à 6 hpi semble donc un indicateur de la douleur systémique, tout comme la présence d'un mufle mobile à 3 hpi.

## *iii. Région auriculaire*

Nous n'avons pas été en mesure de mettre en évidence une différence significative concernant les positions d'oreille entre la situation d'épreuve et de contrôle bien que la bibliographie décrive des oreilles plutôt en position basse ou vers l'arrière lors de situation douloureuse (castration de cheval pour Dalla Costa et al, 2014; divers stimuli chez les bovins pour Gleerup et al, 2015 A ; mammite et piétain chez les ovins pour McLennan et al, 2016; caudectomie chez les ovins pour Guesgen et al, 2016). La similitude de certaines positions d'oreille et donc la difficulté à coder ces paramètres peuvent expliquer cette absence de résultats.

## ANALYSE DISCRIMINANTE

Lors de l'inflammation aiguë (T3 CHALLENGED), les vaches se différenciaient des autres moments par la présence des yeux rouges et la durée plus conséquente de l'écarquillement de l'œil. La présence de l'œil rouge et d'un œil écarquillé semblent donc être deux indicateurs de la douleur systémique à 3 hpi.

Le groupe T3 NOT CHALLENGED et dans une moindre mesure le groupe T6 NOT CHALLENGED se différenciaient des autres par le fait que les vaches étaient plus nombreuses à présenter un mufle mobile lié à l'alimentation, présentaient moins fréquemment les yeux rouges et une position d'oreille A (position vers l'avant) plus longtemps. Ceci rejoint les données de la bibliographie puisqu'il a été établi que les vaches présentaient plus souvent les oreilles vers l'avant lors de situation non douloureuse (Gleerup et al, 2015 A).

## *c. Bilan et limites de l'étude*

Plusieurs raisons pourraient expliquer nos résultats tels que la présence d'œil creux et le mufle immobile à 6 hpi, l'œil rouge et écarquillé et le mufle mobile à 3 hpi, ou, au contraire, l'absence de différence significative constatée pour certains indicateurs (par exemple la fermeture de l'œil, la dilatation des narines ou la position des oreilles): la qualité des vidéos, la méthode d'observation, le choix des seuils, le modèle de douleur utilisé.

Premièrement, la qualité des vidéos était vraiment moindre dans cette étude en raison de la luminosité faible dans le bâtiment à certaines heures de la journée. Il était donc difficile de coder certains paramètres tels que la « visibilité du blanc de l'œil », « l'œil rouge » ou encore « l'écoulement de l'œil » notamment aux temps T0, T12 et T24, que ce soit lors de la situation de contrôle ou d'épreuve. La conséquence étant qu'en raison de la faible quantité de vidéos conservées à ces temps-là, les analyses statistiques n'ont pas toujours été possibles. Il pourrait donc être intéressant de tester ces indicateurs lors de nouvelles études utilisant des images de meilleure qualité.

Deuxièmement, la méthode d'enregistrement des vidéos que nous avons utilisée (comescope sur pied) impliquait la présence d'un observateur relativement proche des animaux tandis que dans d'autres études, il n'y avait pas d'observateur, seulement une caméra fixée dans l'environnement de vie de l'animal (Sotocinal et al, 2011; Langford et al, 2010; Evangelista et al, 2019; Gleerup et al, 2015 A). La présence humaine a pu modifier la réaction des bovins (Dalla Costa et al., 2014).

Troisièmement, nos vidéos étaient de 2 à 3 minutes puis elles étaient fractionnées en séquence de 40 secondes. Dans les autres études, les enregistrements étaient plus longs (20 minutes pour Gleerup et al, 2015 A, 30 minutes pour Dalla Costa et al, 2014, 6 minutes pour Evangelista et al, 2019) puis les photos les plus utiles étaient prélevées (c'est-à-dire lorsque l'animal était immobile, de face ou de profil et que la photo contenait uniquement la face). Cette différence de support d'observation (photo vs vidéo) et la manière de choisir une photo ajoutent un biais de sélection que nous n'avons pas ici et peut expliquer la différence de résultats. La durée différente peut aussi expliquer la différence de résultats obtenus.

Quatrièmement, les seuils que nous avons définis peuvent être remis en question. Nous avons fait le choix de fixer le seuil par rapport à la médiane de l'ensemble des données des temps avant épreuve afin de pouvoir comparer si la répartition des vaches par rapport à cette médiane variait après épreuve mais nous aurions pu fixer le seuil de manière différente ; par exemple, la durée d'observation étant de 40 secondes, nous aurions pu fixer le seuil à la moitié, soit 20 secondes afin de comparer avant et épreuve s'il y avait plus de vaches avant ou après la moitié de ce temps d'observation.

Cinquièmement, notre modèle de douleur impliquait une douleur généralisée mais il y a peu de données bibliographiques avec des protocoles similaires, ce qui réduit considérablement les possibilités de confronter nos résultats.

Sixièmement, cette stratégie consistait à étudier la durée des états alors que dans les autres études, c'est l'absence/présence des paramètres qui est étudié puisque l'étude se fait sur photographie. Il pourrait donc être pertinent de faire la même chose pour tous les paramètres pour pouvoir comparer nos résultats. Aussi, il est plus facile de coder l'absence/présence d'un indicateur que sa durée précise, les résultats sont donc plus fiables.

#### d. Conclusion

Cette seconde étude a permis de montrer que l'expression faciales de bovins confrontés à une inflammation systémique varie. En effet à 3 hpi, les bovins sont plus nombreux à avoir l'œil écarquillé plus longtemps et donc le blanc de l'œil visible à plus de 25%, l'œil rouge et le mufle mobile plus longtemps alors qu'elles sont moins nombreuses à présenter le mufle mobile lors de la prise alimentaire. A 6hpi, les bovins sont plus nombreux à avoir le mufle immobile plus longtemps et à avoir l'œil creux. Ils ont également tendance à avoir l'œil rouge. Enfin à 12 et 24 hpi, les bovins ont tendance à être plus nombreux à avoir le mufle immobile plus longtemps. Nous avons également montré qu'à T3 et T6 en situation de contrôle, les bovins se différencient par l'absence d'œil rouge, la mobilité du mufle lors de l'alimentation pendant plus de 1 seconde et la présence de la position « oreilles vers l'avant » pendant plus de 1 seconde.

Nous avons aussi montré que des modifications patho-physiologiques avaient lieu : l'augmentation de la concentration en cortisol plasmatique et de la température rectale à 3 et 6 hpi, l'augmentation des cytokines à 3 hpi et l'augmentation de l'haptoglobine à 24 hpi.



#### **IV. Discussion générale, conclusion et perspectives**

Ces deux expériences ont permis de confronter les expressions faciales de vaches laitières soumises à des situations sources de douleur ou non. Nous avons obtenu des résultats pour deux situations contrastées : une douleur localisée (première expérience) et une douleur généralisée (seconde expérience). Au vu des résultats, il semblerait que l'inflammation systémique provoque une réponse plus marquée pour les paramètres physiologiques/cliniques (concentration de cortisol, température rectale).

Concernant les expressions faciales, les modifications semblent plus marquées lors de douleur associée à une inflammation systémique provoquée par une injection intra-veineuse de 0,5 µg/kg de LPS que lors d'une inflammation mammaire provoquée par 25 µg de LPS.

Concernant les yeux, l'inflammation systémique a provoqué un creusement de l'œil, une coloration rouge de la sclère et un écarquillement de l'œil. Cependant, l'éthogramme que nous avons utilisé était plus étoffé lors de la seconde expérience comparé à la première. La différence d'éthogramme peut expliquer cette différence de résultats. Il pourrait être intéressant d'utiliser ces paramètres supplémentaires afin de ré-analyser les vidéos issues de la première expérience.

Les résultats des deux études semblent contradictoires en ce qui concerne la position d'oreille A (oreilles orientées vers l'avant). Dans la première expérience (douleur mammaire), les vaches adoptaient plutôt cette position 7 heures après l'épreuve alors que les vaches de la seconde expérience (douleur systémique) l'adoptaient avant l'épreuve, en T3 et T6 NOT CHALLENGED. Les données de la bibliographie semblent plutôt en faveur des résultats obtenus dans la seconde expérience (Gleerup et al, 2015 A lors de divers stimuli chez les bovins ; Sotocinal et al, 2011 lors de l'injection intra-plantaire ou de laparotomie chez les rats; Dalla Costa et al, 2014 lors de la castration chez les chevaux). Nos résultats suggèrent que les modifications de posture d'oreilles pourraient être exprimées par les bovins dans certaines situations de douleur, certainement lorsque le niveau de douleur atteint un certain seuil. Des études complémentaires seront nécessaires pour confirmer cette hypothèse.

Nos deux études ont montré que certaines items des expressions faciales pourraient être utilisées pour détecter la douleur chez les bovins, et ce dans les deux situations. En effet, lors d'une douleur localisée, les vaches présentaient une diminution de la fréquence de clignements de l'œil, de la mobilité du mufle liée à l'alimentation, des oreilles plutôt vers l'avant, des larmes et un écoulement de l'œil plus fréquent qu'en absence de douleur. Lors d'une douleur systémique, les vaches présentaient un œil plutôt rouge, une mobilité du mufle liée à l'alimentation diminuée, un œil creux, un œil écarquillé avec une proportion du blanc de l'œil visible supérieure à 25%.

Ces résultats semblent plus marqués lors d'une douleur systémique que lors d'une douleur localisée, il conviendrait donc de tester la pertinence de ces indicateurs sur d'autres situations douloureuses afin de vérifier que cela peut se transposer à d'autres situations. Il pourrait être possible de créer une grille d'évaluation et de quantification de la douleur chez la vache pour faciliter l'évaluation et donc la prise en charge de la douleur sur le terrain par le vétérinaire. Cela permettrait notamment d'avoir une évaluation à distance, sans manipuler ou approcher le bovin.

Enfin, l'éthogramme différait concernant la coloration de la sclère, la visibilité du blanc de l'œil, les coups de langue et les contractions du mufle entre les deux études. Il serait alors pertinent d'appliquer l'éthogramme intégral de la seconde expérience à une situation de douleur localisée pour vérifier si les indicateurs tels que la couleur du blanc de l'œil ou encore la proportion de blanc de l'œil visible sont significativement différents lors de douleur mammaire ou non. Ainsi, nous pourrions développer une grille qui différencie les deux types de douleur.

## CONCLUSION

Cette thèse s'intéresse aux expressions faciales des mammifères domestiques (bovins, équins, ovins, carnivores, rongeurs) lors de situation douloureuse.

La revue de la bibliographie scientifique et technique a permis de faire un état des lieux sur les mécanismes de la douleur, sur les sources de douleur en élevage bovin ainsi que sur les manifestations comportementales, physiologiques, biochimiques et zootechniques de la douleur chez les mammifères domestiques. Elle a aussi permis de synthétiser les connaissances acquises sur les expressions faciales de la douleur chez ces mêmes espèces. Ainsi, nous avons mis en évidence que malgré les différences anatomiques entre certaines espèces, les expressions faciales présentent des similitudes lors de situation douloureuse : une contraction des paupières avec leur fermeture partielle ou totale, des oreilles orientées vers le bas et/ou vers l'arrière, une tension ou un renflement dans le mufle, une contraction des lèvres et un changement d'orientation des vibrisses pour les espèces qui en possèdent.

Deux études expérimentales ont ensuite permis de caractériser les variations de l'expression faciale lors d'une épreuve inflammatoire intra-mammaire ou systémique.

La première étude a montré que lors d'une inflammation mammaire, les vaches étaient plus nombreuses à avoir le mufle mobile moins longtemps lié à la prise alimentaire, et elles avaient tendance à moins cligner des yeux et à avoir le mufle plus longtemps immobile. De plus, elles étaient plus nombreuses à avoir tendance à présenter les oreilles vers l'avant. La douleur provoquée par une inflammation mammaire a donc engendré une modification des expressions faciales chez les bovins.

La deuxième étude a montré que lors d'une épreuve inflammatoire systémique, les vaches présentaient un œil creux, rouge et/ou écarquillé. Elles présentaient également un mufle immobile plus longtemps 6 heures après le challenge alors qu'il était plus mobile 3 heures après le challenge. De plus, elles présentaient un mufle mobile lié à l'alimentation moins longtemps après l'épreuve qu'avant. La douleur provoquée par une inflammation systémique a donc engendré une modification des expressions faciales chez les bovins.

Ces résultats suggèrent enfin que les expressions de la région oculaire diffèrent selon le type d'inflammation : lors de douleur systémique les vaches présentaient l'œil creux et écarquillé alors que cela n'a pas été mis en évidence lors de douleur mammaire. Toutefois, il ne nous a pas été possible de comparer le paramètre « œil rouge » puisqu'il n'était pas présent dans l'éthogramme de la première expérience, car pas observé alors. Lors de douleur mammaire, les vaches présentaient les oreilles vers l'avant alors que cela n'a pas été mis en évidence lors de douleur systémique.

Certains éléments de l'expression faciale des bovins pourraient donc être utilisés par les professionnels (éleveurs, vétérinaires) pour détecter la douleur chez les bovins et pour discriminer sa source. Cependant, il sera nécessaire de tester ces indicateurs dans d'autres situations douloureuses afin d'être en mesure de créer une grille d'évaluation adaptée à plusieurs contextes.



