



**HAL**  
open science

# Accumulation d'émotions et modifications de la sensibilité émotionnelle et des fonctions cognitives chez les ovins

Alexandra Destrez

► **To cite this version:**

Alexandra Destrez. Accumulation d'émotions et modifications de la sensibilité émotionnelle et des fonctions cognitives chez les ovins. Biologie animale. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2012. Français. NNT : 2012CLF22266 . tel-00798018

**HAL Id: tel-00798018**

**<https://theses.hal.science/tel-00798018>**

Submitted on 7 Mar 2013

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

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

**ÉCOLE DOCTORALE  
DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ**

**THESE**

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR D'UNIVERSITÉ  
(SPECIALITÉ ÉTHOLOGIE COGNITIVE)**

présentée et soutenue publiquement par

**ALEXANDRA DESTREZ**

le 21 Septembre 2012

---

**ACCUMULATION D'ÉMOTIONS ET MODIFICATIONS DE LA SENSIBILITÉ ÉMOTIONNELLE  
ET DE FONCTIONS COGNITIVES CHEZ LES OVINS**

---

Directeur de thèse : Alain Boissy

Co-encadrante : Véronique Deiss

<b>Rapporteurs</b>	<b>S. Lumineau</b>	<b>MCF</b>	<b>Université de Rennes 1</b>
	<b>R. Dantzer</b>	<b>Prof.</b>	<b>Université de Houston (Etats-Unis)</b>
<b>Président</b>	<b>P. Chambres</b>	<b>Prof.</b>	<b>Université B. Pascal de Clermont-Ferrand</b>
<b>Membres</b>	<b>H. Erhard</b>	<b>MCF</b>	<b>AgroParisTech</b>
	<b>A-M. De Passillé</b>	<b>DR</b>	<b>Pacific Agri-Food Research Centre (Canada)</b>
	<b>V. Deiss</b>	<b>CR</b>	<b>INRA Centre de Theix</b>
	<b>A. Boissy</b>	<b>DR</b>	<b>INRA Centre de Theix</b>



Laboratoire d'accueil

Equipe Adaptation et Comportements Sociaux

Unité Mixte de Recherches sur les Herbivores

INRA Centre de Clermont-Fd/Theix

F-63122 Saint-Genès-Champanelle





*« Faites que le rêve dévore votre vie afin que la vie ne dévore pas votre rêve. »*

Antoine de Saint-Exupéry (1900 – 1944)



## REMERCIEMENTS

Je commencerai évidemment par remercier Véronique Deiss et Alain Boissy : merci d'avoir été des directeurs de thèse si impliqués humainement et bien sûr scientifiquement. Véro, merci pour ta disponibilité, ton soutien et ta gentillesse à toutes épreuves. Alain, merci de t'être toujours montré à l'écoute malgré ton emploi du temps parfois chargé. Tous les deux, vous avez su me guider, me conseiller et corriger tous mes écrits...

Un grand merci à toute l'équipe ACS : Anne-Marie Chanel, toujours si gentille, Christophe Mallet, mon premier colocataire de bureau, Hervé Chandèze, le roi de la cardio, Stéphane Andanson, l'as de la prise de sang et bien sûr Eric Delval dont l'humour n'est plus à prouver ! Une mention spéciale à Christine Ravel : merci pour ces petits bavardages dans ton bureau et pour ces belles balades avec Ness qui permettent de toujours garder le moral. Je remercie également Isabelle Veissier, Claudia Terlouw, Luc Mounier et Xavier Boivin de m'avoir accompagnée scientifiquement. Un grand merci à Marie-Madeleine Richard de m'avoir supportée et soutenue au quotidien comme une seconde maman. Merci pour votre gentillesse et votre accueil, vous allez tous me manquer.

Parmi les acteurs indispensables de mes expérimentations, je tiens à remercier énormément Dominique Chassaignes et Bruno Viillard sans qui mes brebis n'auraient jamais été stressées ! Merci d'avoir toujours été présents et d'avoir répondu à toutes mes demandes de dernières minutes (« aujourd'hui le pédiluve, demain la bétailière... »). Merci aussi à tous les gars de la bergerie qui ont stressé mes animaux le week-end et qui m'ont toujours accueillie chaleureusement pour une petite pause : Pascal Payard, Cédric Rougheol, Etienne Astier, Lionel Lavelle, Mickaël Bernard, Pascal Faure et Didier Gouttebel. Merci aux agnelles d'avoir été si coopératives !

Je tiens également à remercier les membres de mon comité de thèse qui m'ont permis d'avancer et de me poser les bonnes questions : Patrick Chambres, Arnaud Aubert, Christine Leterrier, Isabelle Veissier et Hélène Asensi. Merci à Gilles Brunschwig qui m'a tellement soutenue et accompagnée depuis mon entrée à l'ENITA.

Merci à toutes les personnes du projet EMOFARM avec lesquelles j'ai eu la chance de travailler : Catherine Belzung, Caroline Lee, Ludovic Calandreau, Frédéric Lévy, Elodie Chaillou, Christine Leterrier, Xavier Boivin, Sophie Lumineau, Cécilia Houdelier, Agathe Laurence, Raymond Nowak, Cécile Arnoud et Fabien Cornilleau.

Je suis reconnaissante à la Région Auvergne et l'ANR pour avoir financé ce travail. Merci à Jean-François Hocquette et Isabelle Veissier directeurs successifs de l'URH, de m'avoir accueillie pendant ces trois années.

Merci à Sophie Lumineau, Robert Dantzer, Patrick Chambres, Hans Erhard et Anne-Marie De Passillé d'avoir accepté de juger ce travail.

Je tiens à remercier Anne-Marie De Passillé et Jeff Rushen de m'avoir laissé ma chance et d'avoir accepté que je fasse mon tout premier stage en éthologie dans leur laboratoire de

recherche. Merci également à Marie-Christine Meunier-Salaün, Sylviane Boulot, Valérie Courboulay et Stéphane Ferchaud.

Une grosse pensée pour tous les collègues que j'ai côtoyés pendant ces trois années à l'INRA et qui sont devenus des amis si proches : Rara et sa Juju, Olivier et Séverine, Raph, Marion, Lisandre, Alice, Claire (ma coéquipière de Zumba), Julie (ma petite aveyronnaise), Maya, Malek, Sophie (toujours le sourire et toujours motivée pour un petit ciné...), Marjo (merci d'être toujours à l'écoute), Cécile (dès que je suis arrivée, tu m'as conseillée et écoutée comme une grande sœur, merci) et bien sûr ma petite Alex avec qui j'ai tant partagé au-delà du prénom (merci pour ta douceur et ta gentillesse)... Merci aussi à tous les autres collègues URH : Damien, Nicolas, Amélie, Nadège, Angélique, Emilie, Lucile, Delphine, Senen, Lucy...en espérant n'oublier personne.

Merci à mes amis de Paris que je connais depuis si longtemps, que j'aime comme ma propre famille et qui sont venus à Clermont un nombre incalculable de fois : Chris (ma boulette pour toujours), Isa (toujours nature), Véro et son Thomas, Marie, Nico (du fameux groupe), Julien, Pierre, Gis et mon frerot François (l'as du canoë). Un grand merci à mes amis sudistes que j'aime tellement et avec qui on rit tout le temps : Flora (ma sœurette !), Jean-Luc et Aurore (pas vraiment du sud).

Enfin, le dernier merci ira à ma famille : Lionel, Suzanne et Alain, Mathieu et Manue, ma grand-mère, mon papa (si fier de sa fille), ma maman (si attentionnée) et mon frerot, merci pour votre soutien, votre amour, vos visites auvergnates et tous ces coups de téléphone ... je vous aime.

Je tiens à dédier tout particulièrement cette thèse à Lionel, mon doudou, toujours là pour veiller sur moi !

# SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION GENERALE .....</b>	<b>1</b>
1. <i>La problématique du bien-être des animaux d'élevage .....</i>	3
1.1 Le bien-être des animaux de ferme : une demande sociétale majeure.....	3
1.2 Les lois de protection des animaux d'élevage.....	4
1.3 Le bien-être des animaux de ferme : une question également scientifique.....	5
2. <i>Les émotions chez l'animal .....</i>	6
2.1 Les théories des émotions .....	6
2.1.1 Aperçu des différentes théories des émotions chez l'homme .....	6
2.1.2 Choix des théories de l'évaluation comme cadre d'étude des émotions chez l'animal.....	7
2.2 Un cadre conceptuel opérationnel à partir du modèle componentiel de Scherer .....	8
2.2.1 Modèle de Scherer.....	8
2.2.2 Le modèle de Scherer adapté à l'animal.....	9
2.3 La prise en compte des processus d'évaluation permet d'accéder au vécu émotionnel de l'animal.....	10
3. <i>La cognition chez l'animal.....</i>	12
3.1 Les processus d'attention, d'évaluation, d'apprentissage et de mémoire .....	12
3.1.1 L'attention .....	12
3.1.2 L'évaluation .....	13
3.1.3 L'apprentissage et la mémoire.....	14
3.2 Les représentations mentales de l'environnement.....	15
4. <i>L'impact d'une expérience émotionnelle sur les fonctions cognitives .....</i>	16
4.1 Effets d'une émotion sur une modification temporaire des fonctions cognitives.....	16
4.2 Effet d'une expérience émotionnelle répétée (ou état affectif) sur la persistance de biais cognitifs.....	18
5. <i>Un exemple d'état affectif persistant influençant les fonctions cognitives : le stress.....</i>	22
5.1 Notion de « stress ».....	22
5.2 L'état de stress chez l'homme.....	23
5.3 Les modèles de stress chronique chez l'animal.....	24
6. <i>Les objectifs de la thèse .....</i>	25
<b>METHODOLOGIE GENERALE .....</b>	<b>27</b>
1. <i>Le modèle animal.....</i>	28
1.1 Choix du mouton comme espèce modèle.....	28
1.2 Animaux expérimentaux .....	28
1.3 Mode d'élevage.....	29
1.4 Habituation aux manipulations .....	29
2. <i>Tests de réactivité émotionnelle .....</i>	30
2.1 Test de nouveauté .....	31
2.2 Test de soudaineté.....	31
2.3 Test de l'homme .....	32
2.4 Mesures comportementales et physiologiques .....	32
3. <i>Tests d'évaluation de biais dans les fonctions cognitives .....</i>	34

3.1	Test de biais de jugement.....	34
3.1.1	Phase 1 : Habituation et entrainement .....	34
3.1.2	Phase 2 : Test de biais de jugement et mesures comportementales relevées .....	35
3.2	Test d'apprentissage.....	36
3.2.1	Habituation et entrainement.....	36
3.2.2	Mesures comportementales relevées .....	37
<b>CHAPITRE 1- MODELE DE STRESS CHRONIQUE ET EFFETS SUR LA REACTIVITE EMOTIONNELLE DES ANIMAUX.....</b>		<b>38</b>
ARTICLE 1.....		39
1.	<i>Objectif</i> .....	39
2.	<i>Méthodes</i> .....	39
3.	<i>Résultats</i> .....	40
4.	<i>Discussion</i> .....	40
<b>CHAPITRE 2 - EFFETS DU STRESS CHRONIQUE SUR DES FONCTIONS COGNITIVES DES ANIMAUX : JUGEMENT, APPRENTISSAGE ET DISCRIMINATION .....</b>		<b>69</b>
ARTICLE 2.....		70
1.	<i>Objectif</i> .....	70
2.	<i>Méthodes</i> .....	70
3.	<i>Résultats</i> .....	71
4.	<i>Discussion</i> .....	71
ARTICLE 3.....		96
1.	<i>Objectif</i> .....	96
2.	<i>Méthodes</i> .....	96
3.	<i>Résultats</i> .....	97
4.	<i>Discussion</i> .....	97
<b>CHAPITRE 3 - REDUCTION DES ALTERATIONS COGNITIVES CONSECUTIVES A UN STRESS PAR L'INDUCTION D'EXPERIENCES EMOTIONNELLES POSITIVES.....</b>		<b>128</b>
ARTICLE 4.....		129
1.	<i>Objectif</i> .....	129
2.	<i>Méthodes</i> .....	129
3.	<i>Résultats</i> .....	130
4.	<i>Discussion</i> .....	130
ARTICLE 5.....		140
1.	<i>Objectif</i> .....	140
2.	<i>Méthodes</i> .....	140
3.	<i>Résultats</i> .....	141
4.	<i>Discussion</i> .....	141