## BIBLIOGRAPHIE

- Akintola, T., Raver, C., Studlack, P., Uddin, O., Masri, R., Keller, A., 2017. The grimace scale reliably assesses chronic pain in a rodent model of trigeminal neuropathic pain. *Neurobiol. Pain* 2, 13–17. <https://doi.org/10.1016/j.ynpai.2017.10.001>
- ANSES, 2018. Avis de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif au bien-être animal : contexte, définition et évaluation [WWW Document]. Ansesfr En Ligne. URL <https://www.anses.fr/fr/system/files/SABA2016SA0288.pdf>. (accessed 2.28.22).
- Ashley, F.H., Waterman-Pearson, A.E., Whay, H.R., 2005. Behavioural assessment of pain in horses and donkeys: application to clinical practice and future studies. *Equine Vet. J.* 37, 565–575. <https://doi.org/10.2746/042516405775314826>
- Ask, K., Rhodin, M., Tamminen, L.-M., Hernlund, E., Haubro Andersen, P., 2020. Identification of Body Behaviors and Facial Expressions Associated with Induced Orthopedic Pain in Four Equine Pain Scales. *Animals* 10, 2155. <https://doi.org/10.3390/ani10112155>
- Banting, A., Banting, S., Heinonen, K., Mustonen, K., 2008. Efficacy of oral and parenteral ketoprofen in lactating cows with endotoxin-induced acute mastitis. *Vet. Rec.* 163, 506–509. <https://doi.org/10.1136/vr.163.17.506>
- Bates, D., Mächler, M., Bolker, B., Walker, S., 2015. Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. *J. Stat. Softw.* 67, 1–48. [https://doi.org/DOI 10.18637/jss.v067.i01](https://doi.org/DOI%2010.18637/jss.v067.i01)
- Becker, J., Doherr, M.G., Bruckmaier, R.M., Bodmer, M., Zanolari, P., Steiner, A., 2012. Acute and chronic pain in calves after different methods of rubber-ring castration. *Vet. J.* 194, 380–385. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2012.04.022>
- Chartier, L.C., Hebart, M.L., Howarth, G.S., Whittaker, A.L., Mashtoub, S., 2020. Affective state determination in a mouse model of colitis-associated colorectal cancer. *PLOS ONE* 15, e0228413. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0228413>
- Collins, L.M., Elwood, R.W., 2014. L'expression de la douleur est liée à la personnalité chez les chevaux. *Sci. Appliquée Comport. Anim.* 38–43. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2013.12.007>
- Dalla Costa, E., Minero, M., Lebelt, D., Stucke, D., Canali, E., Leach, M.C., 2014. Development of the Horse Grimace Scale (HGS) as a Pain Assessment Tool in Horses Undergoing Routine Castration. *PLoS ONE* 9, e92281. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092281>
- Dalla Costa, E., Stucke, D., Dai, F., Minero, M., Leach, M., Lebelt, D., 2016. Using the Horse Grimace Scale (HGS) to Assess Pain Associated with Acute Laminitis in Horses (*Equus caballus*). *Animals* 6, 47. <https://doi.org/10.3390/ani6080047>
- David, C., 2020. Expressions faciales chez les mammifères domestiques courants lors d'émotions négatives : application à l'étude des expressions faciales chez la vache laitière en douleur (Thèse de doctorat vétérinaire.). Lyon : Université Claude Bernard Lyon I.
- De Boyer Des Roches, A., Faure, M., Guatteo, R., Junot, S., Mounier, L., Durand, D., Boissy, A., Veissier, I., 2014. Douleur des animaux de rente : mécanismes et signes cliniques. *Point Veterinaire* 343, 54–59.
- De Boyer des Roches, A., Faure, M., Lussert, A., Herry, V., Rainard, P., Durand, D., Foucras, G., 2017. Behavioral and patho-physiological response as possible signs of pain in dairy cows during *Escherichia coli* mastitis: A pilot study. *J. Dairy Sci.* 100, 8385–8397. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12796>
- De Boyer des Roches, A., Prunier, A., Cognie, J., 2016. Douleur : Définitions, mécanismes, sources, évaluation, soulagement, in: Formation "Ecole Technique Ethologie et Bien-Être En Expérimentation Animale." INRAE.

- De Oliveira, F.A., Luna, S.P.L., do Amaral, J.B., Rodrigues, K.A., Sant'Anna, A.C., Daolio, M., Brondani, J.T., 2014. Validation of the UNESP-Botucatu unidimensional composite pain scale for assessing postoperative pain in cattle. *BMC Vet. Res.* 10, 200. <https://doi.org/10.1186/s12917-014-0200-0>
- Descovich, K.A., Wathan, J., Leach, M.C., Buchanan-Smith, H.M., Flecknell, P., Farningham, D., Vick, S.-J., 2017. Facial expression: An under-utilised tool for the assessment of welfare in mammals. *ALTEX* 34, 409–429. <https://doi.org/10.14573/altex.1607161>
- Devant, M., Marti, S., Bach, A., 2012. Effects of castration on eating pattern and physical activity of Holstein bulls fed high-concentrate rations under commercial conditions. *J. Anim. Sci.* 90, 4505–4513. <https://doi.org/10.2527/jas.2011-4929>
- Diego, R., Douet, C., Reigner, F., Blard, T., Cognié, J., Deleuze, S., Goudet, G., 2016. Influence of transvaginal ultrasound-guided follicular punctures in the mare on heart rate, respiratory rate, facial expression changes, and salivary cortisol as pain scoring. *Theriogenology* 86, 1757–1763. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.05.040>
- Durand, D., Faure, M., de la Foye, A., de Boyer des Roches, A., 2019a. Benefits of a multimodal analgesia compared to local anesthesia alone to alleviate pain following castration in sheep: a multiparametric approach. *Animal* 13, 2034–2043. <https://doi.org/10.1017/S1751731119000314>
- Durand, D., Faure, M., Lamberton, P., Lemosquet, S., de Boyer des Roches, A., 2021. A multiparametric approach to assessing residual pain experienced by dairy cows undergoing digestive tract surgery under multimodal analgesia. *Animal* 15, 100338. <https://doi.org/10.1016/j.animal.2021.100338>
- Dyson, S., Berger, J.M., Ellis, A.D., Mullard, J., 2017. Can the presence of musculoskeletal pain be determined from the facial expressions of ridden horses (FEReq)? *J. Vet. Behav.* 19, 78–89. <https://doi.org/10.1016/j.jveb.2017.03.005>
- Eicher, S.D., Morrow-Tesch, J.L., Albright, J.L., Dailey, J.W., Young, C.R., Stanker, L.H., 2000. Tail-Docking Influences on Behavioral, Immunological, and Endocrine Responses in Dairy Heifers. *J. Dairy Sci.* 83, 1456–1462. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(00\)75017-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(00)75017-X)
- Evangelista, M.C., Watanabe, R., Leung, V.S.Y., Monteiro, B.P., O'Toole, E., Pang, D.S.J., Steagall, P.V., 2019. Facial expressions of pain in cats: the development and validation of a Feline Grimace Scale. *Sci. Rep.* 9, 19128. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55693-8>
- Farm Animal Welfare Council, 2012. What is animal welfare ? [WWW Document]. *Farm Anim. Welf. Educ. Cent. En Ligne*. URL [https://www.fawec.org/media/com\\_lazypdf/pdf/fs1-en.pdf](https://www.fawec.org/media/com_lazypdf/pdf/fs1-en.pdf). (accessed 2.28.22).
- Faure, M., Paulmier, V., Boissy, A., de La Foye, A., de Boyer des Roches, A., Durand, D., 2017. A multiparametric approach to discriminate the impacts of different degrees of invasiveness of surgical procedures in sheep 10.
- Faure, M., Paulmier, V., Cognie, J., Courteix, C., Durand, D., 2015. Douleurs animales. 2. Evaluation et traitement de la douleur chez les ruminants. *INRAE Prod. Anim.* 28, 13. <https://doi.org/10.20870/productions-animales.2015.28.3.3028>
- Fitzpatrick, C.E., Chapinal, N., Petersson-Wolfe, C.S., Devries, T.J., Kelton, D.F., Duffield, T.F., Leslie, K.E., 2013. The effect of meloxicam on pain sensitivity, rumination time, and clinical signs in dairy cows with endotoxin-induced clinical mastitis. *J. Dairy Sci.* 96, 2847–2856. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5855>
- George, R.P., Howarth, G.S., Whittaker, A.L., 2019. Use of the Rat Grimace Scale to Evaluate Visceral Pain in a Model of Chemotherapy-Induced Mucositis. *Animals* 9, 678. <https://doi.org/10.3390/ani9090678>
- Ginger, L., Ledoux, D., Bouchon, M., Rautenbach, I., Bagnard, C., Lurier, T., Foucras, G., Germon, P., Durand, D., de Boyer des Roches, A., soumis. Using behavioral observations in freestalls and at milking to refine pain detection in dairy cows after lipopolysaccharide-induced clinical mastitis. *J. Dairy Sci.*

- Gleerup, K.B., Andersen, P.H., Munksgaard, L., Forkman, B., 2015a. Pain evaluation in dairy cattle. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 171, 25–32. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2015.08.023>
- Gleerup, K.B., Forkman, B., Lindegaard, C., Andersen, P.H., 2015b. An equine pain face. *Vet. Anaesth. Analg.* 42, 103–114. <https://doi.org/10.1111/vaa.12212>
- Guesgen, M.J., Beausoleil, N.J., Leach, M., Minot, E.O., Stewart, M., Stafford, K.J., 2016. Coding and quantification of a facial expression for pain in lambs. *Behav. Processes* 132, 49–56. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2016.09.010>
- Häger, C., Biernot, S., Buettner, M., Glage, S., Keubler, L.M., Held, N., Bleich, E.M., Otto, K., Müller, C.W., Decker, S., Talbot, S.R., Bleich, A., 2017. The Sheep Grimace Scale as an indicator of post-operative distress and pain in laboratory sheep. *PLOS ONE* 12, e0175839. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175839>
- Harley, J.M., n.d. Measuring Emotions: A Survey of Cutting-Edge Methodologies Used in Computer-Based Learning Environment Research. *Emotions* 41.
- Hay, M., Vulin, A., Génin, S., Sales, P., Prunier, A., 2003. Assessment of pain induced by castration in piglets: Behavioral and physiological responses over the subsequent 5 days. *Appl. Anim. Behav. Sci. - APPL ANIM BEHAV SCI* 82, 201–218. [https://doi.org/10.1016/S0168-1591\(03\)00059-5](https://doi.org/10.1016/S0168-1591(03)00059-5)
- Heinsinger, N.M., Spagnuolo, G., Allahyari, R.V., Galer, S., Fox, T., Jaffe, D.A., Thomas, S.J., Iacovitti, L., Lepore, A.C., 2020. Facial grimace testing as an assay of neuropathic pain-related behavior in a mouse model of cervical spinal cord injury. *Exp. Neurol.* 334, 113468. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2020.113468>
- Holden, E., Calvo, G., Collins, M., Bell, A., Reid, J., Scott, E.M., Nolan, A.M., 2014. Evaluation of facial expression in acute pain in cats. *J. Small Anim. Pract.* 55, 615–621. <https://doi.org/10.1111/jsap.12283>
- International Association For Study Of Pain, 2020. IASP Announces Revised Definition of Pain. *iasp-pain.org En Ligne*. URL <https://www.iasp-pain.org/publications/iasp-news/iasp-announces-revised-definition-of-pain/> (accessed 4.28.22).
- Lambert, H., Carder, G., 2018. Positive and negative emotions in dairy cows: Can ear postures be used as a measure? *Behav. Process.* 158. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2018.12.007>
- Langford, D.J., Bailey, A.L., Chanda, M.L., Clarke, S.E., Drummond, T.E., Echols, S., Glick, S., Ingrao, J., Klassen-Ross, T., Lacroix-Fralish, M.L., Matsumiya, L., Sorge, R.E., Sotocinal, S.G., Tabaka, J.M., Wong, D., van den Maagdenberg, A.M.J.M., Ferrari, M.D., Craig, K.D., Mogil, J.S., 2010. Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse. *Nat. Methods* 7, 447–449. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1455>
- Lay, D.C., Friend, T.H., Grissom, K.K., Bowers, C.L., Mal, M.E., 1992. Effects of freeze or hot-iron branding of angus calves on some physiological and behavioral indicators of stress. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 33, 137–147. [https://doi.org/10.1016/S0168-1591\(05\)80003-6](https://doi.org/10.1016/S0168-1591(05)80003-6)
- Leach, M.C., Klaus, K., Miller, A.L., Perrotolo, M.S. di, Sotocinal, S.G., Flecknell, P.A., 2012. The Assessment of Post-Vasectomy Pain in Mice Using Behaviour and the Mouse Grimace Scale. *PLOS ONE* 7, e35656. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035656>
- Ledoux, D., Veissier, I., Meunier, B., Gelin, V., Richard, C., Kiefer, H., Jammes, H., Foucras, G., de Boyer des Roches, A., soumis. Sickness and Pain Detection in cows under systemic inflammatory condition: accelerometers as Sensor-based system and direct observations gave complementary information. *Sci. Rep.*
- Lesueur, J., Walachowski, S., Barbey, S., Cebon, N., Lefebvre, R., Launay, F., Boichard, D., Germon, P., Corbiere, F., Foucras, G., 2022. Standardized Whole Blood Assay and Bead-Based Cytokine Profiling Reveal Commonalities and Diversity of the Response to Bacteria and TLR Ligands in Cattle. *Front. Immunol.* 13, 871780. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.871780>