<b>DISCUSSION GENERALE.....</b>	<b>167</b>
1. <i>Est-ce que l'accumulation d'émotions, qui modifie de manière durable le traitement cognitif de l'animal, serait à l'origine de la mise en place d'états affectifs persistants ?.....</i>	169
2. <i>Quelles mesures comportementales et/ou physiologiques peuvent être indicatrices d'un état affectif persistant de bien-être ou de stress ? .....</i>	172
2.1 Les mesures physiologiques d'un état affectif persistant .....	173
2.1.1 L'axe corticotrope .....	173
2.1.2 Le système sympatho-adréno-medullaire .....	175
2.1.3 Le système immunitaire .....	177
2.1.4 De nouvelles approches de marqueurs physiologiques.....	178
2.2 Les mesures comportementales d'un état affectif persistant .....	179
2.2.1 Les tests de réactivité émotionnelle.....	180
2.2.2 Les tests de jugement, d'attention et d'apprentissage.....	181
3. <i>Vers une prise en compte de la variabilité interindividuelle dans les études sur la construction d'états affectifs.....</i>	184
3.1 Des prédispositions génétiques à réagir plus ou moins aux événements environnementaux .....	185
3.2 Le concept de tempérament .....	186
3.3 Une tendance à développer plus ou moins un état affectif donné.....	187
4. <i>Perspectives .....</i>	188
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>193</b>
<b>LISTE DES PUBLICATIONS.....</b>	<b>206</b>
<b>ANNEXE.....</b>	<b>210</b>



---

## INTRODUCTION GÉNÉRALE

---



Pour élaborer une réglementation sur le bien-être des animaux, il est nécessaire que celui-ci soit objectivable. Contrairement à de nombreux concepts scientifiques, il n'existe pas une définition du bien-être unanimement reconnue. La plupart des auteurs s'accordent néanmoins avec la définition selon laquelle le bien-être est un état de bonne santé physique mais aussi mentale (Duncan, 1993). Les émotions tiennent une place centrale dans la définition du bien-être : le bien-être d'un individu résulte de l'absence d'émotions négatives prolongées telles que la peur, la douleur ou la frustration et de la présence d'émotions positives telles que la joie ou le plaisir (Fraser and Duncan, 1998). En plus des émotions qui sont par définition fugaces, le bien-être implique l'existence d'états affectifs persistants qui orientent la manière dont l'individu perçoit et réagit à son environnement (Lazarus, 1991). Bien que l'on dispose désormais d'un ensemble d'outils pour connaître la façon dont un animal perçoit son environnement (Veissier and Boissy, 2007), ces outils évaluent la plupart du temps les conséquences du mal-être et non l'état de mal-être en tant que tel, c'est-à-dire l'état mental de l'animal. Comme le soulignent Dawkins (1990) et Dantzer (2002a), la recherche sur le bien-être des animaux d'élevage s'est généralement limitée à établir des indicateurs de stress sans pour autant pouvoir les relier à l'existence d'états affectifs. Il est désormais nécessaire de passer de la simple description des comportements de l'animal à la compréhension de ses propres états affectifs (Désiré et al., 2002; Paul et al., 2005). Si la continuité entre espèces a été démontrée depuis longtemps au plan de l'anatomie et de la physiologie, la continuité de la sensibilité émotionnelle entre l'homme et les autres espèces animales est difficilement acceptée. Plus précisément, si les animaux de ferme sont décrits comme des êtres sensibles qui éprouvent des émotions, peu d'efforts ont été entrepris pour étudier ce qu'ils sont capables de ressentir. Il est pourtant indispensable de montrer, de manière scientifique, l'existence d'une forme de sensibilité des animaux afin de donner corps aux initiatives visant à assurer leur bien-être. Or, si des avancées significatives ont été réalisées ces dernières années pour décrypter les émotions que peuvent ressentir les animaux, de nombreuses inconnues subsistent encore dans l'exploration du monde affectif de l'animal. Notamment, quels sont les liens entre émotions, réactions fugaces, et bien-être, état affectif durable ?

Nous rapportons brièvement dans une première partie comment les recherches scientifiques et les inquiétudes des citoyens en terme de protection des animaux de ferme ont amené la question du bien-être en élevage. La question du bien-être se pose si l'on reconnaît à l'animal qu'il est capable d'émotions (c'est-à-dire qu'il tend à éviter les émotions négatives tout en recherchant celles positives). Aussi, la deuxième partie de cette introduction définit-elle le

cadre conceptuel développé précédemment pour étudier de manière scientifique les émotions chez l'animal. Les réponses émotionnelles dépendent de la façon dont l'animal perçoit une situation c'est-à-dire se représente mentalement une situation. La troisième partie traite des fonctions cognitives de l'animal qui sont en lien étroit avec les émotions ; en effet, des processus cognitifs simples sont à l'origine des émotions chez les animaux et à l'inverse les émotions peuvent en retour influencer ces processus cognitifs. Les travaux qui suggèrent l'existence de liens entre les émotions voire l'état affectif plus ou moins persistant et la cognition font l'objet de la quatrième partie. Enfin, nous présentons les objectifs et le plan de notre thèse, construite sur les problématiques de l'approche émotions/cognition énoncée précédemment, c'est-à-dire explorer chez l'animal d'élevage comment l'accumulation d'émotions peut modifier de manière persistante ses processus cognitifs et par voie de conséquence instaurer un état affectif persistant de bien-être ou au contraire de stress chronique.

## **1. La problématique du bien-être des animaux d'élevage**

Les attentes des citoyens en termes de protection des animaux de ferme ont amené la question du bien-être en élevage et la nécessité d'élaborer des réglementations. En Europe, la plupart de ces réglementations et cahiers des charges visant à protéger les animaux sont en partie basées sur les résultats des recherches scientifiques.

### **1.1 Le bien-être des animaux de ferme : une demande sociétale majeure**

Après les demandes sociétales de production de viande ou de lait à bas coût, et de qualité sanitaire des produits animaux, le respect du bien-être des animaux considérés comme êtres sensibles à part entière correspond à une attente désormais forte des sociétés occidentales. En effet, au fur et à mesure que nos connaissances du comportement animal se sont enrichies, la différence de sensibilité perçue entre l'homme et les animaux s'est considérablement réduite. D'après un sondage Eurobaromètre sur l'attitude des consommateurs à l'égard du bien-être animal (European Commission, 2007), les consommateurs européens seraient disposés à faire un effort supplémentaire pour acheter des produits respectueux du bien-être des animaux, même si cela suppose de changer de magasin ou de payer plus. Ce sondage, sans être une action concrète, montre tout de même que le bien-être animal fait partie des préoccupations déclarées des citoyens.

De plus, un des relais des attentes des citoyens concernant le bien-être des animaux de ferme est assuré par une grande diversité d'associations de protection animale. Par exemple, en

France, des organisations comme la Protection Mondiale des Animaux de Ferme (PMAF) ou l'Œuvre d'Assistance aux Bêtes d'Abattoirs (OABA) agissent au travers de campagnes d'information, de missions de sauvetage d'animaux en détresse et de soutien auprès des professionnels soucieux de contribuer au respect du bien-être animal.

Le concept de bien-être animal a été au centre des Rencontres Animal et Société organisées par le ministère de l'Agriculture et de la Pêche en 2008 (regroupant des élus nationaux et locaux, des représentants d'associations de protection animale, des professionnels et des scientifiques) et a été l'origine de l'expertise scientifique collective (Le Neindre et al.) sur les douleurs animales conduite par l'INRA en 2009.

## **1.2 Les lois de protection des animaux d'élevage**

En 1964, le livre "Animal Machines" de Ruth Harrison, qui critique les méthodes modernes de production intensive, est le déclencheur d'une polémique sur le traitement des animaux au Royaume-Uni. Un comité scientifique, présidé par Frederick Brambell, se met alors en place pour travailler sur ce sujet en vue de légiférer. Un rapport (rapport Brambell, 1965) spécifiant les 5 points devant être garantis afin de protéger les animaux utilisés par l'homme est rédigé et il est à la base des « 5 libertés » déclarées par le Farm Animal Welfare Council<sup>1</sup> dès 1967. Les 5 libertés pour les animaux de ferme sont : 1/ l'absence de faim, de soif et de malnutrition, 2/ l'absence d'inconfort physique, 3/ l'absence de douleur, de blessure et de maladie, 4/ la possibilité d'exprimer les comportements normaux de l'espèce et 5/ l'absence de peur et de détresse. Depuis, la plupart des réglementations et cahiers des charges visant à protéger les animaux en Europe sont basés sur ces 5 libertés.

Les préoccupations en matière de respect des animaux d'élevage sont donc prises en compte par les instances nationales et européennes depuis les années 70. Ainsi, les animaux sont reconnus comme êtres sensibles envers lesquels l'homme a des obligations par la loi française de 1976 (Loi 76-629 du 10 juillet 1976). En 1999, le Traité d'Amsterdam (publié au Journal Officiel Européen du 10/11/1997) fait passer l'animal d'élevage du statut de « bien marchand » à celui « d'être sensible ». La notion de « sensibilité » renvoie alors aux facultés d'un individu à ressentir et à réagir à son environnement. En 2003, la prise en compte du bien-être animal en élevage en France devient un des objectifs affichés par la Politique Agricole Commune (PAC).

---

<sup>1</sup> FAWC, Comité d'experts du Département Environnement, Aliments et Affaires Rurales de l'Écosse et du Pays de Galles.

La question du bien-être de l'animal d'élevage ne se limite pas à l'établissement de réglementations. Il s'agit également d'une demande sociétale majeure et d'un questionnement scientifique en évolution constante.

### **1.3 Le bien-être des animaux de ferme : une question également scientifique**

Aborder la question du bien-être animal sur un plan scientifique permet de considérer l'attente sociétale en dépassionnant le débat et de tenter d'y apporter des réponses objectives. En effet, élaborer une réglementation sur le bien-être suppose que celui-ci soit objectivable. Par exemple, le programme de recherche européen Welfare Quality® (2004-2009) propose un outil standardisé d'évaluation multicritère du bien-être animal utilisable en routine en élevage (Botreau *et al.*, 2009) afin de mettre en évidence les pratiques d'élevage respectueuses de l'animal. Sur la base des 5 libertés du FAWC, le bien-être est multidimensionnel et de nombreuses définitions existent. Pour Hughes (1976), le bien-être est un état d'harmonie entre l'animal et l'environnement aboutissant à une parfaite santé mentale et physique de l'animal alors que pour Broom (1987) il s'agit d'un ajustement de l'animal à son milieu. Le niveau de bien-être dépend alors des efforts que l'animal doit fournir pour s'adapter à son environnement. Pour Dawkins (1983; 1990) ou Duncan (2005), le bien-être correspond à la reconnaissance d'états émotionnels chez l'animal c'est-à-dire que le bien-être correspond à l'absence d'émotions négatives voire même à la présence d'émotions positives. Ces approches peuvent se compléter pour aboutir à une conception synthétique du bien-être animal. Lorsque l'environnement ne répond pas totalement aux besoins et aux motivations de l'animal, ce dernier a la capacité de s'adapter par des moyens neuroendocriniens et comportementaux sans pour autant souffrir physiquement et/ou mentalement. Veissier et Boissy (2007) proposent de prendre en compte la notion de perception de l'environnement pour répondre à l'écart entre la situation et les besoins et motivations de l'animal.

La question du bien-être de l'animal d'élevage ne se pose que si l'on reconnaît à celui-ci le statut d'être sensible. Cela revient à considérer qu'il est capable d'émotions, évitant alors les émotions négatives tout en recherchant celles positives (Duncan *et al.*, 1996; Dawkins, 2006). Les réactions émotionnelles des animaux sont modulées par une composante subjective qui induit une perception de l'environnement spécifique de l'individu (Veissier and Boissy, 2007). Cette composante subjective lors d'une expérience émotionnelle ne peut être qu'inférée.

Dans cette thèse, le terme de réactivité émotionnelle est défini comme la propension d'un animal à réagir plus ou moins fortement face à différentes situations effrayantes (Boissy, 1998). Elle peut être décrite par des mesures comportementales et physiologiques comme l'activité cardiaque et le niveau de cortisol sanguin et fait appel aux concepts de tempérament des animaux par sa dimension interindividuelle. La réactivité émotionnelle de l'animal permet de mieux comprendre la composante subjective de l'émotion.

## **2. Les émotions chez l'animal**

Les émotions tiennent une place centrale dans la définition du bien-être : le bien-être d'un individu résulte de l'absence d'émotions négatives prolongées telles que la peur, la douleur ou la frustration et de la présence d'émotions positives telles que la joie ou le plaisir (Fraser & Duncan 1998). Il est donc nécessaire de définir le cadre conceptuel utilisé dans cette thèse pour étudier de manière scientifique les émotions chez l'animal.

### **2.1 Les théories des émotions**

#### **2.1.1 Aperçu des différentes théories des émotions chez l'homme**

Classiquement chez l'homme, une émotion se définit au travers d'une composante subjective qui est l'expérience émotionnelle proprement dite (le vécu subjectif) et de deux composantes expressives, l'une somato-motrice et l'autre neuroviscérale (Dantzer, 1994). La composante subjective est généralement estimée chez l'homme à partir de ses rapports verbaux (Scherer, 2003; Bollini et al., 2004) ou de ses expressions faciales (Adams and Oliver, 2011). Actuellement, les approches théoriques qui se sont développées en psychologie humaine pour apprécier les émotions peuvent être classées en trois grandes familles : les théories dimensionnelles, les théories des émotions discrètes et les théories de l'évaluation.