- Leung, V.S.Y., Benoit-Biancamano, M.-O., Pang, D.S.J., 2019. Performance of behavioral assays: the Rat Grimace Scale, burrowing activity and a composite behavior score to identify visceral pain in an acute and chronic colitis model. *Pain Rep.* 4. <https://doi.org/10.1097/PR9.0000000000000712>
- Levionnois, O., Neindre, P., Guatteo, R., Guémené, D., Guichet, J.-L., Latouche, K., Leterrier, C., Mormède, P., Prunier, A., Serrie, A., Servièrre, J., 2009. Douleurs animales - Les identifier, les comprendre, les limiter chez les animaux d'élevage.
- Marcantonio Coneglian, M., Duarte Borges, T., Weber, S.H., Godoi Bertagnon, H., Michelotto, P.V., 2020. Use of the horse grimace scale to identify and quantify pain due to dental disorders in horses. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 225, 104970. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2020.104970>
- Marx, G., Horn, T., Thielebein, J., Knubel, B., von Borell, E., 2003. Analysis of pain-related vocalization in young pigs. *J. Sound Vib., First International ISMA Workshop on Noise and Vibration in Agricultural and Biological Engineering* 266, 687–698. [https://doi.org/10.1016/S0022-460X\(03\)00594-7](https://doi.org/10.1016/S0022-460X(03)00594-7)
- McCarthy, R.N., Jeffcott, L.B., Clarke, I.J., 1993. Preliminary studies on the use of plasma  $\beta$ -endorphin in horses as an indicator of stress and pain. *J. Equine Vet. Sci.* 13, 216–219. [https://doi.org/10.1016/S0737-0806\(06\)81015-4](https://doi.org/10.1016/S0737-0806(06)81015-4)
- McLennan, K., 2018. Why Pain Is Still a Welfare Issue for Farm Animals, and How Facial Expression Could Be the Answer. *Agriculture* 8, 127. <https://doi.org/10.3390/agriculture8080127>
- McLennan, K.M., Rebelo, C.J.B., Corke, M.J., Holmes, M.A., Leach, M.C., Constantino-Casas, F., 2016. Development of a facial expression scale using footrot and mastitis as models of pain in sheep. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 176, 19–26. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2016.01.007>
- Miller, A., Leach, M., 2015. Using the mouse grimace scale to assess pain associated with routine ear notching and the effect of analgesia in laboratory mice. *Lab. Anim.* 49, 117–120. <https://doi.org/10.1177/0023677214559084>
- Miller, A.L., Kitson, G.L., Skalkoyannis, B., Flecknell, P.A., Leach, M.C., 2016. Using the mouse grimace scale and behaviour to assess pain in CBA mice following vasectomy. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 181, 160–165. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2016.05.020>
- Mintline, E.M., Stewart, M., Rogers, A., Cox, N., Verkerk, G., Stookey, J., Webster, J., Tucker, C., 2013. Play behavior as an indicator of animal welfare: Disbudding in dairy calves. <https://doi.org/10.1016/J.APPLANIM.2012.12.008>
- Mittal, A., Gupta, M., Lamarre, Y., Jahagirdar, B., Gupta, K., 2016. Quantification of pain in sickle mice using facial expressions and body measurements. *Blood Cells. Mol. Dis.* 57, 58–66. <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2015.12.006>
- Molony, V., Kent, J.E., McKendrick, I.J., 2002. Validation of a method for assessment of an acute pain in lambs. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 76, 215–238. [https://doi.org/10.1016/S0168-1591\(02\)00014-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1591(02)00014-X)
- Morisse, J.P., Cotte, J.P., Huonnic, D., 1995. Effect of dehorning on behaviour and plasma cortisol responses in young calves. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 43, 239–247. [https://doi.org/10.1016/0168-1591\(95\)00569-E](https://doi.org/10.1016/0168-1591(95)00569-E)
- Müller, B.R., Soriano, V.S., Bellio, J.C.B., Molento, C.F.M., 2019. Facial expression of pain in Nellore and crossbred beef cattle. *J. Vet. Behav.* 34, 60–65. <https://doi.org/10.1016/j.jvbeh.2019.07.007>
- Nagakura, Y., Miwa, M., Yoshida, M., Miura, R., Tanei, S., Tsuji, M., Takeda, H., 2019. Spontaneous pain-associated facial expression and efficacy of clinically used drugs in the reserpine-induced rat model of fibromyalgia. *Eur. J. Pharmacol.* 864, 172716. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.172716>
- Noonan, G.J., Rand, J.S., Priest, J., Ainscow, J., Blackshaw, J.K., 1994. Behavioural observations of piglets undergoing tail docking, teeth clipping and ear notching. *Appl. Anim. Behav. Sci., Advances in Pig Behaviour Science* 39, 203–213. [https://doi.org/10.1016/0168-1591\(94\)90156-2](https://doi.org/10.1016/0168-1591(94)90156-2)
- Ohayon, M.M., 2005. Relationship between chronic painful physical condition and insomnia. *J. Psychiatr. Res.* 39, 151–159. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2004.07.001>

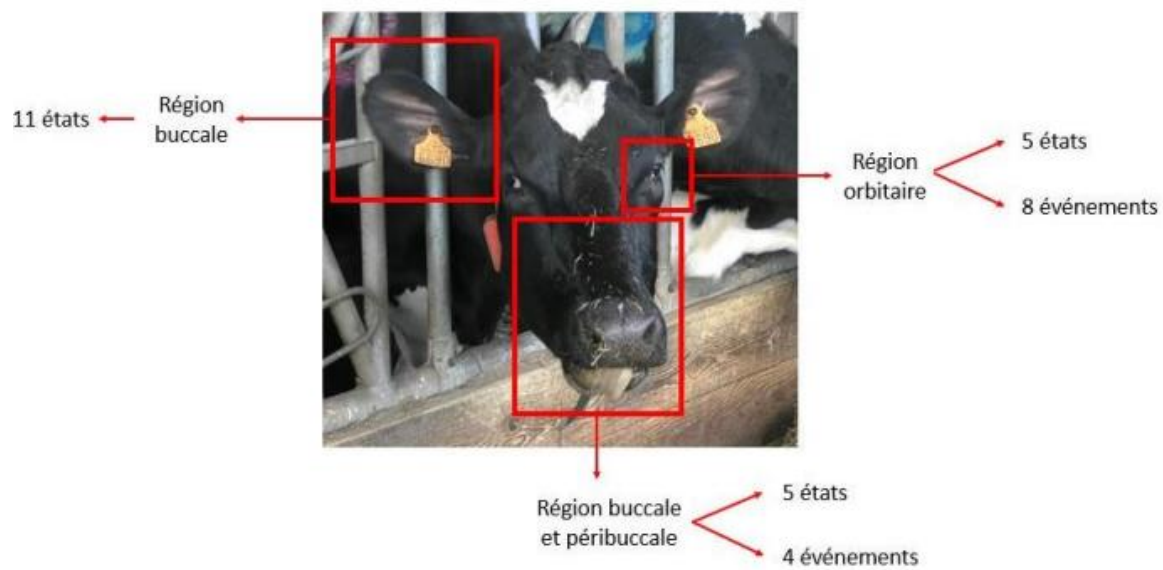


- Prunier, A., Bonneau, M., Borell, E., Cinotti, S., Gunn, M., Fredriksen, B., Giersing, M., Morton, D., Tuytens, F., Velarde, A., 2006. A review of the welfare consequences of surgical castration in piglets and the evaluation of non-surgical methods. *Anim. Welf.* 15.
- Prunier, A., Mounier, A.M., Hay, M., 2005. Effects of castration, tooth resection, or tail docking on plasma metabolites and stress hormones in young pigs. *J. Anim. Sci.* 83, 216–22. <https://doi.org/10.2527/2005.831216x>
- Prunier, A., Mounier, L., Le Neindre, P., Leterrier, C., Mormède, P., Paulmier, V., Prunet, P., Terlouw, C., Guatteo, R., 2013. Identifying and monitoring pain in farm animals: a review. *Animal* 7. <https://doi.org/10.1017/S1751731112002406>
- Rautenbach, I., 2019. Utilisation de la brosse détectée par un outil de localisation chez la vache laitière présentant une inflammation intra-mammaire (Thèse de doctorat vétérinaire.). Lyon : Université Claude Bernard Lyon I.
- Remnant, J.G., Tremlett, A., Huxley, J.N., Hudson, C.D., 2017. Clinician attitudes to pain and use of analgesia in cattle: where are we 10 years on? *Vet. Rec.* 181, 400–400. <https://doi.org/10.1136/vr.104428>
- Rialland, P., Aubry, P., Gauvin, D., 2008. Evaluation de la douleur et efficacité des analgésiques chez les bovins : données actuelles et bilan de la littérature. *Bull. GTV* 19–24.
- Roger, O., 2008. Enquête sur les attitudes des éleveurs de bovins vis-à-vis de la détection et de la prise en charge de la douleur (Thèse de doctorat vétérinaire.). Faculté de médecine de Nantes.
- Schwartzkopf-Genswein, K., Stookey, J., Welford, R., 1997. Behavior of Cattle during Hot-Iron and Freeze Branding and the Effects on Subsequent Handling Ease. *J. Anim. Sci.* 75, 2064–72. <https://doi.org/10.2527/1997.7582064x>
- Siivonen, J., Taponen, S., Hovinen, M., Pastell, M., Lensink, B.J., Pyörälä, S., Hänninen, L., 2011. Impact of acute clinical mastitis on cow behaviour. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 132, 101–106. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2011.04.005>.
- Sneddon, L., Elwood, R., Adamo, S., Leach, M., 2014. Defining and assessing animal pain. *Anim. Behav.* 97, 201–212. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2014.09.007>
- Sotocinal, S.G., Sorge, R.E., Zaloum, A., Tuttle, A.H., Martin, L.J., Wieskopf, J.S., Mapplebeck, J.C.S., Wei, P., Zhan, S., Zhang, S., McDougall, J.J., King, O.D., Mogil, J.S., 2011. The Rat Grimace Scale: a partially automated method for quantifying pain in the laboratory rat via facial expressions. *Mol. Pain* 7, 55. <https://doi.org/10.1186/1744-8069-7-55>
- Steagall, P.V., Bustamante, H., Johnson, C.B., Turner, P.V., 2021. Pain Management in Farm Animals: Focus on Cattle, Sheep and Pigs. *Animals* 11, 1483. <https://doi.org/10.3390/ani11061483>
- Stewart, M., Verkerk, G.A., Stafford, K.J., Schaefer, A.L., Webster, J.R., 2010. Noninvasive assessment of autonomic activity for evaluation of pain in calves, using surgical castration as a model. *J. Dairy Sci.* 93, 3602–3609. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3114>
- Thornton, P.D., Waterman Pearson, A.E., 2002. Behavioural responses to castration in lambs. *Anim. Welf.* 11, 203–212.
- Torrey, S., Devillers, N., Lessard, M., Farmer, C., Widowski, T., 2009. Effect of age on the behavioral and physiological responses of piglets to tail docking and ear notching. *J. Anim. Sci.* 87, 1778–1786. <https://doi.org/10.2527/jas.2008-1354>
- Van Loon, J.P.A.M., Jonckheer-Sheehy, V.S.M., Back, W., René van Weeren, P., Hellebrekers, L.J., 2014. Monitoring equine visceral pain with a composite pain scale score and correlation with survival after emergency gastrointestinal surgery. *Vet. J.* 200, 109–115. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.01.003>
- Van Loon, J.P.A.M., Van Dierendonck, M.C., 2019. Pain assessment in horses after orthopaedic surgery and with orthopaedic trauma. *Vet. J.* 246, 85–91. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2019.02.001>

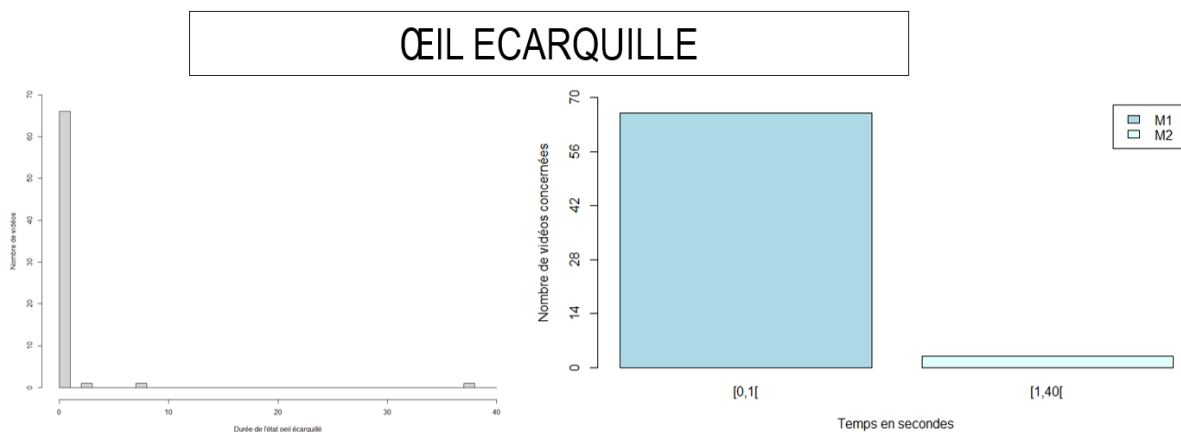
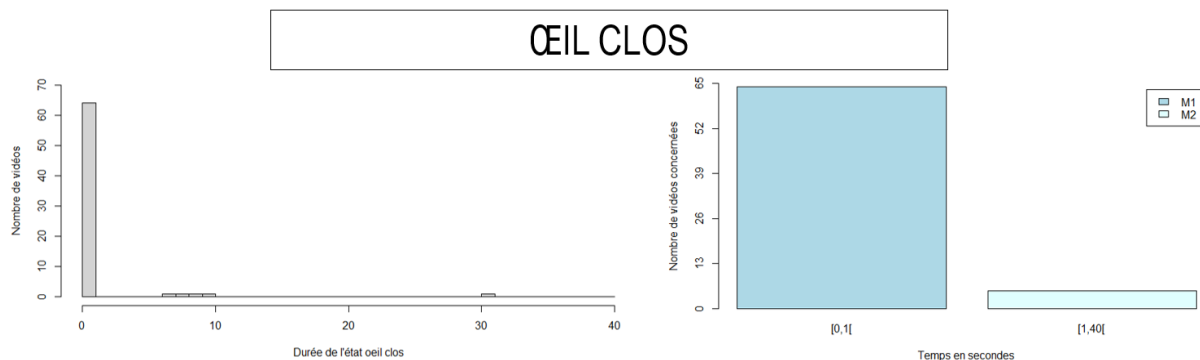
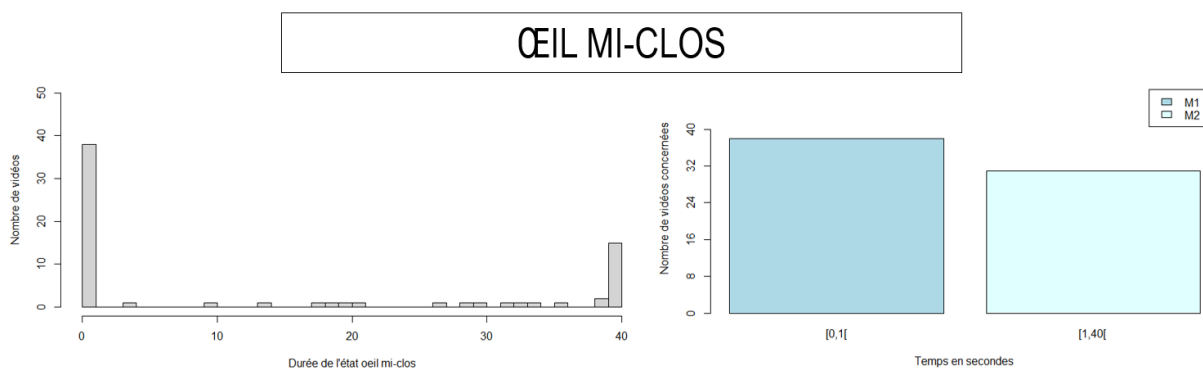
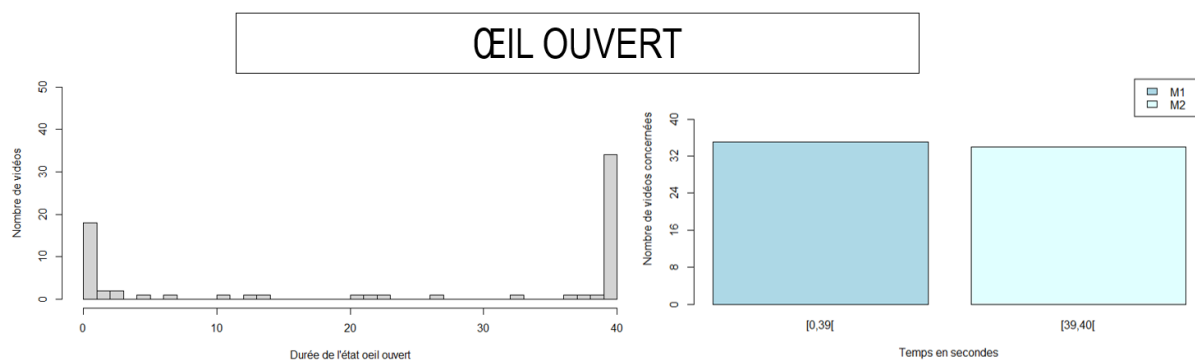
- Van Loon, J.P.A.M., Van Dierendonck, M.C., 2017. Monitoring equine head-related pain with the Equine Utrecht University scale for facial assessment of pain (EQUUS-FAP). *Vet. J.* 220, 88–90. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2017.01.006>
- Watts, J., Stookey, J., 1999. Effects of restraint and branding on rates and acoustic parameters of vocalization in beef cattle. [https://doi.org/10.1016/S0168-1591\(98\)00222-6](https://doi.org/10.1016/S0168-1591(98)00222-6)
- Whay, H.R., Main, D.C.J., Green, L.E., Webster, A.J.F., 2003. Assessment of the welfare of dairy cattle using animal-based measurements: direct observations and investigation of farm records. *Vet. Rec.* 153, 197–202. <https://doi.org/10.1136/vr.153.7.197>
- Yamada, P.H., Codognoto, V.M., de Ruediger, F.R., Trindade, P.H.E., da Silva, K.M., Rizzoto, G., Maestá, S.A., Ferreira, J.C.P., de Soutello, R.V.G., Oba, E., 2021. Pain assessment based on facial expression of bulls during castration. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 236, 105258. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2021.105258>
- Yin, D.B.M., Omar, S., Talip, B.A., Muklas, A., Norain, N.A.M., Othman, A.T., 2017. Fusion of face recognition and facial expression detection for authentication: a proposed model, in: Proceedings of the 11th International Conference on Ubiquitous Information Management and Communication. Presented at the IMCOM '17: The 11th International Conference on Ubiquitous Information Management and Communication, ACM, Beppu Japan, pp. 1–8. <https://doi.org/10.1145/3022227.3022247>
- Zimov, J.L., Botheras, N.A., Weiss, W.P., Hogan, J.S., 2011. Associations among behavioral and acute physiologic responses to lipopolysaccharide-induced clinical mastitis in lactating dairy cows. *Am. J. Vet. Res.* 72, 620–627. <https://doi.org/10.2460/ajvr.72.5.620>

## ANNEXES

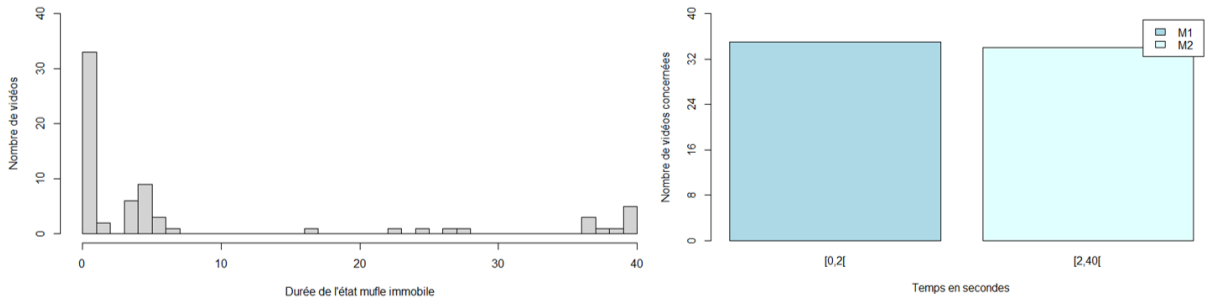
Annexe 1: Les trois zones de la tête présentées dans l'éthogramme. Source : L.Ginger. Photographie : © UMR-Herbivores équipe CARAIBE



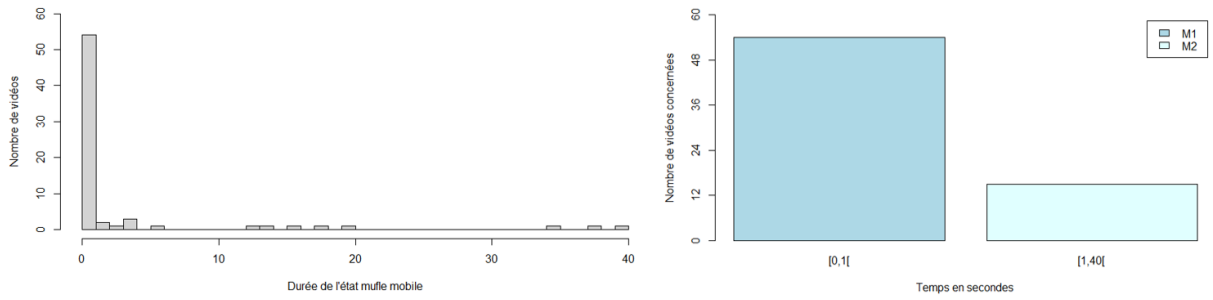
**Annexe 2 : Distribution de la durée des états (en secondes) et de la fréquence des évènements (en nombre) pour l'ensemble des vaches PHY (expérience sur la douleur localisée) et pour l'ensemble des temps avant épreuve**