Les théories dimensionnelles postulent que les états affectifs sont appréhendés au travers d'un espace à plusieurs dimensions indépendantes entre elles comme la valence (agréable/désagréable) et l'activation (inactivité/tension) (Osgood, 1952; Schlossberg, 1954; Russell, 1979). Ces théories s'appuient sur la participation active du sujet qui doit pouvoir indiquer ce qu'il ressent c'est-à-dire pouvoir avoir un rapport verbal.

Les théories des émotions discrètes postulent l'existence d'un nombre réduit d'émotions primaires ou basiques qui sont préprogrammées (Ekman, 1992; Izard, 1992; Stein and Oatley, 1992). Les autres émotions jugées plus complexes sont générées par un mélange de ces émotions primaires. Ces théories résultent notamment d'une catégorisation des émotions sur la base principale des expressions faciales.

Les théories de l'évaluation postulent que les émotions sont déclenchées et différenciées sur la base d'une double évaluation cognitive ou double appréciation de la signification de la situation par l'individu (Arnold, 1945; Lazarus, 1991; Scherer, 1999). Le sujet évalue d'abord la situation (évaluation primaire) puis la pertinence de sa réponse à la situation déclenchante (évaluation secondaire). C'est l'issue de cette double évaluation qui déterminerait le type d'émotion ressentie et donc exprimée. Cette évaluation influence et est influencée à la fois par le vécu émotionnel et par les réponses motrices et physiologiques.

### 2.1.2 Choix des théories de l'évaluation comme cadre d'étude des émotions chez l'animal

Les animaux sont capables d'attribuer une valeur affective à leur environnement. Les études sur le stress montrent que c'est la manière dont l'animal se représente l'événement, et non l'événement en tant que tel, qui va déterminer sa réaction. Les réponses émotionnelles de l'animal dépendent donc de la façon dont il perçoit la situation déclenchante. Dès les années 70, Mason (1971) avait montré que des singes privés de nourriture présentaient des signes de stress lorsqu'ils assistaient à la distribution d'aliments à d'autres singes. Par contre, si ces singes privés de nourriture recevaient un substitut alimentaire non nutritif, pendant que d'autres singes recevaient de l'aliment ou qu'ils n'assistaient pas à la distribution d'aliment des autres singes, ils ne présentaient pas de signe de stress. Le facteur « absence d'aliment » n'était donc pas responsable de la réponse mais c'était la perception d'une privation par rapport à des congénères qui en était responsable. Des résultats similaires ont été montrés chez des animaux de laboratoire (par exemple sur les rats : Weiss, 1972) et chez des animaux d'élevage (sur les vaches: Johnson and Vanjonack, 1976; sur les moutons: Greiveldinger et al., 2007). La perception de la contrôlabilité ou de la prévisibilité qu'a l'animal d'un événement auquel il est soumis joue un rôle déterminant dans ses réponses émotionnelles. Il était donc nécessaire de prendre en compte les processus cognitifs c'est-à-dire le traitement de l'information et les représentations mentales, pour parvenir à mieux appréhender l'expérience émotionnelle ressentie par l'animal. Les théories de l'évaluation offrent un cadre conceptuel intéressant pour l'étude des réponses émotionnelles chez l'animal (Dantzer, 2002b; Désiré et al., 2002) car elles permettent de s'affranchir du rapport verbal nécessaire aux théories dimensionnelles et/ou des expressions faciales nécessaires aux théories des émotions discrètes.

Parmi les différents modèles de théories de l'évaluation (Smith and Kirby, 2001; Philippot et al., 2004), celui proposé par Scherer (1999; 2001) est particulièrement intéressant à utiliser comme cadre conceptuel pour l'étude des émotions chez l'animal car ce modèle componentiel

décrit précisément les caractéristiques impliquées dans l'évaluation de la situation et ces caractéristiques proposées sont accessibles aux animaux pour générer des émotions (Désiré, 2004; Greiveldinger, 2007).

## **2.2 Un cadre conceptuel opérationnel à partir du modèle componentiel de Scherer**

### **2.2.1 Modèle de Scherer**

Selon Scherer (1999; 2001), les dimensions d'évaluation peuvent être détaillées en caractéristiques simples tels que la soudaineté de l'évènement, sa familiarité ou encore sa prévisibilité. L'individu évaluerait la situation à laquelle il fait face, au travers d'un nombre fixe de caractéristiques organisées en quatre grandes étapes (Sander *et al.*, 2005):

- (1) la détection de la signification de la situation (caractéristiques utilisées : nouveauté c'est-à-dire familiarité /soudaineté /prévisibilité, agrément, pertinence)
- (2) l'estimation de l'implication de la situation par rapport aux besoins et attentes de l'individu (caractéristiques utilisées : attribution causale, probabilité de la résultante, non-correspondance aux attentes, facilitation par rapport aux buts et besoins, urgence)
- (3) la détermination du potentiel de maîtrise de la situation par l'individu ou « coping » (caractéristiques utilisées : contrôlabilité, pouvoir, ajustement)
- (4) l'évaluation de la signification par rapport aux normes propres à l'individu (caractéristiques utilisées : standards internes et externes).

Dans la théorie de Scherer, il est postulé que les évaluations sont organisées en cascade : l'évaluation de l'estimation de l'implication de la situation (2) n'est considérée que si l'évènement est détecté comme pertinent (1), et la détermination du potentiel de « coping » (3) n'est considérée que si l'évènement a une implication pour les besoins et les attentes de l'individu (2) et ainsi de suite. Au début de la cascade d'évaluations, les premières caractéristiques seraient évaluées de manière quasi-immédiate et inconsciente. Puis, plus les caractéristiques sont complexes, plus l'évaluation serait complexe. La théorie propose également de caractériser les émotions par des combinaisons particulières de caractéristiques (Sander *et al.*, 2005).

Le modèle défini par Scherer chez l'homme n'est pas le seul modèle qui pourrait être utilisé comme cadre conceptuel de travail pour l'étude des émotions chez l'animal mais il a été choisi dans notre équipe car : i) les caractéristiques d'évaluation à l'origine du processus émotionnel, clairement différenciés, facilitent l'élaboration de situations expérimentales

visant à manipuler spécifiquement l'évaluation des situations par l'individu, ii) les caractéristiques semblent pouvoir se prêter à l'animal (Désiré, 2004; Greiveldinger, 2007) et iii) les prédictions sur les réponses comportementales et physiologiques induites par les différents caractéristiques d'évaluation guident le choix des mesures à réaliser.

### 2.2.2 Le modèle de Scherer adapté à l'animal

Le modèle de Scherer peut permettre d'estimer de manière expérimentale la composante subjective la plus probablement ressentie chez l'animal. En effet, une situation expérimentale peut être manipulée *a priori* pour que la combinaison de caractéristiques (accessibles à l'individu) qui la caractérise corresponde à une émotion X. Si cette situation expérimentale entraîne une réponse comportementale et une réponse physiologique alors la composante subjective peut être inférée comme celle correspondant à l'émotion X (Désiré, 2004; Greiveldinger, 2007). Le modèle de Scherer permet également une description plus précise de la situation déclenchant l'émotion et une utilisation de paradigmes expérimentaux pas forcément nociceptifs. Ainsi, depuis quelques années l'ovine (Désiré *et al.*, 2004) a été choisi comme espèce modèle afin de tester ses capacités d'évaluation au travers des quatre étapes de l'évaluation postulées par Scherer : (1) la détection de la signification de la situation, (2) l'estimation de l'implication de la situation par rapport aux besoins et attentes de l'individu, (3) la détermination du potentiel de maîtrise de la situation par l'individu ou « coping » et (4) l'évaluation de la signification par rapport aux normes propres à l'individu. Les animaux de ces expérimentations ont été placés dans des situations motivantes c'est-à-dire dans des situations de distribution d'aliment et l'étude des caractéristiques d'évaluation se sont faites préférentiellement sur le versant négatif mais non nociceptifs.

Désiré *et al.* (2002; 2004; 2006) et Greiveldinger *et al.* (2007; 2009; 2011) ont testé puis validé les caractéristiques d'évaluation suivantes comme caractéristique accessible aux ovins :

(1) la nouveauté avec ses trois sous caractéristiques : la soudaineté, la non-familiarité et la prévisibilité,

(2) la non-correspondance aux attentes,

(3) la contrôlabilité,

(4) les normes sociales (dominant et subordonné).

La soudaineté, la familiarité et la prévisibilité d'un évènement sont des caractéristiques d'évaluation également accessibles aux oiseaux (Nephew *et al.*, 2003; Valance *et al.*, 2007), aux chevaux (Lansade *et al.*, 2007), aux bovins (Johnson and Vanjonack, 1976; Bourguet *et al.*, 2011) et aux porcs (Carlstead, 1986). Les caractéristiques d'évaluation accessibles à

l'animal testées seules ou combinées sont donc à ce jour la nouveauté (soudaineté, familiarité, prévisibilité), la correspondance aux attentes, la contrôlabilité et les normes sociales.

L'évaluation d'une situation déclenchant l'émotion, en fonction des caractéristiques de celle-ci, est une des fonctions cognitives de l'animal qui lui permet de percevoir son environnement (Paul *et al.*, 2005). Les réponses émotionnelles dépendent donc de la façon dont l'animal perçoit une situation.

### **2.3 La prise en compte des processus d'évaluation permet d'accéder au vécu émotionnel de l'animal**

Sur la base de théories développées en psychologie cognitive (Scherer, 1999; 2001), il a été rapporté précédemment que des processus cognitifs simples sont à l'origine des émotions chez les animaux (Boissy *et al.*, 2007b). Des méthodes d'analyse fine des comportements ont été développées comme l'identification de la posture de la tête ou des oreilles de l'animal (Désiré *et al.*, 2006; Reefmann *et al.*, 2009a; Reefmann *et al.*, 2009b; Boissy *et al.*, 2011).

Des techniques non invasives ont été également mises au point pour mesurer l'activation du système neurovégétatif à l'origine des modifications physiologiques (Despres *et al.*, 2003; Valance *et al.*, 2007; von Borell *et al.*, 2007). Par exemple, des tests expérimentaux des caractéristiques de l'évaluation d'une situation comme sa soudaineté ou sa non-familiarité (Désiré *et al.*, 2004) ont permis de caractériser précisément les modifications comportementales et physiologiques de l'animal :

- la soudaineté d'une situation entraîne un sursaut et une brève accélération du rythme cardiaque,
- la non-familiarité d'une situation entraîne un comportement d'orientation vers l'objet et une augmentation transitoire de la variabilité de la fréquence cardiaque
- la combinaison des deux caractéristiques de la situation a un effet synergétique (Désiré *et al.*, 2006).

Cependant, il a été montré que les réponses émotionnelles sont réduites lorsque l'animal a la possibilité de prévoir l'évènement déclencheur. Par exemple, Greiveldinger *et al.* (2007) montrent que des agnelles soumises à l'apparition régulière d'un évènement soudain vocalisent moins et passent plus de temps à manger que des agnelles soumises à l'apparition aléatoire d'un évènement soudain. L'apprentissage d'une situation comme l'habituation a également un effet sur les émotions des animaux. Par exemple, Nunez *et al.* (1995) montrent

que l'habituation à des manipulations par l'homme sur des rates juste après la naissance (les 20 premiers jours après la naissance) entraînent une diminution des réactions de peur lors des captures et des manipulations de ces animaux âgés de 40 jours ainsi qu'une augmentation de la préférence pour un environnement nouveau (plus d'explorations). De même, chez les chevaux, les réactions de peur face à un objet diminuent (diminution de la distance d'approche de l'objet) après l'habituation à cet objet (mise en présence 2 fois par jour pendant 5 jours). Une diminution du rythme cardiaque est aussi observée (Leiner and Fendt, 2011). La perception de l'environnement par l'animal se fait donc par la mobilisation de ses fonctions cognitives comme l'évaluation mais aussi l'attention et l'apprentissage. Cette perception individuelle de l'environnement va induire une émotion particulière. En plus des émotions, réactions affectives brèves, il existe des états affectifs persistants qui conditionnent en retour la manière dont l'animal perçoit et réagit à son environnement (Lazarus, 1991). La prise en compte du bien-être animal en élevage s'est généralement limitée aux indicateurs d'émotions négatives sans pour autant pouvoir les relier à l'existence d'états affectifs (Dantzer, 2002a; Dawkins, 2006).

Une émotion se définit comme une réaction affective brève et intense en réponse à une situation (Greiveldinger, 2007). Elle peut être déclenchée à l'issue de l'évaluation (fonction cognitive) de la situation à laquelle l'individu est confronté (Lazarus, 1991; Scherer, 1999). Les animaux sont capables eux-aussi d'attribuer une valeur affective à leur environnement selon la perception qu'ils ont de leur environnement. Les études sur le stress montraient déjà que c'est la manière dont l'animal se représente l'événement, et non l'événement en tant que tel, qui va déterminer sa réaction. La référence aux théories de l'évaluation développées en psychologie cognitive permet d'instaurer un cadre conceptuel opérationnel facilitant l'accès à la composante subjective à partir des relations entre les composantes expressives (somato-motrice et neuroviscérale) et une composante « cognitive » représentant le traitement de l'information qui est à l'origine de l'expérience émotionnelle.