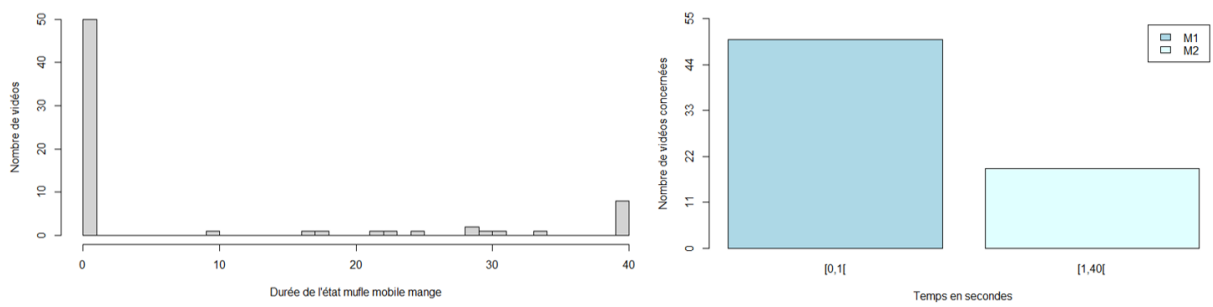
## MUFLE IMMOBILE



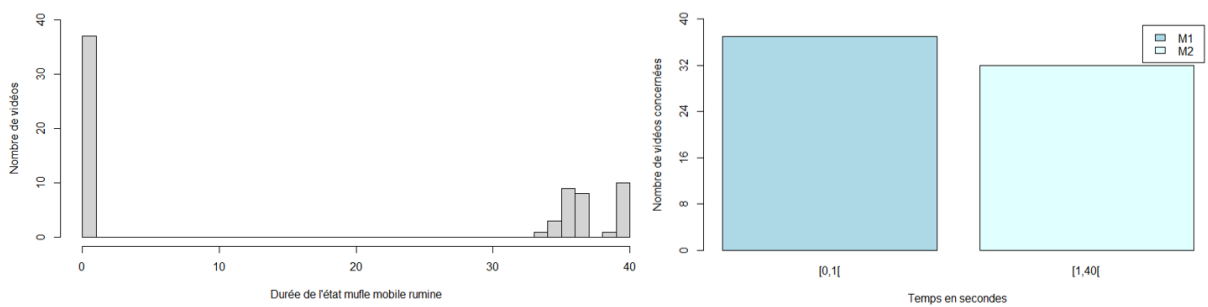
## MUFLE MOBILE



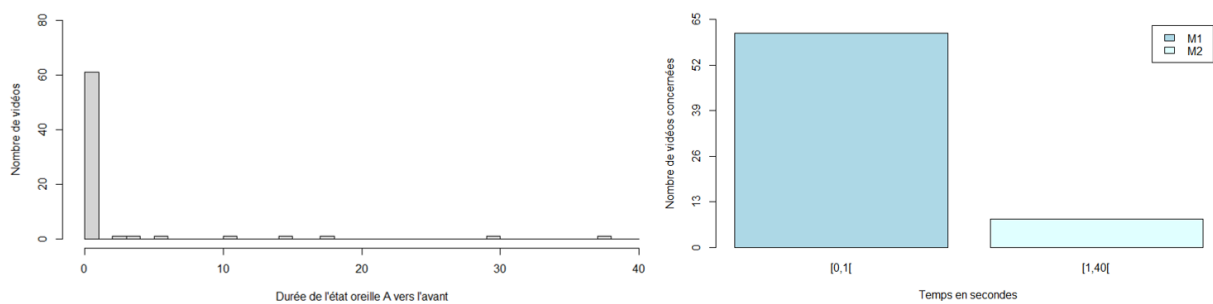
## MUFLE MOBILE MANGE



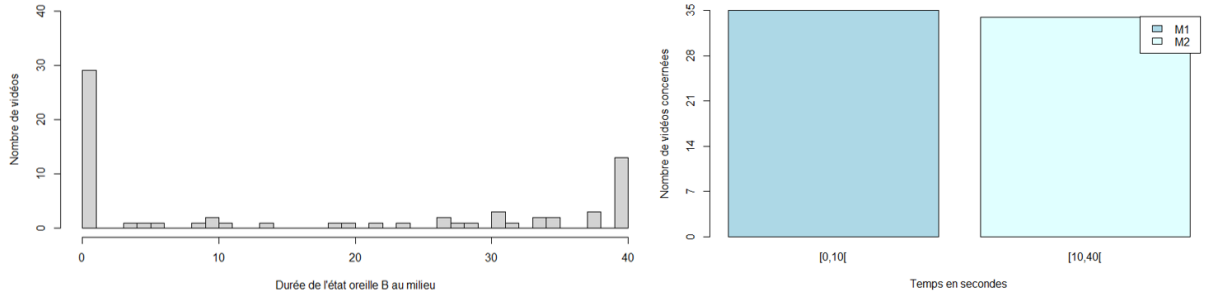
## MUFLE MOBILE RUMINE



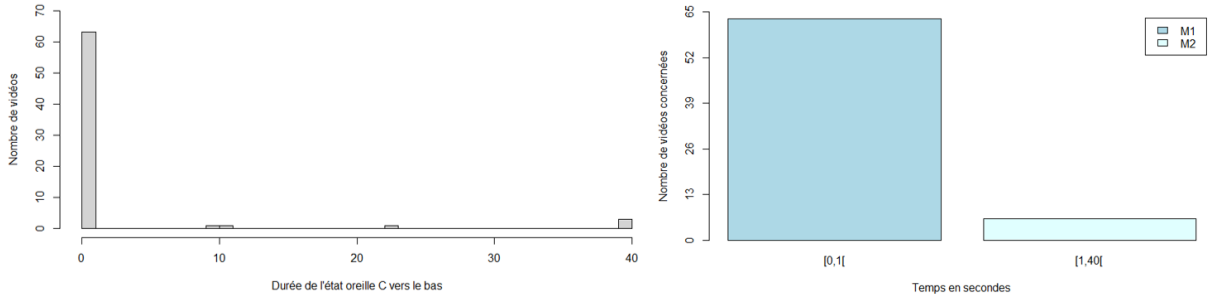
## OREILLE A



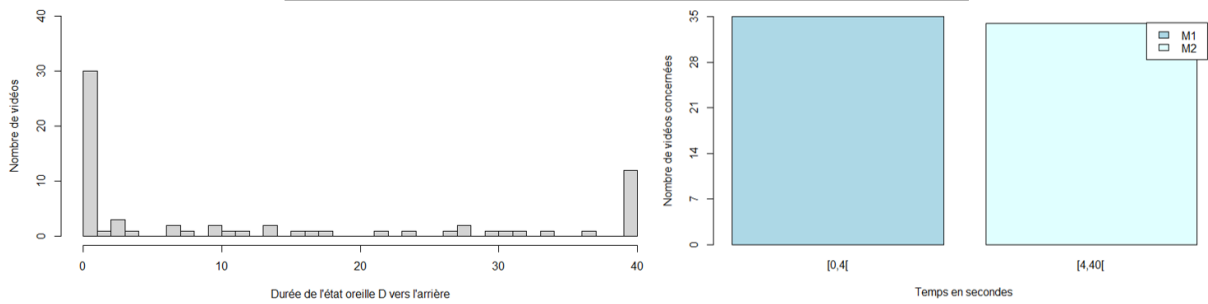
## OREILLE B



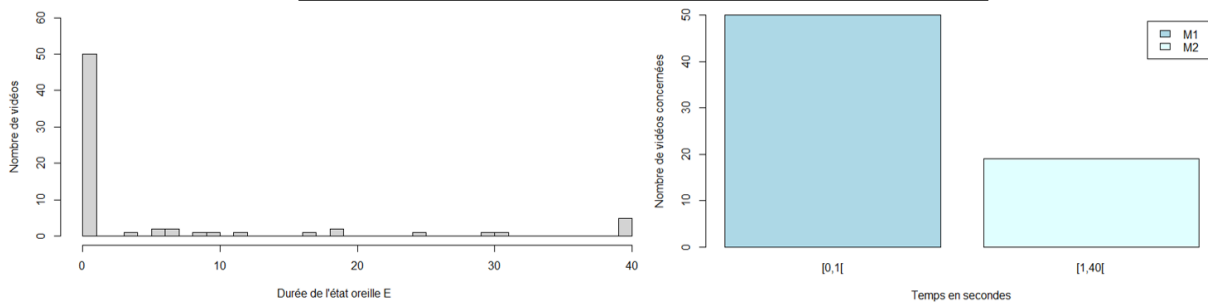
## OREILLE C



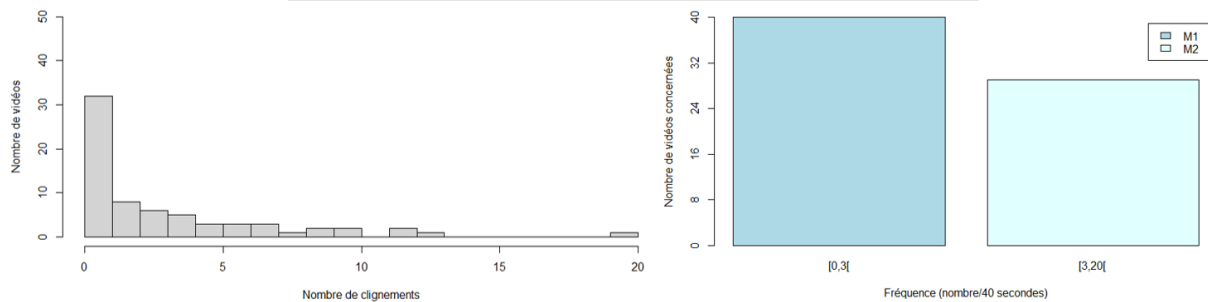
## OREILLE D



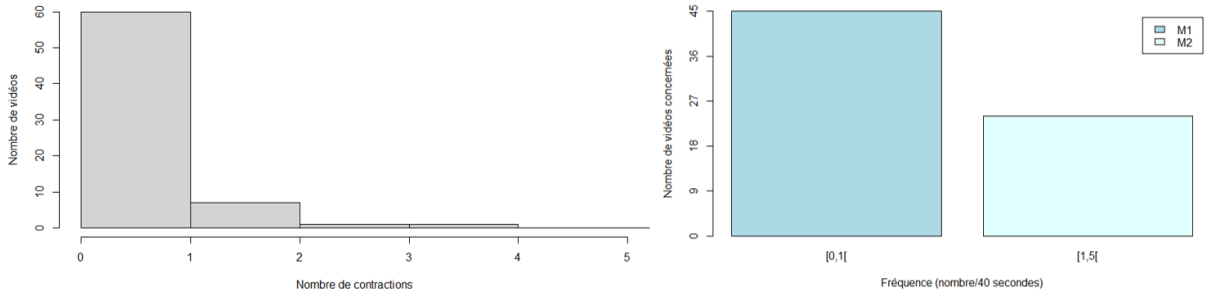
## OREILLE E



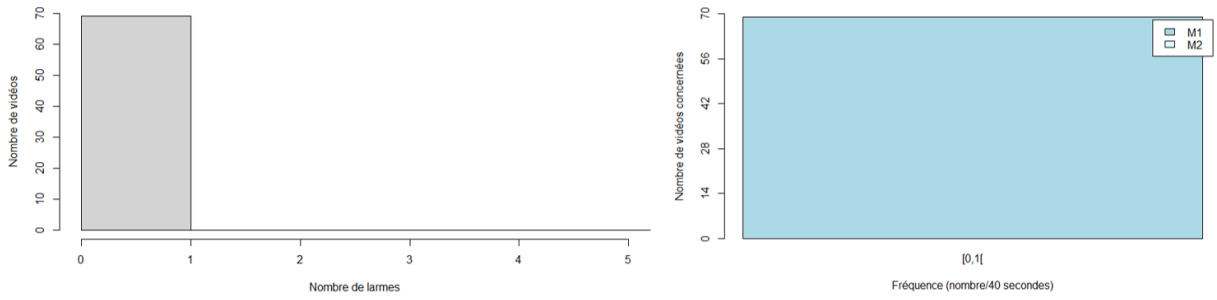
## CLIGNEMENT



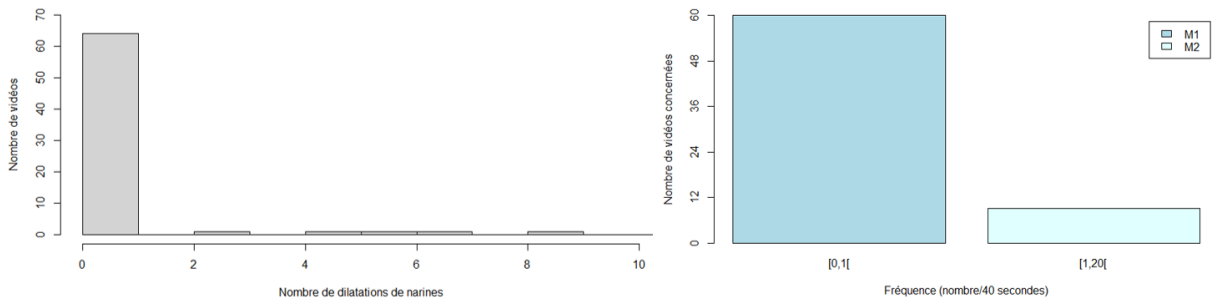
## CONTRACTION



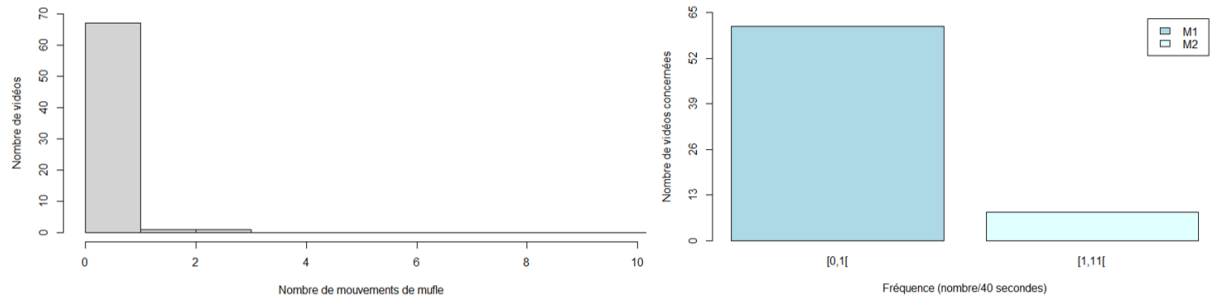
## LARME



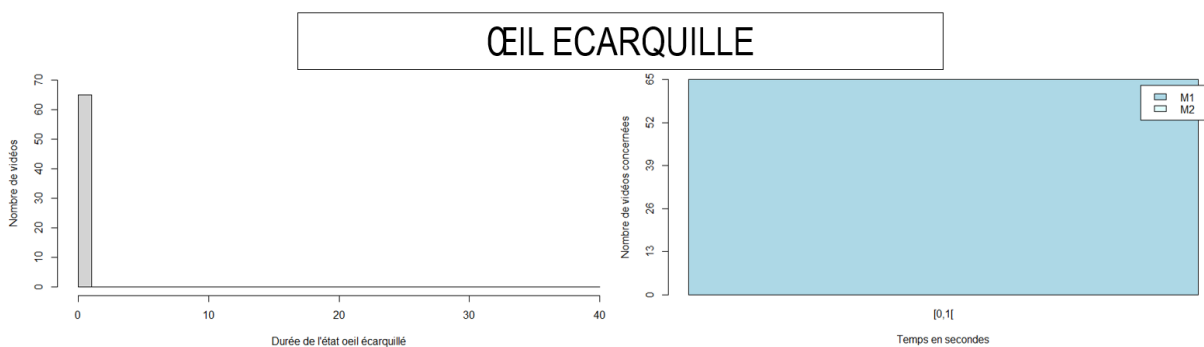
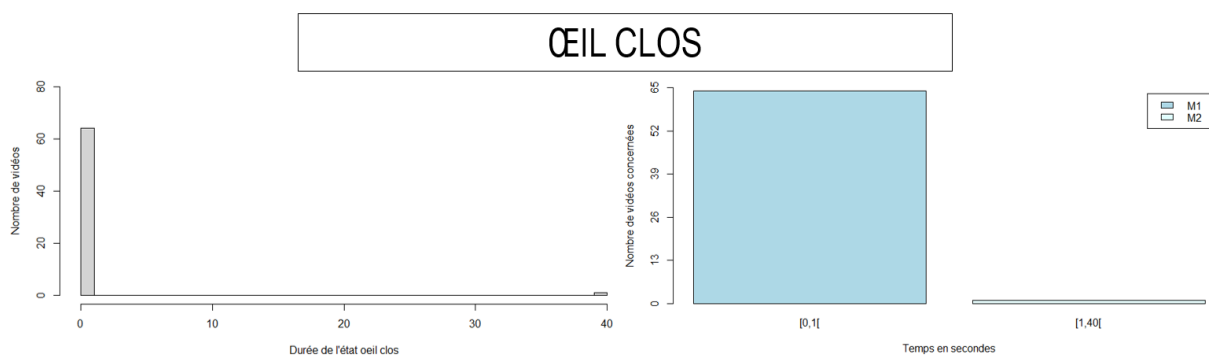
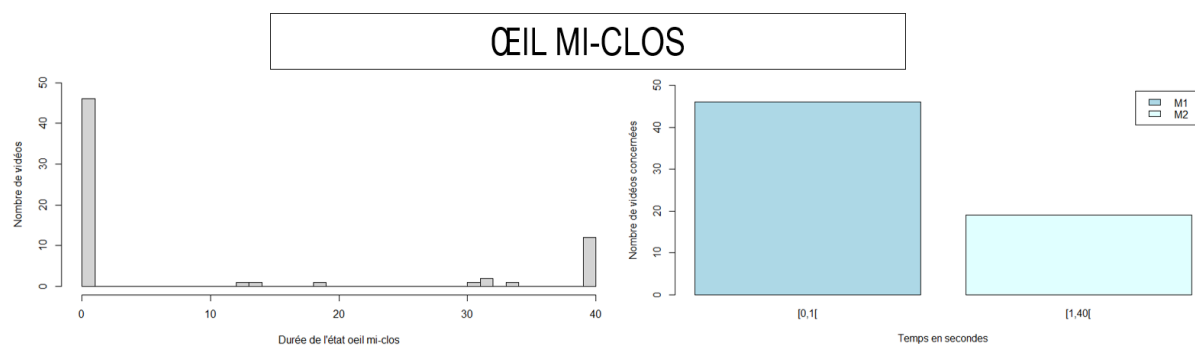
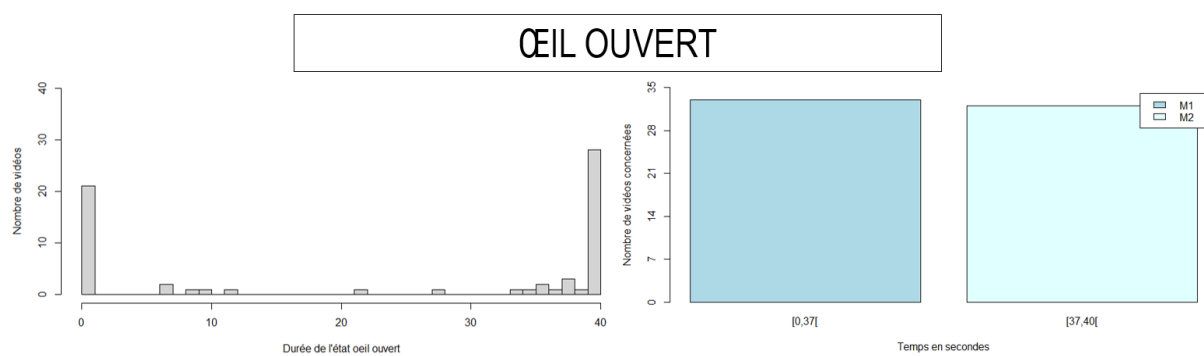
## DILATATION DE NARINES