Chez les animaux, une meilleure connaissance des fonctions cognitives de l'individu devrait permettre de mieux comprendre les relations intimes entre les processus émotionnels et les états affectifs d'arrière plan.

### **3. La cognition chez l'animal**

Comme développé précédemment, les réponses émotionnelles dépendent de la façon dont l'animal perçoit une situation donnée, c'est-à-dire de la façon dont il se représente mentalement cette situation. La cognition est définie comme l'ensemble des processus qui permettent à l'animal de recevoir des informations de son environnement par ses sens, de les traiter et de les retenir afin d'agir en conséquence (Shettleworth, 2001), et les représentations mentales qui sont associées à ces processus. Paul et al. (2005) identifient que la cognition implique les processus d'attention, d'évaluation, d'apprentissage et de mémoire, processus qui sont indissociables des représentations mentales.

#### **3.1 Les processus d'attention, d'évaluation, d'apprentissage et de mémoire**

##### **3.1.1 L'attention**

Pour William James (1890), chez l'homme « l'attention est la prise de possession par l'esprit, sous une forme claire et vive, d'un objet ou d'une suite de pensées parmi plusieurs qui semblent possibles [...] Elle implique le retrait de certains objets afin de traiter plus efficacement les autres ». L'attention est très souvent testée grâce à des tâches faisant intervenir des rapports verbaux (revue de Mathews and Macleod, 1994). Chez l'animal, l'attention est donc plus difficile à tester. Elle pourrait se définir comme un intérêt pour un stimulus et pourrait être observée par exemple lors d'un comportement de vigilance. En effet, l'attention permet d'éviter un danger ou de se protéger d'une éventuelle menace (Lang *et al.*, 2000).

Lors de tests expérimentaux, le comportement de vigilance est souvent utilisé comme un indicateur de peur (émotion négative) (Welp *et al.*, 2004) ou de réactivité émotionnelle (propension d'un animal à réagir plus ou moins fortement face à différentes situations effrayantes) (Désiré et al., 2006; Deiss et al., 2009). Par exemple, lorsque l'animal est mis en présence d'un aliment très appétant, le comportement « manger l'aliment » et le comportement de vigilance rentrent en conflit. Si la peur est trop forte, l'animal ne mangera pas l'aliment. Dans la nature, le fait d'être attentif c'est-à-dire vigilant à son environnement permet à l'animal d'augmenter la probabilité de détecter un stimulus à un temps donné (Dimond and Lazarus, 1974). La vigilance permet donc à l'animal de détecter un ensemble de stimuli pertinents mais sa fonction première est de détecter et d'éviter les prédateurs. En élevage, la vigilance permet aux animaux de détecter des situations nouvelles (soudaines, non-familiales et imprévisibles) voire des situations de menaces dues à la présence d'un

prédateur comme le chien ou le loup. Par exemple, les bovins sont plus vigilants dans un endroit nouveau, en présence d'un chien ou en présence d'une personne qui les a manipulés de façon aversive (Welp *et al.*, 2004).

### 3.1.2 L'évaluation

L'évaluation (ou évaluation) est un processus qui permet à l'animal de juger la pertinence d'un stimulus (objet, évènement, situation, ...) et de savoir comment répondre à ce stimulus (Paul *et al.*, 2005). La capacité d'évaluer une situation a été démontrée expérimentalement chez l'animal dès le milieu du vingtième siècle. Crespi a observé qu'en fonction de leur expérience passée les rats répondaient plus ou moins favorablement à une récompense donnée (Crespi, 1981). Les rats évaluaient la situation (une quantité fixe de 16 granulés) par rapport à leur expérience passée (récompenses d'un granulé, de 16 ou de 256 granulés) : les rats préalablement récompensés avec 256 granulés se déplaçaient plus lentement que les rats préalablement récompensés avec 16 granulés ou un seul. En 2004, Harding *et al.* mettent en place un test comportemental permettant la mise en évidence du processus de jugement d'une situation ambiguë chez le rongeur (ce test sera développé précisément dans la partie 4.). La capacité à évaluer une situation est également mise en évidence chez les animaux de ferme comme les porcs (Douglas *et al.*, 2012), les moutons (Doyle *et al.*, 2009) et les volailles (Salmeto *et al.*, 2011).

De plus, l'évaluation repose sur le processus de catégorisation qui permettrait à l'animal de simplifier son environnement complexe et changeant en limitant la demande cognitive (Kreutzer and Vauclair, 2004). Par exemple, dans le cas de l'évaluation d'une situation nouvelle, l'individu va comparer la situation actuelle avec les catégories d'objets ou d'événements auxquels il a été confronté auparavant. Une catégorie correspond alors à une classe d'équivalence fonctionnelle : des objets ou des formes qui déclenchent des réponses équivalentes peuvent être considérés comme appartenant à la même catégorie (Herrnstein, 1990). L'animal peut ainsi s'ajuster rapidement et de façon adaptée à son environnement. Par exemple, les bovins sont capables de catégoriser leur espèce propre des autres espèces domestiques. Des génisses laitières Prim'Holstein ont été capables de discriminer visuellement des images de faces de leur propre espèce quelque soit la race (Prim'Holstein, Abondance, Charolaise et Normande) d'images de faces d'autres espèces (ovin, équin, caprin et canin) (Coulon *et al.*, 2007). De la même façon, les ovins sont capables de discriminer des ovins familiers d'ovins non familiers grâce à des images de faces (Kendrick *et al.*, 2001).

### 3.1.3 L'apprentissage et la mémoire

Le résultat d'un apprentissage peut être observé lorsqu'une expérience d'une situation résulte en un changement relativement permanent de réaction face à cette situation (Pearce, 1997). L'apprentissage peut être défini comme la phase d'acquisition de l'information qui permet ce changement relativement permanent de réaction face à une situation déjà connue auparavant. L'étude de la mémoire de l'animal correspond à comprendre comme une information acquise à un moment donné est capable d'influencer les comportements futurs (Pearce, 1997). La mémoire est alors le processus de stockage ou de rétention de l'information. Apprentissage et mémoire sont donc des concepts intimement liés.

La rétention d'une information peut être à long terme et à court terme. Par exemple, Vaughan et Greene (1984) ont montré que des pigeons étaient capables de discriminer des images grâce à un apprentissage présence/absence de nourriture et de retenir cette discrimination pendant au moins deux ans. Chez les animaux de laboratoire, McFarland (2004) met en évidence plusieurs types d'apprentissage :

- le conditionnement classique comme l'expérience de Pavlov avec le conditionnement salivaire du chien,
- l'acquisition suivie de l'extinction (arrêt du comportement appris car non approprié) ou de l'habituation (diminution des réponses suite à des applications répétées du stimulus),
- la généralisation (apprentissage d'une réponse particulière à un stimulus particulier puis à d'autres stimuli semblables)
- l'apprentissage par *insight* (apprentissage d'une découverte soudaine de la solution d'un problème),
- l'apprentissage associatif (apprentissage d'une cause, de son effet et de son non-effet).

L'apprentissage a été également étudié chez les animaux de ferme comme par exemple lors de discrimination d'images de leur espèce propre chez le bovin (Coulon *et al.*, 2007), de signaux acoustiques chez le porc (Zebunke *et al.*, 2011), de formes chez la chèvre (Langbein *et al.*, 2006) et de faces de congénères ou de symboles chez le mouton (Kendrick *et al.*, 1996; Kendrick *et al.*, 2001; Ferreira *et al.*, 2004). Par exemple, le mouton est capable de reconnaître plus de 50 congénères différents et de retenir cette information pendant au moins 2 ans (Kendrick *et al.*, 2001).

### **3.2 Les représentations mentales de l'environnement**

Une représentation mentale est définie par Denis (1994) « lorsqu'un objet ou les éléments d'un ensemble d'objets se trouvent exprimés, traduits, figurés, sous forme d'un nouvel ensemble d'éléments et qu'une correspondance systématique se trouve réalisée entre l'ensemble de départ et l'ensemble d'arrivée ». Les représentations sont alors des fragments de l'information, structurés et stockés dans la mémoire du sujet, qui permettent de réguler le comportement (Le Ny, 1985). De ce fait, traiter l'information sensorielle par l'intermédiaire des processus cognitifs suppose de faire du stimulus de l'environnement une représentation mentale. La représentation mentale serait donc un outil d'interprétation de l'environnement.

Comme les humains, les animaux peuvent traiter les informations de leur environnement sous forme de représentations mentales (Lanz and McFarland, 1995; Vauclair, 1996). L'animal est capable de se représenter une ou plusieurs propriétés d'une expérience antérieure et cette propriété va lui servir d'indice pour choisir la réponse appropriée. L'animal adaptera alors son comportement à son environnement physique et social à partir de ses représentations mentales (Kreutzer and Vauclair, 2004).

Vauclair (1992) propose l'existence de quatre niveaux de traitement des représentations chez l'animal :

- Niveau 1 : le couplage temporel et spatial, de type conditionnement pavlovien (associations)
- Niveau 2 : la comparaison entre objets ou situations, conduisant à des rapports de similitude ou de différence (discrimination, reconnaissance, individualisation)
- Niveau 3 : la relation d'appartenance permettant de regrouper des objets au sein d'une même classe et de se représenter un objet abstrait à partir de quelques propriétés invariantes d'une collection d'objets concrets
- Niveau 4 : les inférences logiques appliquées à des objets, des espaces, des relations entre sujets.

La perception de l'environnement est définie dans cette thèse comme la représentation mentale qu'un animal fait de son environnement (Veissier and Boissy, 2007) nécessitant l'ensemble de ses fonctions cognitives.

La cognition est définie comme l'ensemble des processus de traitement de l'information qui permettent à l'animal de percevoir son environnement et de s'y adapter. Comme l'homme, l'animal possède des fonctions cognitives telles que l'attention, l'évaluation, l'apprentissage et la mémorisation.

#### **4. L'impact d'une expérience émotionnelle sur les fonctions cognitives**

Cette partie traite des fonctions cognitives de l'animal qui sont en lien étroit avec les émotions ; en effet, des processus cognitifs simples sont à l'origine des émotions chez les animaux et à l'inverse les émotions peuvent en retour influencer les processus cognitifs et ce d'autant plus durablement que l'expérience émotionnelle persiste (Paul *et al.*, 2005).

##### **4.1 Effets d'une émotion sur une modification temporaire des fonctions cognitives**

Des travaux en psychologie humaine montrent combien les émotions peuvent influencer les processus cognitifs (revue de Paul *et al.*, 2005). Cette influence est appelée **biais cognitif**. Les biais cognitifs peuvent être classés en trois catégories principales : les biais d'attention, les biais de jugement et les biais d'apprentissage. Ces biais peuvent être positifs ou négatifs car ils varient en fonction de la valence de l'expérience émotionnelle.

Chez l'homme, ces trois types de biais ont pu être mis en évidence. Les émotions peuvent influencer le processus d'attention en modifiant le comportement de vigilance chez l'homme (Shechner *et al.*, 2012). En particulier, une émotion négative peut diminuer la performance de détection des menaces ou dangers (Helton *et al.*, 2009; Ossowski *et al.*, 2011). Ainsi par exemple, lors d'un test de vigilance sur 40 participants, les performances de détection de menaces simulées sur l'écran d'un ordinateur sont plus basses en présence d'images négatives (par exemple un pistolet pointé directement sur le participant) qu'en présence d'images neutres (par exemple une cuillère) (Ossowski *et al.*, 2011). Les émotions peuvent également influencer l'évaluation ou le jugement d'une situation. De très nombreuses études ont montré ce biais de jugement chez l'homme (revue de Angie *et al.*, 2011). Par exemple, Fessler *et al.* (2004) ont montré grâce à des questionnaires sur la prise de risques (physiques, sociaux et sexuels) au quotidien que la colère (une émotion négative) augmente les prises de risques alors que le dégoût (une autre émotion négative) diminue les prises de risques. Les émotions peuvent aussi influencer les fonctions cognitives d'apprentissage et de mémoire. Chez l'homme, les événements qui induisent des émotions positives ou négatives sont retenus plus

facilement que les évènements qui sont neutre émotionnellement. Cependant, lors d'un évènement induisant une émotion forte, les caractéristiques centrales de l'évènement sont précisément mémorisées alors que les détails périphériques ne le sont pas (Paul *et al.*, 2005). Par exemple, lors d'une expérience menée par Peace et Porter (2004) sur un échantillon de 52 participants qui ont subi un événement traumatisant récent : les participants devaient se rappeler à la fois de l'évènement traumatisant récent et d'une expérience émotionnelle positive lors de deux entretiens séparés d'environ trois mois. La comparaison des résultats des deux entretiens a indiqué que les expériences traumatisantes ont été mémorisées de façon plus fiable au fil du temps que les expériences émotionnelles positives. Ce test permet de mettre en évidence une mémorisation modifiée par l'état émotionnel du participant.

Plus récemment, différents travaux engagés sur les animaux rapportent les mêmes biais cognitifs. Le biais d'attention est fréquemment rapporté lors de tests de peur où la vigilance est accrue. Les tests de peur les plus utilisés chez les animaux d'élevage sont les tests « d'open field » (l'animal est placé seul dans un dispositif inconnu), les tests d'objet nouveau (l'animal est mis en présence d'un objet non familier) et les tests de contention (revue de Forkman *et al.*, 2007). De même, des biais de jugement sont mentionnés chez les animaux. Des mesures de comportement du « risque pris » ont d'abord été développées. Il s'agit par exemple, d'observer les décisions d'un animal à sortir d'une zone protégée pour aller dans une zone ouverte non protégée (Blanchard *et al.*, 1998). Enfin, l'altération de la mémoire des animaux à la suite d'une émotion a été démontrée par l'administration d'hormones connues pour être sécrétées lors d'un évènement négatif ou positif comme les catécholamines (par exemple l'adrénaline) et les glucocorticoïdes (par exemple le cortisol ou le corticostérone) (Paul *et al.*, 2005). Les hormones sécrétées suite à une émotion négative jouent également un rôle important dans l'apprentissage : des concentrations basses de glucocorticoïdes et de catécholamines peuvent améliorer l'apprentissage tandis que des concentrations hautes de ces hormones peuvent mener à la perturbation de l'apprentissage (Mendl, 1999). Sandi *et al.* (1997) ont exploré le rôle du corticostérone dans l'apprentissage et la mémoire à long terme d'une tâche dans la piscine de Morris (un labyrinthe aquatique avec des repères spatiaux) chez des rats. Les rats ayant appris la tâche à 19°C (émotion négative) montraient une meilleure acquisition et une meilleure rétention à long terme que les rats ayant appris la tâche à 25°C (émotion positive). La performance des rats ayant appris à 25°C, mais pas à 19°C, était améliorée après l'injection de corticostérone immédiatement après chaque session de formation.

#### **4.2 Effet d'une expérience émotionnelle répétée (ou état affectif) sur la persistance de biais cognitifs**

L'état affectif (« mood ») est défini dans cette thèse comme un état mental persistant résultant d'une expérience émotionnelle répétée occasionné par une accumulation d'émotions (Boissy et al., 2007a; Mankad, 2012). Chez l'homme, la persistance des trois types de biais cognitif (attention, jugement et apprentissage) sous l'effet d'un état affectif donné ou d'une caractéristique affective propre à l'individu a pu être mise en évidence. Les personnes anxieuses c'est-à-dire dans un état affectif négatif possèdent un biais d'attention envers des informations menaçantes (revue de Mathews and Macleod, 1994). Par exemple, ce biais d'attention peut être mis en évidence lors d'une tâche de questionnement visuel (« visual dot probe task ») : des participants sont exposés à un couple de mots, un mot menaçant et un mot neutre, qui apparaissent simultanément sur un écran. L'un des mots est en position haute, l'autre est en position basse. Après un court délai, un point apparaît à l'un des deux emplacements. L'épreuve consiste à détecter le point le plus vite possible. Dans ce test, les participants anxieux détectent le point significativement plus rapidement lorsqu'il apparaît à l'emplacement du mot menaçant, plutôt qu'à l'emplacement où était situé le mot à contenu neutre (Macleod et al., 1986; Keogh et al., 2001). Cette tâche permet de mettre en évidence un comportement de vigilance modifié par l'état affectif du participant c'est-à-dire un biais d'attention.

L'état affectif modifie également l'évaluation ou le jugement d'une situation. Ainsi, les personnes anxieuses ont tendance à biaiser leur interprétation des stimuli ambigus (Paul *et al.*, 2005). Par exemple, des sujets ayant été exposés à des événements à forte valence négative tendent à interpréter négativement tout nouvel événement ambigu (Wright and Bower, 1992), ils possèdent alors un biais de jugement négatif. A l'inverse, des personnes jugées heureuses tendent à interpréter positivement tout nouvel événement ambigu c'est-à-dire qu'elles surestiment la probabilité d'un résultat positif et sous-estiment la probabilité d'un résultat négatif (Wright and Bower, 1992; Nygren et al., 1996). Les personnes dans un état affectif positif possèdent alors un biais de jugement positif. La plupart des tests mesurant l'influence des émotions ou de l'état affectif sur les processus cognitifs chez l'homme, font intervenir le langage.

Enfin, l'état affectif peut également influencer les fonctions cognitives d'apprentissage et de mémoire. Ce phénomène est très étudié en particulier l'influence des états affectifs négatifs sur les structures du cerveau contrôlant la mémoire (Sandi and Pinelo-Nava, 2007; Packard and Goodman, 2012). En effet, des biais de mémoire peuvent être observés lors de désordres

post traumatiques ou de troubles obsessionnels compulsifs chez des personnes très anxieuses (revue de Coles and Heimberg, 2002).

Comme précédemment, de plus en plus de travaux conduits sur les animaux montrent que les mêmes biais cognitifs peuvent persister sous l'effet d'état affectif marqué. Bien que le biais d'attention est difficile à montrer chez l'animal, Paul et al. (2005) suggèrent que le comportement de vigilance des animaux pourrait être utilisé. Ainsi, Lacreuse et al. (2012) ont montré qu'en modifiant l'état affectif de singes Rhésus mâles par l'injection de testostérone, l'attention des animaux était modifiée. Les singes dans un état affectif négatif augmentaient leur vigilance et réduisaient ainsi leur nombre de contacts avec des objets (familiers, nouveaux et négatifs) et en particuliers avec des objets à valence négative (serpent vert en caoutchouc, masques vert ou brun avec des gros yeux). Un biais négatif d'attention envers les objets de l'environnement peut être supposé. Des résultats similaires ont été montrés chez des génisses laitières (Raussi *et al.*, 2006). Les génisses dans un état affectif plus positif grâce à la diversification de leur environnement (congénères et parcs d'élevage changés 16 fois en 2 mois) avaient moins de réactions de peur face à un évènement soudain (l'ouverture d'un parapluie), allaient manger plus vite dans un environnement nouveau et montraient moins d'activité (locomotion) face à un prédateur (un chien) et plus de regards vers ce prédateur. Un biais positif d'attention envers le prédateur peut être supposé.

Chez l'animal, l'influence de l'expérience émotionnelle sur l'apprentissage a été confirmée par des tests comportementaux notamment chez les rongeurs. Par exemple, les souris les plus émotives (avec un rang social le plus bas) acquerraient plus rapidement une tâche de discrimination simultanée alors que les sujets les moins émotifs (avec un rang social le plus haut) étaient plus performants dans une tâche d'apprentissage spatial. Le comportement des animaux différait aussi face à un environnement nouveau en fonction de leur rang social (Aubert, 2001). De la même façon, des rats dans un état affectif très négatif ont tendance à avoir des performances supérieures aux rats témoins dans les tests de conditionnement (type Pavlovien) et des performances très inférieures dans les tests d'apprentissage complexes tels que les tests d'apprentissage spatiaux (Sandi and Pinelo-Nava, 2007).

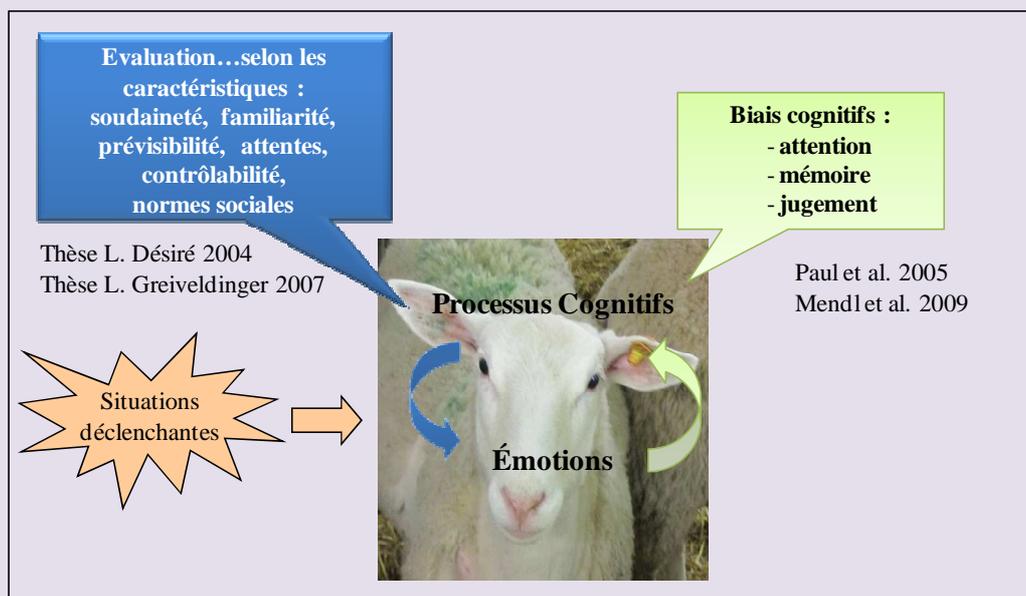
Chez l'animal, quelques études récentes ont permis de mettre en place des tests mettant en évidence cette influence de l'expérience émotionnelle sur la cognition tout en s'affranchissant du rapport verbal. Ainsi, Harding et al. (2004) mettent en place un test de discrimination permettant la mise en évidence des biais de jugements similaires à ceux des humains en s'affranchissant du rapport verbal. Ce test a été réalisé à l'origine sur des rats. La moitié des

animaux est d'abord entraînée à réaliser un test opérant de discrimination entre un son d'une fréquence de 2 kHz signalant un événement positif (de la nourriture) et un son d'une fréquence de 4 kHz signalant un événement négatif (l'absence de nourriture et un bruit désagréable). L'autre moitié des animaux apprend la consigne inverse : un son d'une fréquence de 2 kHz signalant un événement positif et un son d'une fréquence de 4 kHz signalant un événement négatif. Pour obtenir la nourriture de l'évènement positif, l'animal doit avoir une réponse comportementale particulière (presser un levier) et pour stopper le bruit désagréable de l'évènement négatif, il doit avoir une autre réponse comportementale particulière (ne pas presser le levier). L'animal associe donc une fréquence à un événement particulier (positif ou négatif) et une réponse comportementale opérante particulière (presser un levier ou ne pas presser un levier). Lorsque l'animal a appris cette association, il est exposé à des événements ambigus : des sons de fréquences intermédiaires à celles apprises (2.5, 3 et 3.5 kHz) qui sont non récompensés alimentaires. La réponse comportementale de l'animal est alors relevée. L'hypothèse est que les animaux dans un état affectif négatif vont interpréter ces événements ambigus comme des événements négatifs c'est-à-dire qu'ils opteront pour la réponse comportementale opérante négative : « ne pas presser le levier ». Ces animaux auraient donc un biais de jugement négatif c'est-à-dire un jugement pessimiste (« pessimistic-like judgment »). A l'inverse, les animaux dans un état affectif positif vont interpréter ces événements ambigus comme des événements positifs c'est-à-dire qu'ils opteront pour la réponse comportementale opérante positive : « presser le levier ». Ces animaux auraient donc un biais de jugement positif c'est-à-dire un jugement optimiste (« optimistic-like judgment »). Lors de cette expérimentation, Harding et al. (2004) exposent leurs rats à un environnement imprévisible connu pour induire un état affectif négatif (Willner, 1997). Ces rats montrent alors un biais de jugement négatif comparés aux rats témoins. De la même façon, Brydges et al. (2010) ont mis en évidence que des rats laissés dans un milieu appauvri montrent un biais de jugement négatif alors que des rats dont le milieu a été enrichi montrent un biais de jugement positif ou « optimisme ».

Depuis, des tests opérants de discrimination basés sur celui de Harding et al. (2004) ont permis de mettre en évidence des biais de jugement chez d'autres espèces que les rongeurs, comme les chiens, les singes, les oiseaux, les ovins ou encore les abeilles (revue de Mendl *et al.*, 2009). Ces tests peuvent utiliser d'autres signaux sensoriels que le son comme l'odeur ou le visuel pour discriminer la situation positive de la situation négative mais la réponse de l'animal au signal est toujours une réponse active c'est-à-dire une réponse permettant de mettre en évidence son choix (decision-making). Par exemple, des étourneaux ont été

entraînés à discriminer la situation positive (accès à de la nourriture savoureuse) de la situation négative (accès à de la nourriture non savoureuse) par un stimulus visuel (boîtes en carton blanc *vs.* en carton gris foncé) et le choix de l'animal se manifeste par un déplacement de type go/ no-go (Bateson and Matheson, 2007). De la même façon, d'autres étourneaux ont été entraînés à discriminer la situation positive (accès direct à la nourriture) de la situation négative (accès retardé à la nourriture) par un stimulus temporel et visuel (2 s *vs.* 10 s d'allumage d'une lampe) et le choix de l'animal se manifeste par un coup de bec (Matheson *et al.*, 2008). Ces études ont montré que l'enrichissement de l'environnement (cages plus larges avec possibilité de baignoire, perchoirs et substrat à fouiller) induit un jugement « optimiste » (Matheson *et al.*, 2008) alors que la perte du milieu enrichi induit un jugement « pessimiste » (Bateson and Matheson, 2007). Des abeilles ont été entraînées à discriminer la situation positive (accès à du miel) de la situation négative (accès à du poison) par un stimulus olfactif (des mélanges précis d'hexanol et d'octanone : 1:9 *vs.* 9:1) et le choix de l'animal se manifeste par une extension ou un retrait du proboscis (langue). Suite à cet entraînement, les abeilles secouées vigoureusement (stress aigu de simulation d'une attaque de prédateur) semblent manifester un biais cognitif « pessimiste » lorsqu'elles sont mises dans des situations ambiguës (des mélanges précis d'hexanol et d'octanone entre 1:9 et 9:1) par rapport aux abeilles témoins (Bateson *et al.*, 2011). Au niveau des animaux de ferme, encore peu d'études s'intéressent à ces biais cognitifs. Cependant, des résultats similaires ont été trouvés chez les ovins (Doyle *et al.*, 2009). Des brebis ont été entraînées à discriminer la situation positive (accès à de l'aliment) de la situation négative (pas d'aliment et présentation d'un chien) par un stimulus visuel (une localisation de seau alimentaire) et le choix de l'animal se manifeste par un déplacement de type go/ no-go. Suite à cet entraînement, les brebis soumises à 6 heures de contention et d'isolement pendant trois jours consécutifs puis relâchées juste avant le test, semblent manifester un biais cognitif « optimiste » lorsqu'elles sont mises dans des situations ambiguës (des localisations du seau intermédiaires à celles apprises) par rapport aux brebis témoins (restées en groupe).