## MOUVEMENTS DU MUFLE

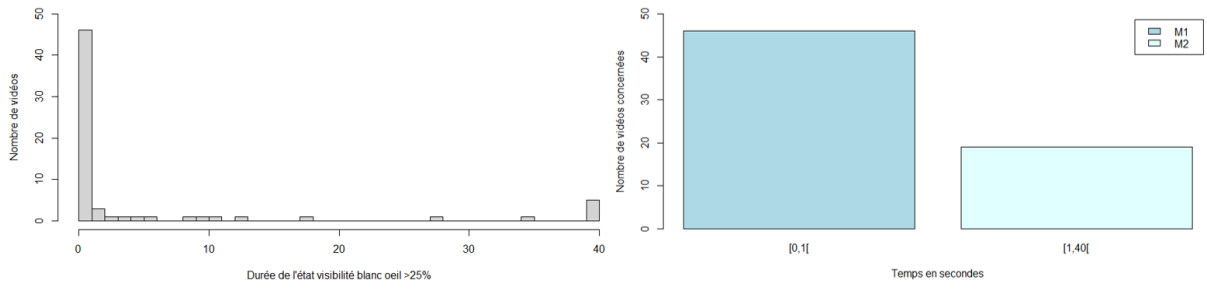


Annexe 3 : Distribution de la durée des états (en secondes) et de la fréquence des évènements (en nombre) pour l'ensemble des vaches (expérience sur la douleur systémique) et pour l'ensemble des temps avant épreuve.