Sur la base de travaux développés initialement en psychologie, il est montré depuis quelques années que des émotions peuvent en retour influencer les processus cognitifs et ce d'autant plus durablement que l'expérience émotionnelle persiste (revue de Paul *et al.*, 2005). Cette modification par l'expérience émotionnelle des processus cognitifs impliqués dans l'attention, le jugement et l'apprentissage est appelée biais cognitif. La perception de l'environnement peut donc être modulée de manière plus ou moins persistante par l'état émotionnel de l'animal lequel est maintenu en retour par ces biais cognitifs. C'est pourquoi, nous nous sommes focalisés dans le cadre de cette thèse sur l'étude des liens intimes entre fonctions cognitives et processus émotionnelles.



## 5. Un exemple d'état affectif persistant influençant les fonctions cognitives : le stress

Un état de stress correspond à un état affectif négatif persistant résultant d'une accumulation d'émotions négatives et affectant l'état de bien-être de l'individu.

### 5.1 Notion de « stress »

La notion de « stress » est définie, en 1936 par Selye, comme la réponse non spécifique de l'organisme face à une agression : le « stress » ayant pour conséquence la mise en place d'un Syndrome Général d'Adaptation (Selye, 1946). Le « stress » fait alors référence à l'activation du système neuro-végétatif, la libération de catécholamines (adrénaline et noradrénaline), et de l'axe corticotrope, entraînant notamment la libération de glucocorticoïdes (le cortisol principalement) en réponse à des perturbations physiques (Cannon, 1914; Selye, 1946). Plus

tard, les réponses comportementales sont incluses dans cette définition. Le « stress » correspond ainsi à l'état dans lequel l'animal se trouve lorsque les ajustements physiologiques et comportementaux qu'il doit fournir pour s'adapter à son environnement sont trop importants (Fraser et al., 1975; Dantzer and Mormede, 1978). Enfin, Terlouw (2005) définit le « stress » comme l'ensemble des réactions physiologiques et comportementales d'origine émotionnelle d'un individu face à une situation qu'il perçoit comme potentiellement menaçante.

Dans ces travaux de thèse, un stress aigu correspond à une émotion négative face à une situation perçue comme potentiellement menaçante (réaction brève) et un état de stress chronique correspond à un état affectif négatif persistant affectant l'état de bien-être de l'animal (Veissier and Boissy, 2007).

## **5.2 L'état de stress chez l'homme**

Chez l'homme, l'état de stress peut induire des effets psychologiques négatifs appelés troubles anxio-dépressifs comme des biais cognitifs négatifs d'attention (Mathews and Macleod, 1994), de mémoire (Paul *et al.*, 2005) ou de jugement (Wright and Bower, 1992). L'état de stress chronique peut également induire des effets indésirables sur la santé comme une détérioration du système immunitaire (Segerstrom and Miller, 2004; Miller, 2010), une défaillance gastro-intestinale ou des problèmes locomoteurs (O'Brien et al., 2008; Hausberger et al., 2009). Deux exemples d'état de stress chronique défini comme état affectif négatif persistant peuvent être cités chez l'homme: le stress chronique au travail<sup>2</sup> et le stress post-traumatique. Le trouble de stress post-traumatique désigne un type de trouble anxieux sévère qui se manifeste à la suite d'une expérience vécue comme traumatisante (Layton and Krikorian, 2002). Le trouble de stress post-traumatique est une réaction psychologique persistante consécutive à une situation durant laquelle l'intégrité physique et/ou psychologique du patient a été menacée ou effectivement atteinte (notamment accident grave, mort violente, viol, agression, maladie grave, guerre ou encore attentat). La réaction immédiate à l'événement aura été traduite par une peur intense, par un sentiment d'impuissance ou par un sentiment d'horreur. Cet état affectif négatif persistant peut entraîner un biais de mémoire comme par exemple l'intensification de la mémoire de l'évènement traumatisant et la

---

<sup>2</sup> Le gouvernement français a défini l'état de stress chronique comme « une réponse de notre corps à une situation de stress qui s'inscrit dans la durée ». <http://www.travailler-mieux.gouv.fr/IMG/pdf/livreblancstress.pdf>  
Livret blanc, Stress au travail 2008

détérioration de la mémoire pour les autres évènements (Layton and Krikorian, 2002; exemple des soldats: Engelhard et al., 2008).

Chez l'homme, les biais cognitifs dus à un état de stress sont fréquemment mis en évidence par des tests faisant intervenir le langage. Cependant, lorsque le rapport verbal est impossible, l'évaluation de l'état affectif persistant chez l'homme peut se faire par l'observation et la compréhension du comportement général et des expressions faciales (revue de Adams and Oliver, 2011).

### **5.3 Les modèles de stress chronique chez l'animal**

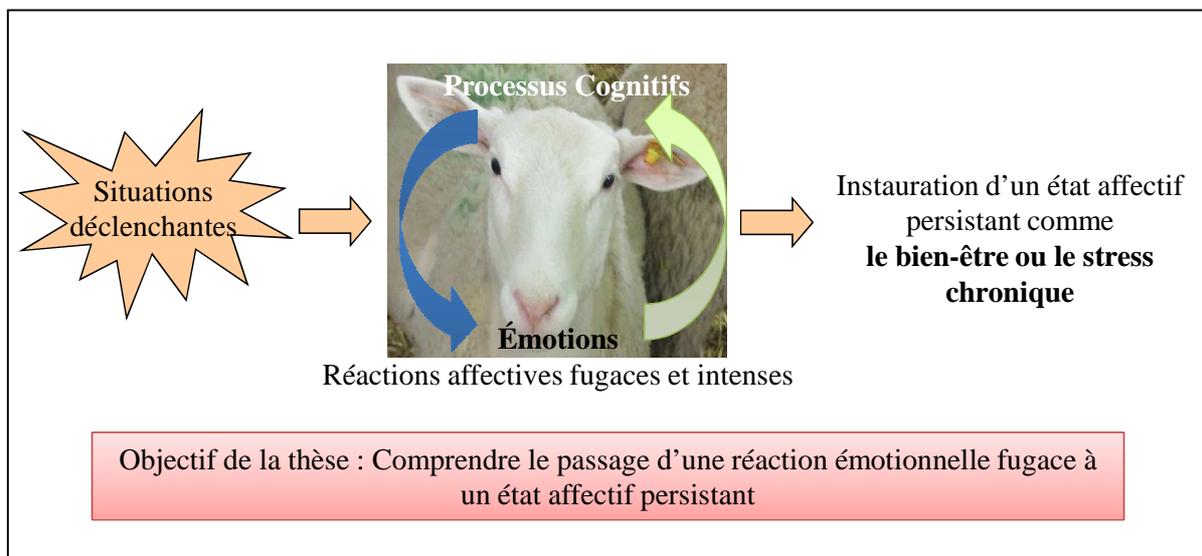
Chez les animaux, les modèles de stress chronique modéré induits par des expositions répétées à des évènements imprévisibles ont été développés chez les rongeurs afin de modéliser les réactions de personnes stressées (Willner et al., 1992; Willner, 1997; Belzung and Griebel, 2001). Ces rongeurs (rats ou souris) en état de stress chronique présentaient une altération de leurs capacités à juger et à prendre des décisions (Pardon et al., 2000; Harding et al., 2004). Le lien entre état affectif persistant et cognition a pu être abordé chez les animaux de laboratoire. Cependant, peu d'études sur ce lien entre état de stress chronique et cognition ont été réalisées sur les animaux d'élevage. Broom (1987) a montré que des truies dans un état affectif négatif (isolées et confinées) étaient moins réactives aux évènements extérieurs que des truies témoins (maintenues en groupe). Il a appelé cette altération, apathie. A l'inverse, Boissy et al. (2001) ont montré une hyperréactivité aux évènements soudains et à la présence d'un prédateur (un chien) chez des veaux stressés chroniquement (modifications physique et sociale de l'environnement des animaux une fois par semaine sur 14 semaines au total). Une des hypothèses possibles de ces études est que l'état de stress chronique conduit dans certains cas à une apathie et dans d'autres cas à une exacerbation de la réactivité émotionnelle (ou hyperréactivité). Une apathie se développerait lorsque l'animal n'a aucun moyen d'action sur les évènements négatifs alors qu'une hyperréactivité résulterait du fait que l'animal soit parvenu à les contrôler (Dantzer, 1989; Boissy et al., 2007a).

Un état de stress chronique correspond à un état affectif négatif persistant pouvant résulter d'une accumulation d'émotions négatives et affectant l'état de bien-être de l'individu. Peu d'études sur le lien entre état de stress chronique et cognition ont été réalisées sur les animaux d'élevage. Il est donc important de comprendre comment l'accumulation d'émotions peut modifier de manière durable les processus cognitifs, et par voie de conséquence instaurer un état affectif persistant qui tend à s'auto-entretenir.

## 6. Les objectifs de la thèse

Dans cette dernière partie, nous présentons le plan de la thèse dont l'objectif principal est d'explorer les relations entre émotions et cognition chez l'animal d'élevage. Il s'agit plus précisément d'étudier comment l'accumulation d'émotions peut modifier de manière durable les processus cognitifs de l'animal, qui déterminent sa propre représentation de son environnement. Par voie de conséquence, une telle modification serait à l'origine de l'instauration d'un état affectif persistant de bien-être ou au contraire de stress selon la valence affective des biais cognitifs.

Les relations que l'animal entretient avec son environnement, peuvent être biaisées par sa propre expérience émotionnelle. Une émotion positive induirait plutôt un jugement optimiste et une émotion négative plutôt une vision pessimiste. Le pessimisme de l'animal, qui persiste si son expérience négative se prolonge, contribue à exacerber son mal-être induit par les contraintes environnementales. Au contraire, un enrichissement du milieu favoriserait une perception positive. La question du bien-être animal, état affectif persistant par définition, prend alors tout son sens, au delà de simples réactions émotionnelles fugaces.



Des biais cognitifs induits par l'état affectif ont été montrés chez les animaux de laboratoire (les modèles de stress chronique étant développés à des fins de cliniques humaines) (Harding

*et al.*, 2004), chez les abeilles (Bateson *et al.*, 2011) et les oiseaux (Bateson and Matheson, 2007; Matheson *et al.*, 2008; Salmeto *et al.*, 2011) mais assez peu chez les animaux de ferme.

La thèse réalisée sur ovins s'articule en trois chapitres :

- Dans le *Chapitre 1* (Article 1), nous avons recherché à définir et valider un modèle de stress chronique, basé sur l'accumulation d'émotions négatives induites par une exposition à long terme à des événements aversifs, imprévisibles et incontrôlables (Ladewig, 2000). Nous avons choisi ces événements aversifs parmi les événements pouvant avoir lieu en élevage afin de simuler des conditions réelles. Cependant, nous n'avons pas choisi d'événements nociceptifs comme la caudectomie afin de ne pas complexifier l'approche en intégrant le concept de douleur qui en soit nécessite un important investissement méthodologique et conceptuel (Le Neindre *et al.*, 2009). L'effet de ce modèle de stress chronique sur la réactivité émotionnelle des animaux a alors été testé.
- Le *Chapitre 2* (Articles 2 & 3) regroupe les travaux qui portent sur les conséquences de notre modèle de stress chronique sur les fonctions cognitives de jugement, d'apprentissage et de discrimination.
- Dans le *Chapitre 3* (Articles 4 & 5), nous explorons le concept « d'enrichissement cognitif » à la lumière des relations entre émotions et cognition (Boissy *et al.*, 2007b). Nous avons étudié la réduction des effets négatifs induits par le stress chronique par l'induction d'expériences émotionnelles positives.



---

## MÉTHODOLOGIE GÉNÉRALE

---



## **1. Le modèle animal**

### **1.1 Choix du mouton comme espèce modèle**

Le mouton (*Ovis aries*) a été choisi comme espèce modèle, car le fait qu'il est facile à manipuler (format, poids,...) et que son élevage est de faible coût permet d'engager des études satisfaisant aux exigences statistiques. En raison notamment de cette commodité, plusieurs équipes ont engagé depuis une dizaine d'années des études analytiques montrant que les ovins utilisent les mêmes caractéristiques élémentaires que l'homme pour évaluer le sens d'un évènement, telles que son caractère soudain, familier et prévisible, sa valence affective, sa correspondance aux attentes de l'individu et les moyens d'action de l'individu sur cet évènement. Des expressions comportementales du mouton sont constantes et cohérentes selon ces caractéristiques élémentaires de l'évènement (Désiré et al., 2004; Désiré et al., 2006; Greiveldinger et al., 2007; Greiveldinger et al., 2011) et des expressions fines des postures d'oreilles ont été mises en évidence à l'image des expressions faciales d'émotions chez l'homme (Désiré et al., 2006; Reefmann et al., 2009a; Reefmann et al., 2009b). Des tests standardisés ont été alors développés chez cette espèce pour induire des émotions particulières en prenant en compte la physiologie et le comportement de l'animal (Boissy et al., 2007b; Dwyer and Bi, 2009; Reefmann et al., 2009a; Reefmann et al., 2009b). Par ailleurs, le mouton de par entre autres ses fonctions grégaires possède des capacités d'apprentissage et de mémoire significatives (Dwyer and Bi, 2009; Sanchez-Andrade and Kendrick, 2009). Par exemple, un mouton est capable de reconnaître un congénère familier sur photographie seulement, de mémoriser plus de 50 individus différents et cela pendant au moins 2 ans (Kendrick et al., 2001). Le mouton est donc une espèce sociale qui possède des compétences émotionnelles (Désiré et al., 2004 ; Greiveldinger et al., 2011) et cognitives (Ferreira et al., 2004, Kendrick et al., 2001).

### **1.2 Animaux expérimentaux**

Toutes nos expériences ont été conduites chez des agnelles Romane âgées de 4-5 mois et élevées sous la mère durant les deux premiers mois de vie. Toutes les agnelles sont issues des Unités Expérimentales de l'INRA de Theix (UE Ruminants de Theix - 63, Article 4, n= 48) ou de Bourges (UE La Sapinière - 18, articles 1 à 3 et 5, n= 93). Parmi les races de moutons disponibles, la race Romane (ex INRA 401), issue du croisement d'une race prolifique (Romanov) et d'une race bouchère (Berrichon du Cher), a été choisie pour sa facilité

d'approche et de manipulation. Les femelles ont été préférées aux mâles car elles sont plus faciles à élever en groupe et à manipuler pour l'expérimentateur. De plus, les femelles semblent exprimer plus fortement leurs réponses émotionnelles que les mâles (Boissy et al., 2005), ce qui pouvait faciliter nos observations. Les femelles sont également gardées sur plusieurs années à des fins de renouvellement des troupeaux offrant ainsi la possibilité d'explorer les effets à long terme. Enfin, les agnelles ont été testées jeunes afin de contrôler leur expérience émotionnelle et d'en limiter l'influence sur leurs réponses émotionnelles et donc de réduire la variabilité interindividuelle dans nos expérimentations. A l'issue des nos expérimentations, la plupart des femelles étaient réintégrées dans le circuit de renouvellement de l'élevage étant donnée la préservation de leur intégrité à la fois physique et mentale.

### **1.3 Mode d'élevage**

L'élevage des agnelles de 4-5 mois et toutes les expériences de la thèse ont été réalisées à l'unité expérimentale des Ruminants de Theix (63). Les agnelles ont été élevées sur sol paillé dans un bâtiment conditionné à une température moyenne de 14°C et éclairé de 7h30 à 19h30 (80 Lux). Pour les expérimentations valorisées par les articles 1 à 4, les agnelles ont été réparties sur 4 parcs d'élevage de 4,50 x 4,50 m comprenant chacun un lot de 12 animaux (soit 1,69 m<sup>2</sup> par agnelle; Figure 1). Pour l'expérimentation dont l'article 5 est issu, les agnelles ont été réparties sur 9 parcs d'élevage de 1,50 x 4,50 m comprenant chacun un lot de 5 animaux (soit 1,35 m<sup>2</sup> par agnelle). Les lots expérimentaux ont été équilibrés en fonction de la paternité et du poids des agnelles (articles 1 à 4) ainsi qu'en fonction de leur réactivité au sevrage pour l'article 5 (annexe 1). L'alimentation par agnelle se composait de 0.75 kg de concentrés distribués à 8h00, complétée par 0.27 kg de foin et 0.25 kg de bouchons de paille distribués en fin de journée. Pendant les tests de comportement où l'aliment avait un rôle de récompense, le concentré distribué le matin était réduit de moitié et les animaux recevaient le reste à la fin du test afin de les garder en appétit. Chaque lot d'agnelles a été placé dans son parc d'élevage au moins une semaine avant le début de la phase d'habituation aux manipulations afin qu'elles puissent s'habituer au bâtiment.

### **1.4 Habituation aux manipulations**

Quelle que soit l'expérimentation, les agnelles ont été soumises à une phase d'habituation aux manipulations de deux semaines avant les tests comportementaux afin de réduire au maximum les réponses dues aux manipulations nécessaires à l'expérimentation. Pendant la première semaine, les agnelles ont été habituées à la présence de l'homme : un des

expérimentateurs passait au moins une heure par jour dans chacun des parcs. Il se laissait approcher par les agnelles et pouvait avoir des contacts avec elles. La deuxième semaine, les agnelles ont été habituées en groupe aux prises de sang et au port de la ceinture cardiaque dans leur parc d'élevage. Pour l'habitué aux prises de sang, toutes les agnelles ont été contenues puis piquées avec une aiguille (sans prélèvement de sang) quatre fois dans la semaine. Pour l'habitué au port de la ceinture cardiaque, les agnelles ont été équipées de la ceinture élastique autour du thorax pendant une heure, quatre fois dans la semaine. A la fin de ces deux semaines, les agnelles ont été numérotées à la peinture pour animaux pour faciliter leur identification et ont été tondues au niveau du thorax pour permettre le contact entre la peau et les électrodes de surface lors de l'enregistrement de l'activité cardiaque. Suite à cette phase d'habitué aux manipulations, les agnelles ont été soumises à des tests de réactivité émotionnelle et de leurs fonctions cognitives.



Figure 1. Lot de douze agnelles de race Romane dans leur parc d'élevage

## **2. Tests de réactivité émotionnelle**

Pour évaluer la réactivité émotionnelle des animaux, nous avons utilisé trois tests standardisés (réactivité à la nouveauté, la soudaineté et l'homme) basés sur des tests développés et validés au sein de l'équipe ACS (Désiré et al., 2004; Tallet et al., 2005).

Les tests de réactivité à la nouveauté et à la soudaineté ont lieu dans le même dispositif (Figure 2) constitué d'un parc d'attente (1.5 m<sup>2</sup>) et d'un parc de test (4.5 m<sup>2</sup>). Une porte coulissante permet le passage du parc d'attente au parc de test. Le parc de test est composé d'un système automatique de distribution d'aliments (25 g d'orge ou de concentrés) dans une auge en face de la porte d'entrée. Le test de réactivité à l'homme a lieu dans les parcs d'élevage des animaux. Tous les tests de réactivité sont filmés par des caméras surplombant les parcs.

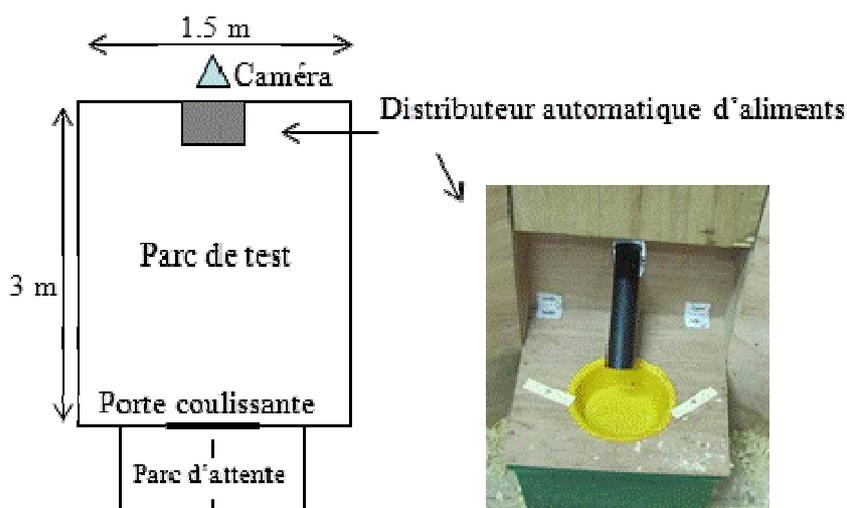


Figure 2. Dispositif des tests de réactivité à la nouveauté et à la soudaineté

## 2.1 Test de nouveauté

Avant d'être testés, les animaux ont été habitués au dispositif une fois par jour pendant sept jours. Pendant les deux premiers jours, les agnelles étaient placées par groupe de trois dans le parc de test et pouvaient l'explorer librement (durée : 3 min). Puis pendant trois jours, les agnelles étaient placées individuellement dans le parc de test (durée : 90 s). Pendant ces cinq jours la nourriture était distribuée *ad libitum* dans l'auge. Enfin, pendant les deux jours suivants les agnelles ont été placées individuellement dans le parc de test (durée : 90 s) mais la nourriture était limitée par le distributeur automatique (25g). La nourriture était soit distribuée 60 s après l'entrée des animaux dans le parc de test (article 4), soit déjà distribuée dans l'auge à l'entrée des animaux (articles 1 à 3 et 5).

Le jour du test, les animaux réalisaient individuellement deux passages dans le parc de test avec de la nourriture distribuée automatiquement (durée : 90 s par passage). Le 1<sup>er</sup> passage était identique aux derniers jours d'habituance. Lors du 2<sup>ème</sup> passage, un objet nouveau (un cône de signalisation, Figure 3a.) était placé sur le parcours d'accès à l'auge.

## 2.2 Test de soudaineté

Le lendemain du test de réactivité à la nouveauté, les animaux ont réalisé un passage individuel dans le parc de test avec de la nourriture distribuée automatiquement (durée : 90 s). Lorsque l'animal s'était alimenté au moins quinze secondes, un panneau amovible (Figure 3b) tombait juste devant ses yeux (4 s après le début de l'alimentation).

### 2.3 Test de l'homme

Une semaine après le test de réactivité à la soudaineté, les agnelles ont été soumises à un test en groupe de réactivité à l'homme (Figure 3c). Un homme familier (un des expérimentateurs) entrait calmement dans chacun des parcs d'élevage et s'asseyait pendant 10 min à l'opposé de l'entrée. Des scans de positions de chacun des animaux par rapport à l'homme ont été réalisés toutes les 30 s. Une zone proche de l'homme a été définie à moins d'un mètre autour de celui-ci.

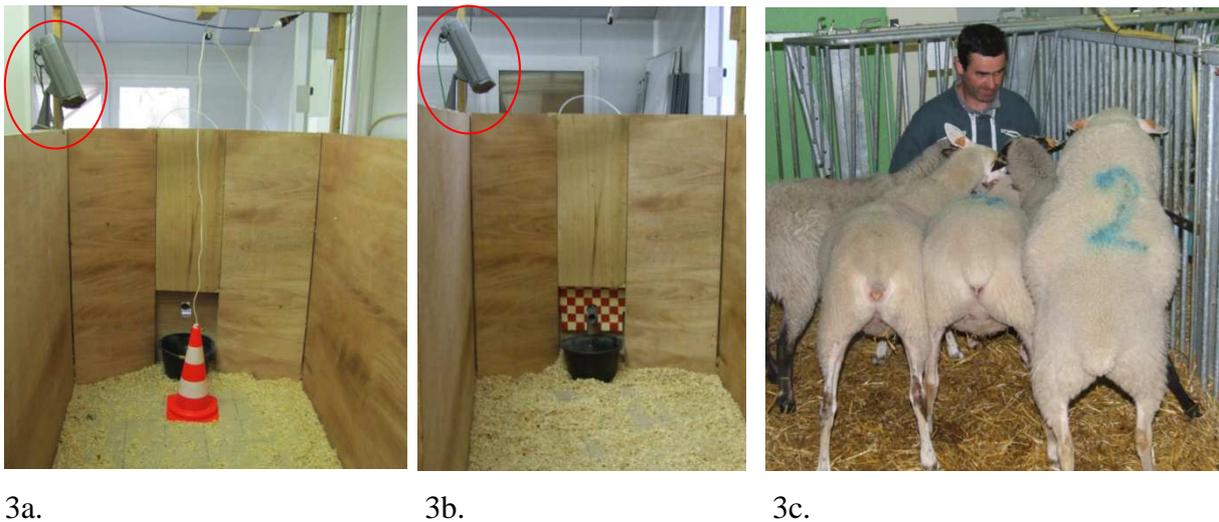


Figure 3. Illustration des tests de réactivité utilisés. 3a : nouveauté, 3b : soudaineté, 3c homme

### 2.4 Mesures comportementales et physiologiques

Lors des tests de réactivité à la nouveauté et à la soudaineté, trois types de variables étaient mesurées : des variables comportementales, une variable cardiaque et une variable hormonale. Les variables comportementales étaient directement relevées (bêlements) ou enregistrées sur support vidéo à l'aide des caméras (Figures 3a et 3b). Les films étaient ensuite dépouillés au sein de l'atelier d'analyse comportementale du laboratoire à l'aide du logiciel « The Observer v. 5.0 » (Noldus, Pays Bas) suivant un éthogramme préétabli. Celui-ci comprenait les événements suivants : le nombre de zones du parc traversées, les directions du regard (regarde l'auge, regarde la porte), les flairages (flaire l'auge, flaire la porte), l'ingestion d'aliment, les sursauts, la vigilance, les sauts.