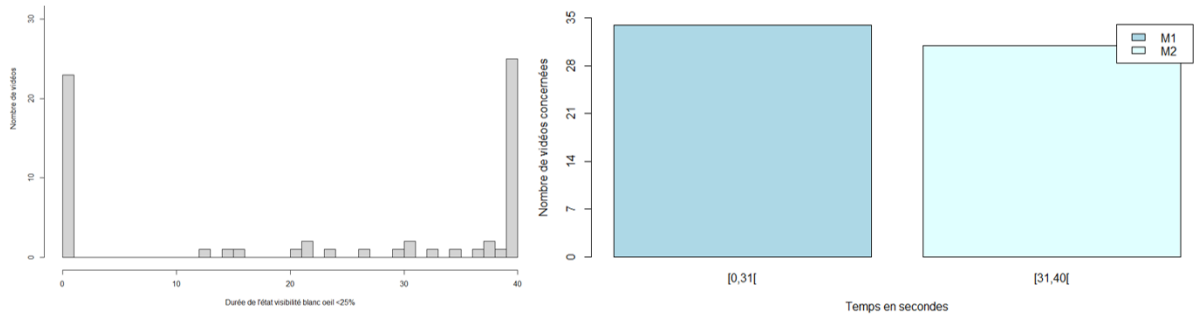




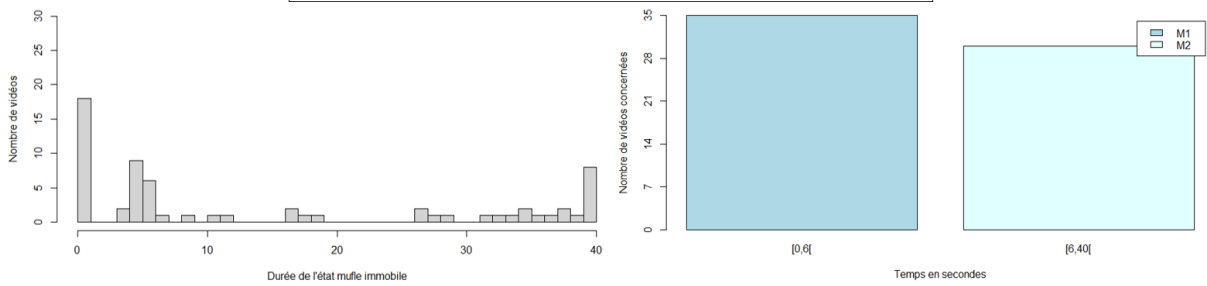
## VISIBILITE BLANC ŒIL $\geq 25\%$



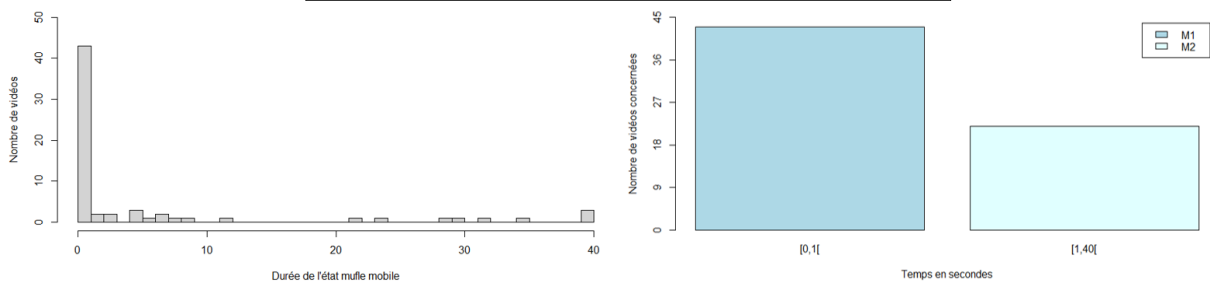
## VISIBILITE BLANC ŒIL $< 25\%$



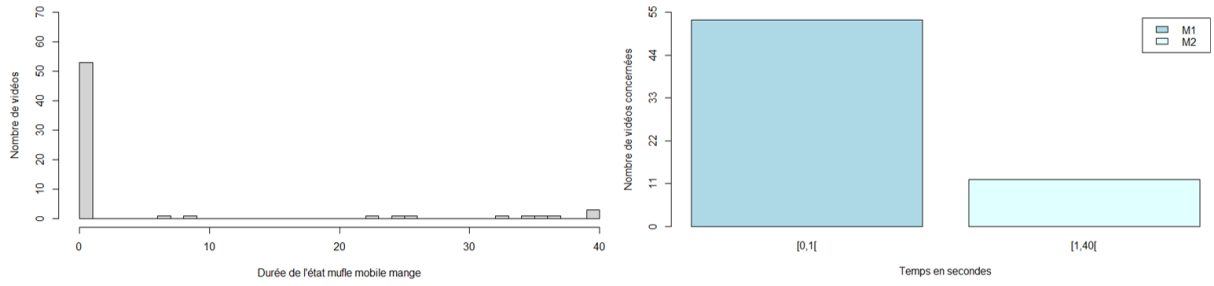
## MUFLE IMMOBILE



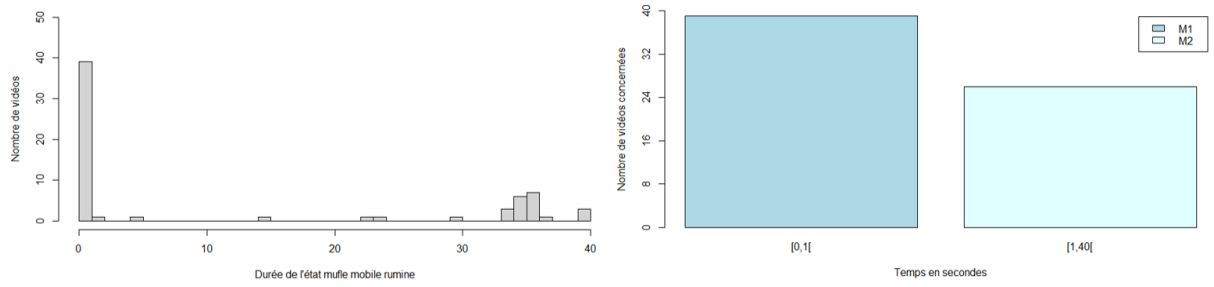
## MUFLE MOBILE



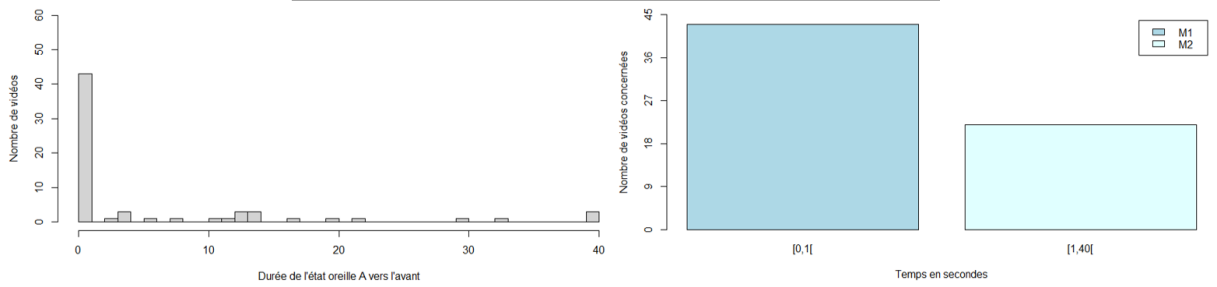
## MUFLE MOBILE MANGE



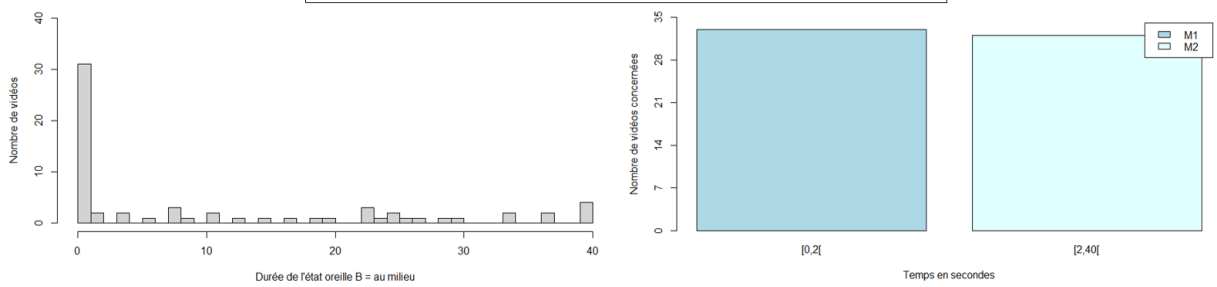
## MUFLE MOBILE RUMINE



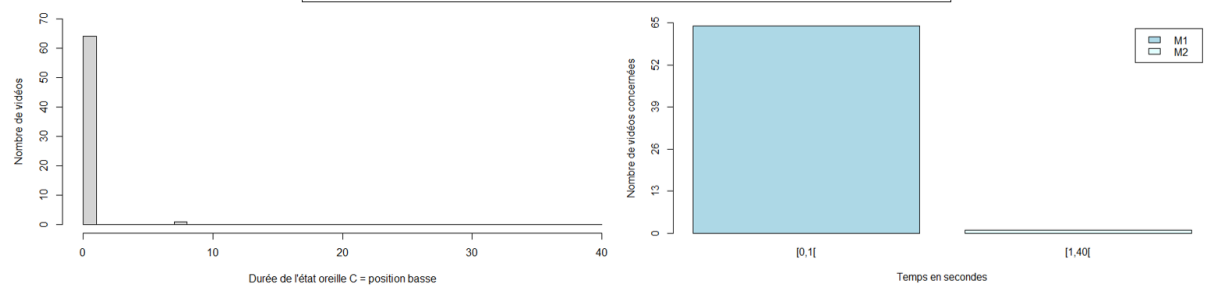
## OREILLE A



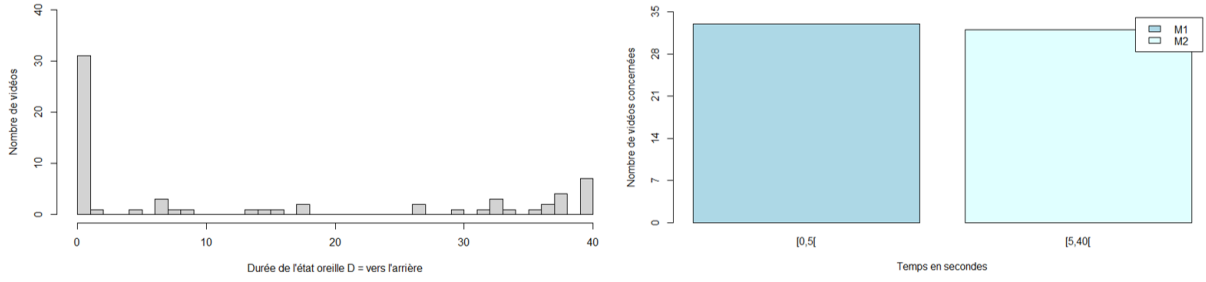
## OREILLE B



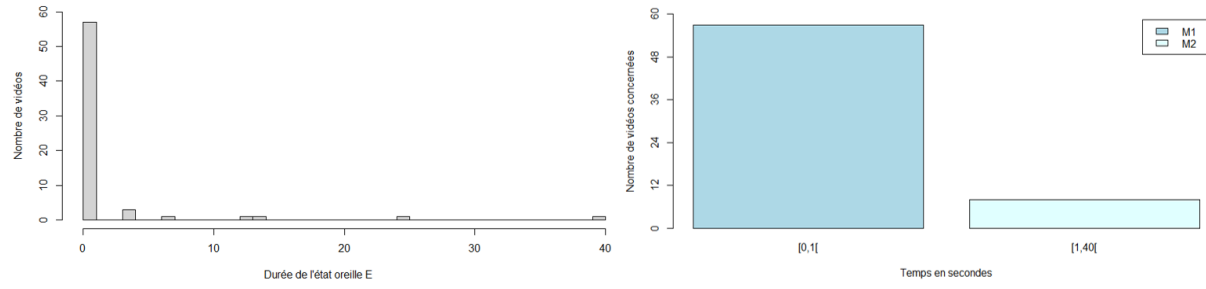
## OREILLE C



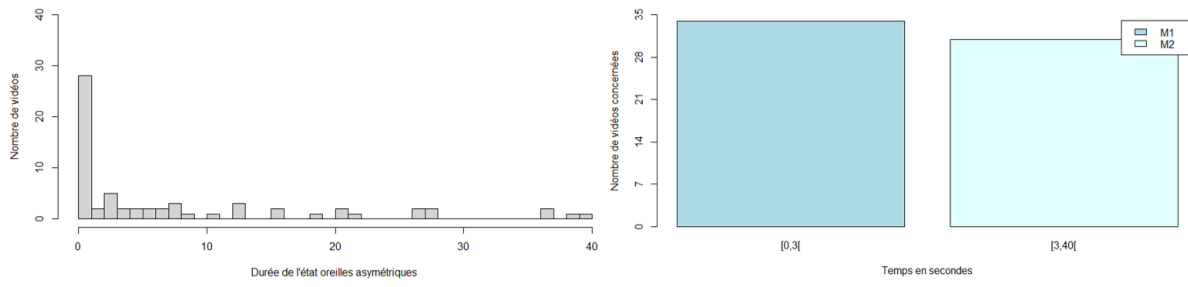
## OREILLE D



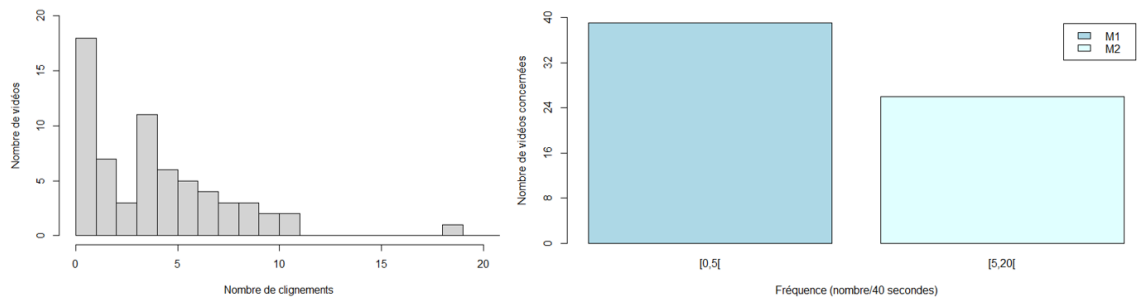
## OREILLE E



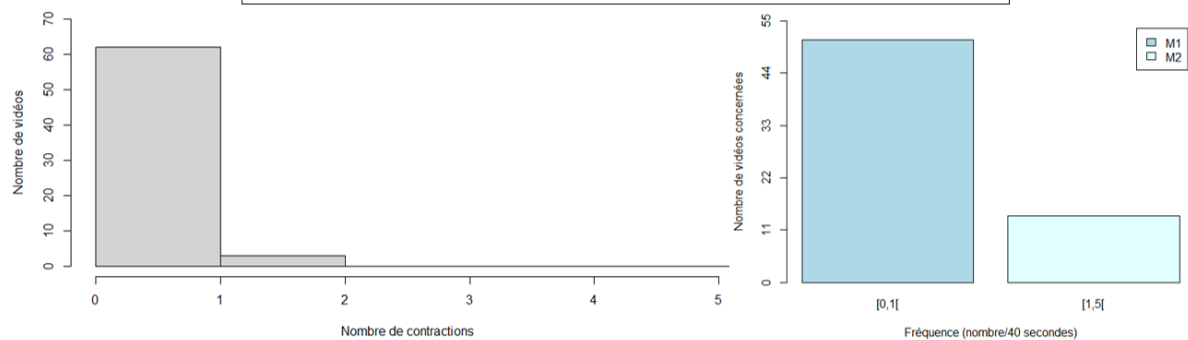
## OREILLES ASYMETRIQUES



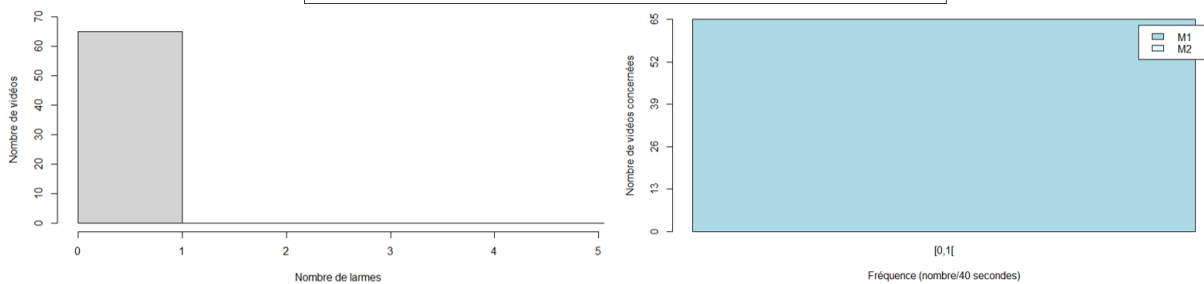
## CLIGNEMENT



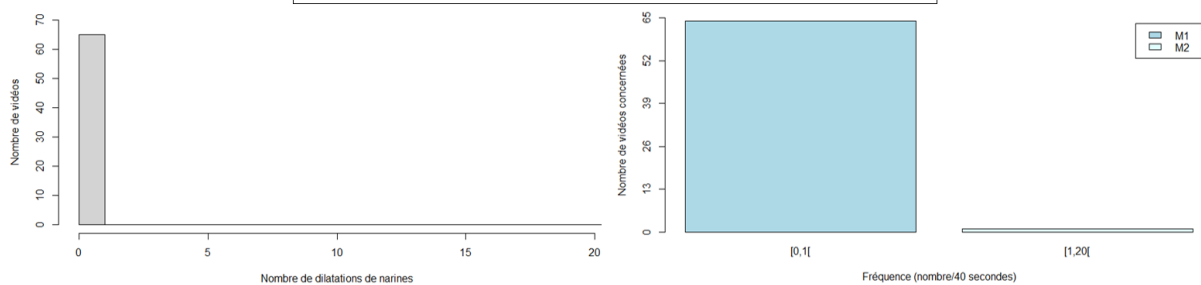
## CONTRACTION



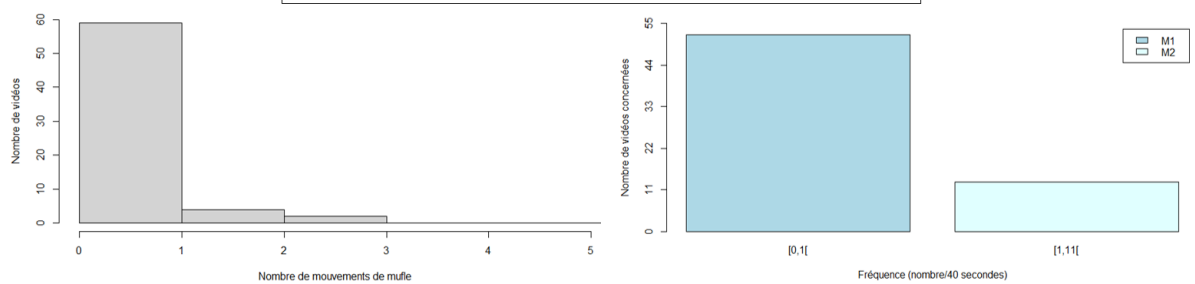
## LARME



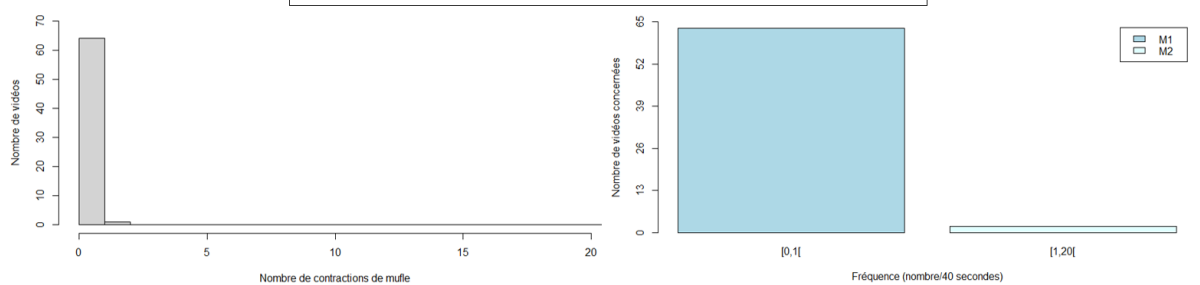
## DILATATION DE NARINES



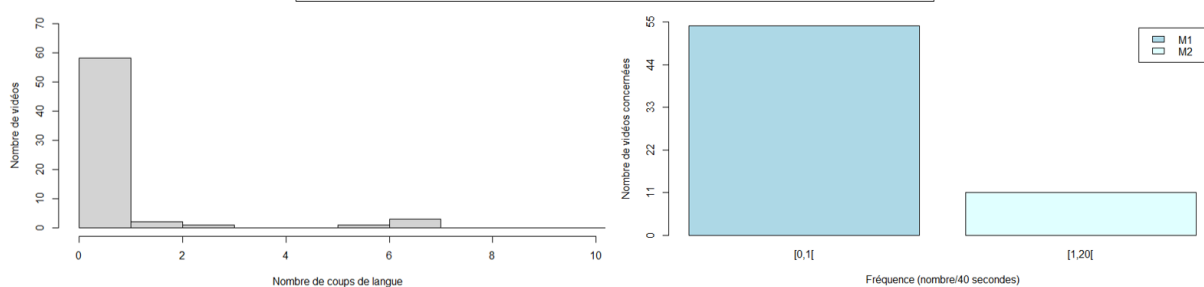
## MOUVEMENTS DE MUFLE



## CONTRACTIONS DU MUFLE



## COUPS DE LANGUE




Annexe 4 : Exemples de grilles utilisées chez : A. Les chevaux (Dalla Costa et al, 2014); B. Les ovins (McLennan et al, 2016) ; C. Les rats (Sotocinal et al, 2011) ; D. Les souris (Langford et al, 2010) ; E. Les bovins (Gleerup et al, 2015 A)

## A.

<p style="text-align: center;"><b>Stiffly backwards ears</b></p>  <p style="text-align: center;"><b>Not present (0)      Moderately present (1)      Obviously present (2)</b></p> <p>The ears are held stiffly and turned backwards. As a result, the space between the ears may appear wider relative to baseline.</p>	<p style="text-align: center;"><b>Orbital tightening</b></p>  <p style="text-align: center;"><b>Not present (0)      Moderately present (1)      Obviously present (2)</b></p> <p>The eyelid is partially or completely closed. Any eyelid closure that reduces the eye size by more than half should be coded as "obviously present" or "2".</p>
<p style="text-align: center;"><b>Tension above the eye area</b></p>  <p style="text-align: center;"><b>Not present (0)      Moderately present (1)      Obviously present (2)</b></p> <p>The contraction of the muscles in the area above the eye causes the increased visibility of the underlying bone surfaces. If temporal crest bone is clearly visible should be coded as "obviously present" or "2".</p>	<p style="text-align: center;"><b>Prominent strained chewing muscles</b></p>  <p style="text-align: center;"><b>Not present (0)      Moderately present (1)      Obviously present (2)</b></p> <p>Straining chewing muscles are clearly visible as an increase tension above the mouth. If chewing muscles are clearly prominent and recognizable the score should be coded as "obviously present" or "2".</p>
<p style="text-align: center;"><b>Mouth strained and pronounced chin</b></p>  <p style="text-align: center;"><b>Not present (0)      Moderately present (1)      Obviously present (2)</b></p> <p>Strained mouth is clearly visible when upper lip is drawn back and lower lip causes a pronounced "chin".</p>	<p style="text-align: center;"><b>Strained nostrils and flattening of the profile</b></p>  <p style="text-align: center;"><b>Not present (0)      Moderately present (1)      Obviously present (2)</b></p> <p>Nostrils look strained and slightly dilated, the profile of the nose flattens and lips elongate.</p>




**Orbital tightening**



**Not present = 0      Partially present = 1      Present = 2**

There is a closing of the palpebral fissure by the eyelids and a narrowing of the eye aperture. If the eye closes more than half way it should be scored as present (2).


**Cheek (masseter muscle) tightening**



**Not present = 0      Partially present = 1      Present = 2**

There is a more convex shaping to the cheek in the area of the masseter muscle and the zygomatic arch as tension increases.

**Abnormal ear position (front)**




**Not present = 0      Partially present = 1      Present = 2**


The ears become fully rotated ventrally and caudally and the inner pinna of the ear becomes less visible. Note: Baseline (not present) ear carriage varies between breeds; however, changes in ear position are the same.

## B.

**Abnormal ear position (side)**




**Abnormal lip and jaw profile**



**Not present = 0      Partially present = 1      Present = 2**

The lower lip is drawn back caudally and the jaw profile appears straight to concave. The chin and jaw line are straightened. The lip line to the commissure of the mouth is straight or even rotated ventrally.

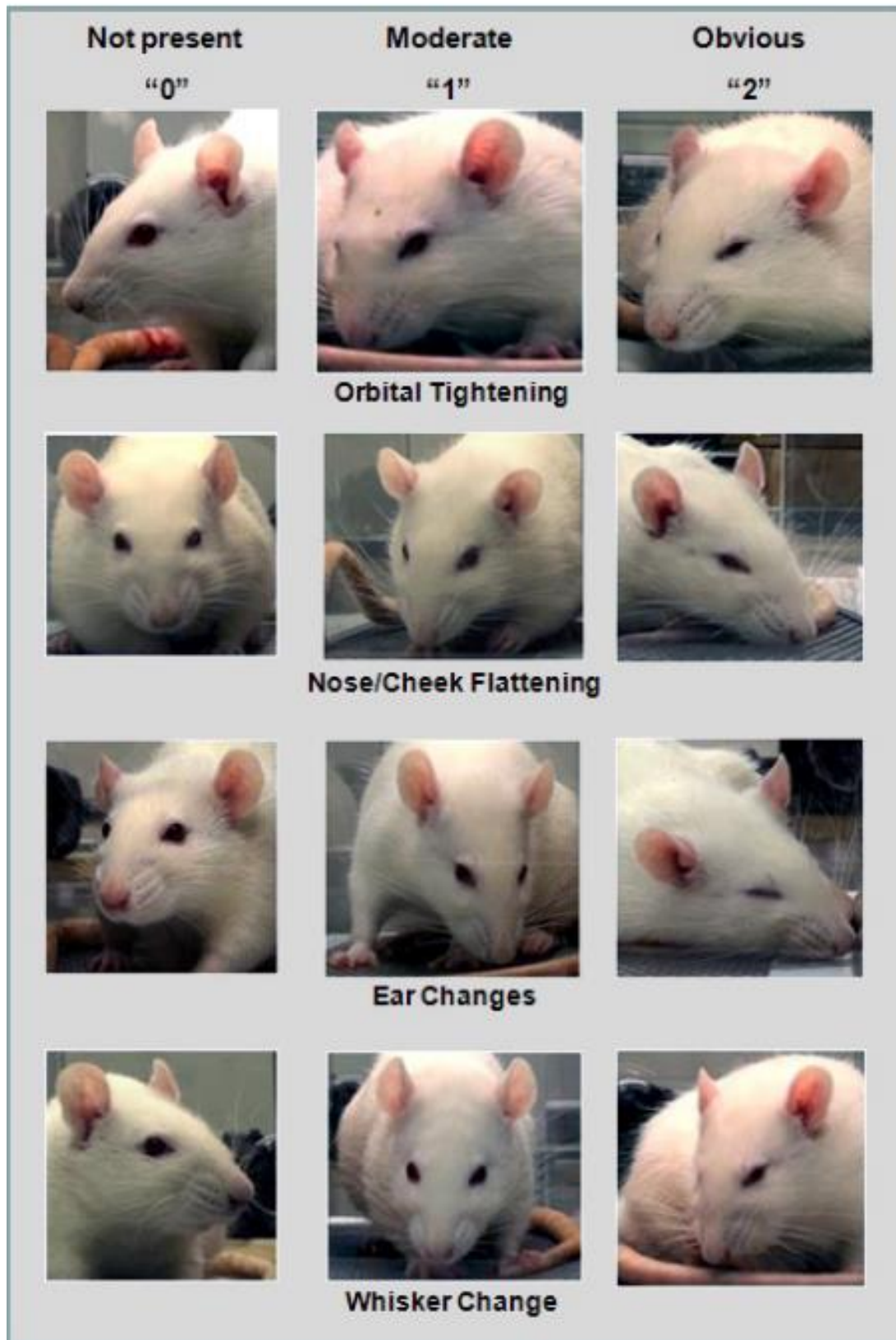
**Abnormal nostril and philtrum shape**



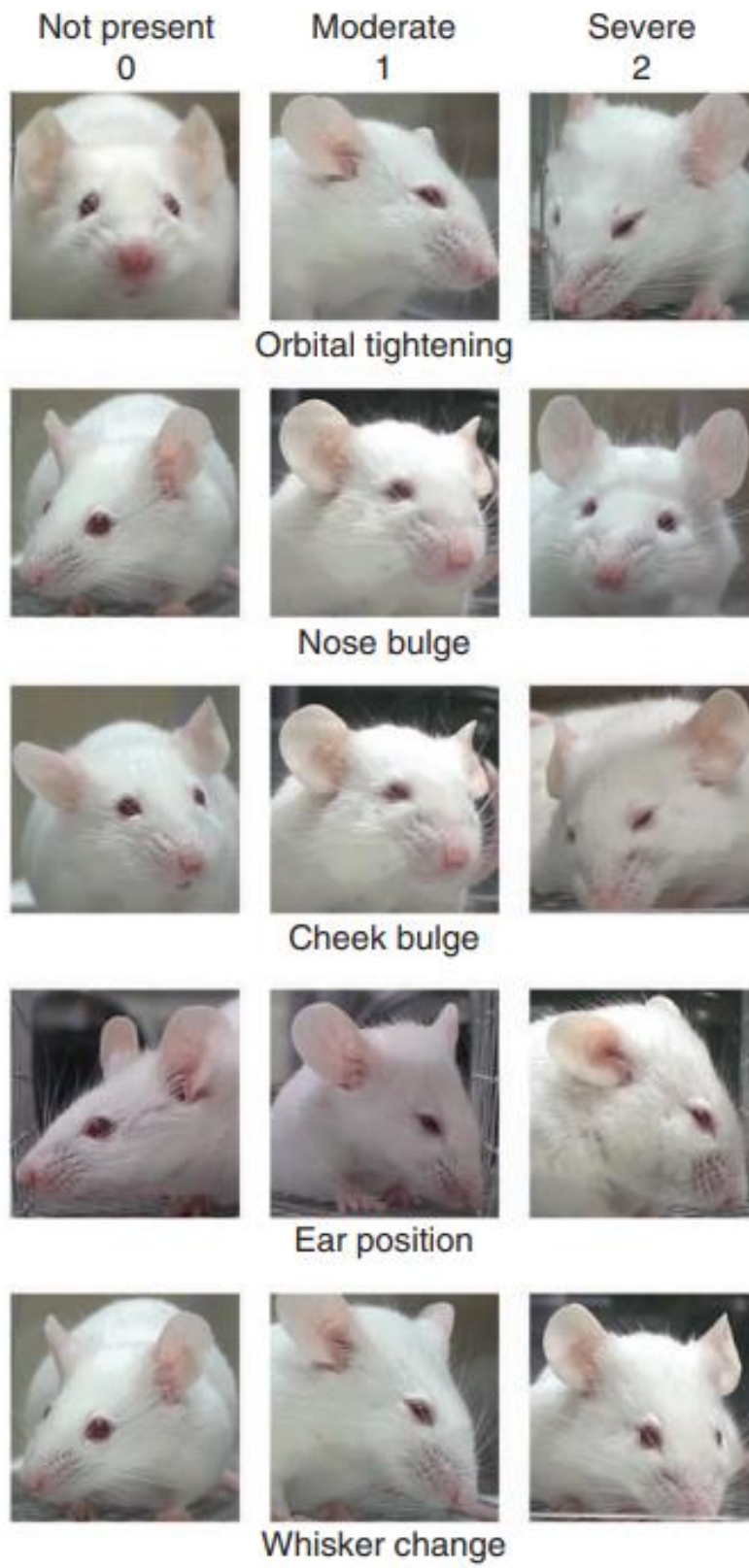
**Not present = 0      Partially present = 1      Present = 2**

As the philtrum is shortened and narrowed increasing a concave appearance of the upper lip profile, a 'V' shape between nostril apertures is present. The V shape is mimicked in the surrounding nose area.

C.



# D.





## E.

**Table 4**  
The Cow Pain Scale including the pain specific behaviours.

Score	0	1	2
Attention towards the surroundings	Active and attentive The cow is active: eating, ruminating, grooming etc. The cow is attentive and/or attention seeking/curious	Quiet/depressed The cow is not active, avoiding eye contact, may move away from the observer	
Head position	High/level of withers The cow is active, eating, ruminating or is contact seeking/curious	Level of withers The cow is <i>not active</i> , not eating, ruminating, grooming or sleeping	Low The cow is <i>not active</i> , not eating, ruminating, grooming or sleeping; may lie down quickly after getting up
Ear position	Both ears forward or one ear forward or back and the other listening	Ears back/asymmetric ear movements Both ears back or moving in different directions (not forward or back)	Lambs' ears Both ears to the sides and lower than usual; the pinna facing slightly down
Facial expression	Attentive/neutral look The cow is attentive, focused on a task (eating, ruminating) or sleeping	Tense expression/strained appearance The cow has a worried or strained look, furrows above the eyes and puckers above the nostrils	
Response to approach	Look at observer, head up, ears forward or occupied with activity (grooming, ruminating)	Look at observer, ears <i>not</i> forward, leave when approached	May/may <i>not</i> look at observer, head low, ears <i>not</i> forward may leave slowly
Back position	Normal	Slightly arched back	Arched back





# ETUDE DE L'EXPRESSION FACIALE DE LA VACHE LAITIERE DANS DIFFERENTES SITUATIONS DOULOUREUSES

Auteur

---

BOROT Maëliiss

## Résumé

---

Le bien-être animal est une préoccupation majeure de la société ces dernières années. La douleur ressentie par les animaux d'élevage constitue un obstacle à ce bien-être. Il faut donc des outils fiables pour détecter la douleur. Les expressions faciales constituent un outil récent utilisé chez plusieurs espèces. Cette thèse s'intéresse à la variation des expressions faciales de la vache laitière lorsqu'elle ressent de la douleur ou non. La première partie, bibliographique, présente le mécanisme de la douleur, les sources de douleur en élevage bovin ainsi que les manifestations de la douleur. Puis, elle récapitule les variations d'expressions faciales observées chez plusieurs espèces de mammifères (rats, souris, chats, chevaux, ovins, bovins) dans différents contextes douloureux. La seconde partie est constituée de deux études expérimentales visant à comprendre si les expressions faciales sont modifiées lors de deux contextes douloureux : une infusion intramammaire de LPS, provoquant une douleur localisée à la mamelle ou une infusion dans veine jugulaire de LPS, provoquant une douleur systémique. Lors de douleur mammaire, les vaches étaient plus nombreuses à avoir le mufle mobile moins longtemps lié à la prise alimentaire, elles avaient tendance à moins cligner des yeux et à avoir le mufle plus longtemps immobile. Elles étaient plus nombreuses à avoir tendance à présenter les oreilles vers l'avant. Lors de douleur systémique, les vaches présentaient un œil creux, rouge et/ou écarquillé. Elles présentaient un mufle immobile plus longtemps 6 heures après le challenge alors qu'il était plus mobile 3 heures après le challenge. Elles présentaient un mufle mobile lié à l'alimentation moins longtemps après l'épreuve qu'avant. Certains éléments de l'expression faciale pourraient donc être utilisés par les professionnels (éleveurs, vétérinaires) pour détecter la douleur chez les bovins et pour discriminer sa source. Cependant, il sera nécessaire de tester ces indicateurs dans d'autres situations douloureuses pour créer une grille d'évaluation adaptée à plusieurs contextes.

## Mots-clés

---

Douleur, expression faciale, bovins, grille, comportement

## Jury

---

Président du jury : **Pr DAVID Jean-Stéphane**

1er assesseur : **Dr DE BOYER DES ROCHES Alice**

2ème assesseur : **Dr LURIER Thibaut**

Membres invités : **Dr LEDOUX Dorothée**

**Mme GINGER Laure**