La fréquence cardiaque des animaux était également enregistrée à l'aide de cardiofréquencemètres « Polar Vantage NV » (Polar Electro, Anglet, France) conçus pour les sportifs. Avant les tests, la ceinture élastique portant à la fois l'émetteur et le récepteur du cardiofréquencemètre était fixée autour de la cage thoracique des animaux préalablement

tondus. Les fichiers enregistrés dans le récepteur étaient ultérieurement transférés sur ordinateur et dépouillés à l'aide du logiciel Polar Pro Trainer 5 (Polar Electro, Oulu, Finlande).

Vingt minutes après la fin de chacun des deux tests individuels, une prise de sang était effectuée à la jugulaire de l'animal sur tube EDTA (Acide Ethylène Diamine Tétraacétique, un anticoagulant). Les tubes étaient ensuite centrifugés (3 000 tours/min pendant 10 min. à 4°C) et le plasma conservé à -20°C jusqu'à la réalisation du dosage de cortisol plasmatique. La concentration plasmatique de cortisol était réalisée par un dosage RIA selon la méthode décrite par Boissy et Bouissou (1994).

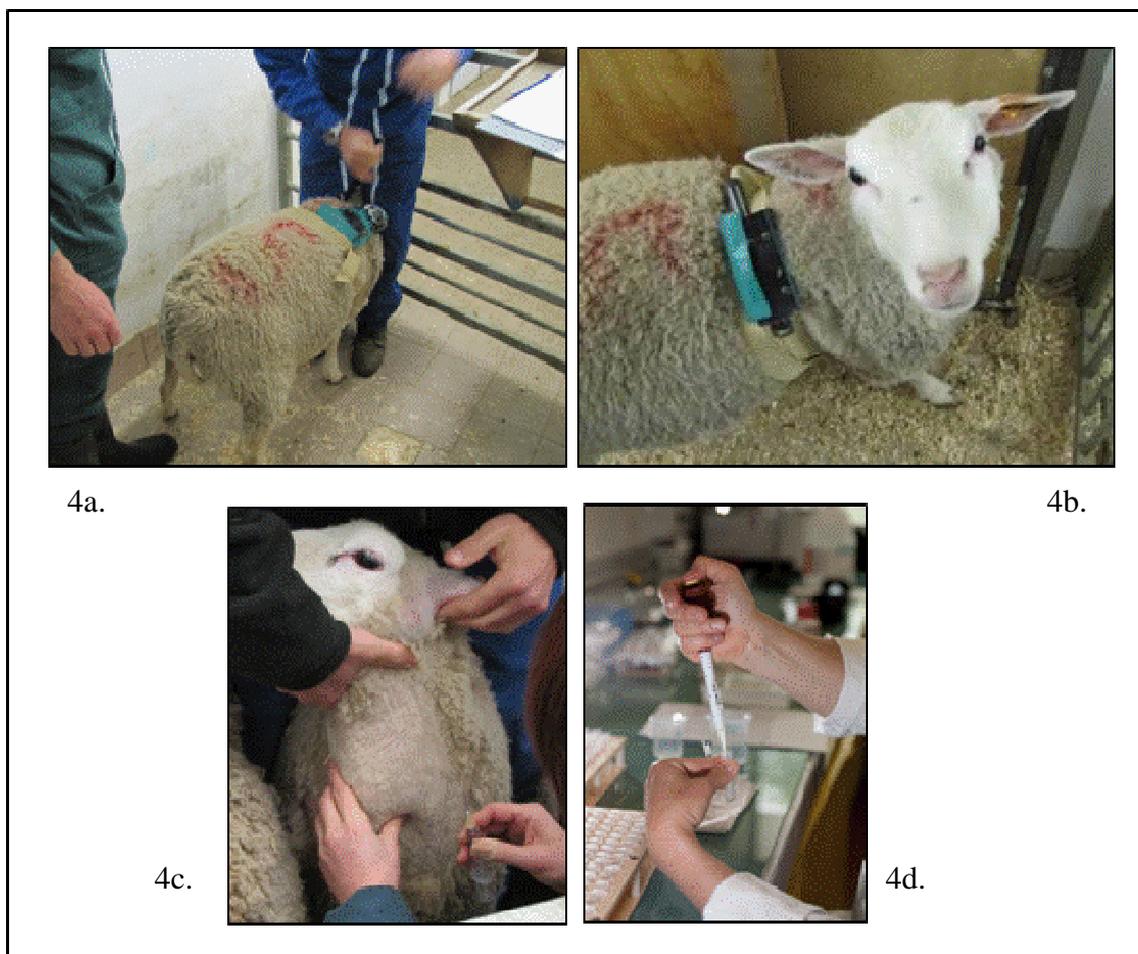


Figure 4. Méthodes utilisées pour les mesures physiologiques. 4a : équipement d'une agnelle avec le système Polar, 4b : agnelle équipée du système Polar juste avant le test, 4c : prise de sang à la jugulaire, 4d : une des étapes du dosage du cortisol.

### **3. Tests d'évaluation de biais dans les fonctions cognitives**

Pour évaluer les modifications éventuelles dans les fonctions cognitives des animaux nous avons utilisé deux tests inspirés de la littérature et déjà validés chez les ovins : un test de biais de jugement (Burman et al., 2008; Doyle et al., 2009) et un test d'apprentissage (Ferreira *et al.*, 2004).

#### **3.1 Test de biais de jugement**

Ce test a été utilisé pour évaluer la manière dont l'animal perçoit des événements ambigus. Le dispositif (Figure 5) est un parc de test de 13.5 m<sup>2</sup> composé de panneaux de bois pleins de 1.5 m de haut. Les agnelles passent du parc d'attente au parc de test par une porte guillotine. Des glissières en bois (trappes) ont été construites sur les cotés droit et gauche au fond du parc de test afin de pouvoir exposer si nécessaire les animaux à un stimulus démontré par ailleurs comme étant aversif (Doyle et al., 2011) : une soufflerie automatique. Le protocole est constitué de deux phases : 1/ une phase d'apprentissage à approcher ou à éviter un objet, réalisée avant l'exposition au traitement aversif, puis 2/ une phase de test proprement dit, réalisée à l'issue de la période d'application du traitement aversif. Durant toute la durée du traitement aversif (au moins six semaines), l'apprentissage est entretenu à raison d'une séance de rappel hebdomadaire.

##### **3.1.1 Phase 1 : Habituation et entraînement**

Pendant 3 jours, les agnelles sont habituées quotidiennement à entrer dans le parc de test par paire et à recevoir une récompense alimentaire (du concentré) placée dans un seau au fond du parc (durée : 3 min). Ensuite pendant deux jours (5 essais consécutifs de 25 s par jour), elles sont habituées individuellement à recevoir une récompense alimentaire (25 g de concentrés) dans le seau au fond du parc. Suite à cette phase d'habituation, les agnelles sont entraînées individuellement à apprendre un test opérant de type go/no go : elles doivent différencier spatialement deux positions (droite vs. gauche) du seau au fond du parc de test.

Localisé en position négative, le seau contient du concentré rendu inaccessible par une grille afin d'éviter que le choix ne se fasse qu'à partir d'indices olfactifs. Ce seau est associé au déclenchement de la soufflerie après ouverture de la trappe. Localisé en position positive, le même seau contient une récompense alimentaire accessible (25 g de concentrés).

Afin d'éviter une influence non contrôlée d'une éventuelle latéralité, les agnelles de chacun des lots ont été réparties au hasard dans deux groupes de même effectif :

- un groupe qui a appris que le seau renforcé négativement est placé au fond du parc à droite et celui renforcé positivement au fond du parc à gauche,
- l'autre groupe qui a appris que le seau renforcé négativement est placé à gauche et celui renforcé positivement à droite.

L'entraînement des animaux dure en moyenne une vingtaine de jours. Pendant sept jours, les animaux sont entraînés quotidiennement à aller manger dans le seau en position positive : cinq essais consécutifs de 25 s sont réalisés. Puis pendant environ les quinze jours suivants, les agnelles sont entraînées quotidiennement à aller manger dans le seau s'il est en position positive ou à ne pas approcher le seau s'il est en position négative. Cinq essais consécutifs de 25 s sont alors réalisés : les quatre premiers essais avec le seau placé au hasard en position négative ou positive et le 5<sup>ème</sup> essai avec le seau toujours placé en position positive. Nous voulions ainsi que les animaux restent sur une récompense à la fin du test afin de ne pas perdre leur motivation. Concernant la position négative, si l'agnelle approchait le seau à moins de 30 cm, nous ouvrons la trappe et la soufflerie se déclenchait.

Les agnelles étaient dites « entraînées » si elles approchaient le seau dès qu'il était en position positive et évitaient de s'approcher du seau dès qu'il était en position négative sur deux sessions consécutives de 5 essais. Environ 70% des animaux sur toutes les expérimentations ont appris cette consigne et ont pu donc être soumis au test du biais de jugement.

### 3.1.2 Phase 2 : Test de biais de jugement et mesures comportementales relevées

Le test du biais de jugement consistait à exposer les agnelles à 5 positions de seau (Figure 5) : les 2 positions apprises (positive et négative) et 3 positions ambiguës placées entre les 2 positions apprises (M+ : proche de la position positive, M : au milieu, M- : proche de la position négative). Les mesures comportementales, directement relevées pendant le test, étaient les vocalisations, les latences d'approche du seau et les réponses de l'animal (approche ou évitement). Nous avons définis que l'agnelle pouvait avoir soit une réponse d'approche si elle atteignait le seau à moins de 30 cm, soit une réponse d'évitement si elle restait à plus de 30 cm du seau.

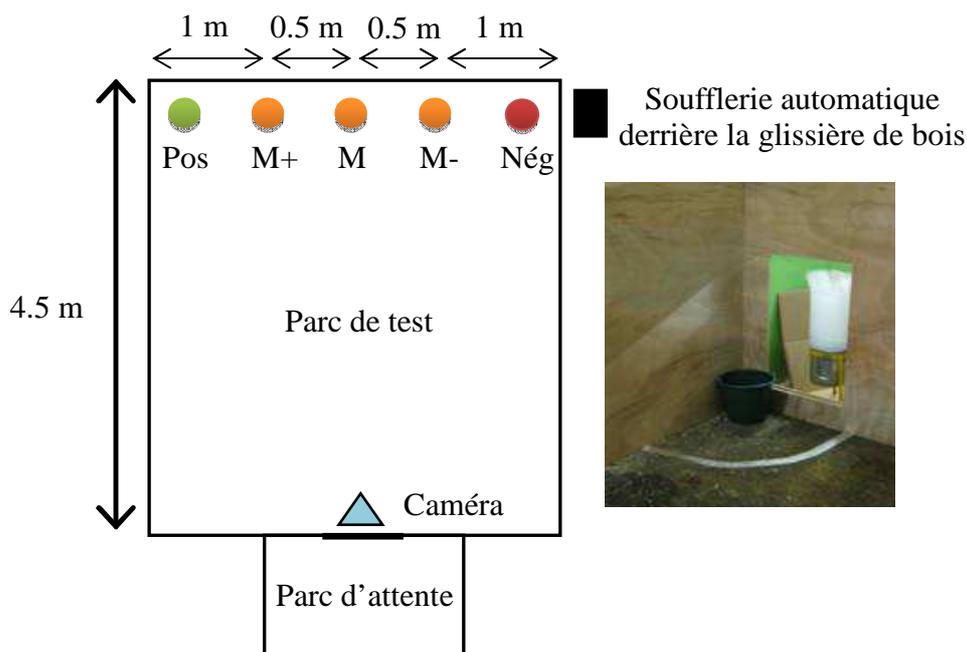


Figure 5. Dispositif du test du biais pour une agnelle ayant appris que le seau renforcé négativement (Nég) était placé à droite et celui renforcé positivement (Pos) à gauche.

### 3.2 Test d'apprentissage

#### 3.2.1 Habituation et entraînement

Ce test a été réalisé à l'issue de la période d'application du traitement aversif. Le dispositif du test d'apprentissage était un parc en Y (Figure 6) composé de panneaux de bois de 1.5 m de haut et d'une porte guillotine permettant le passage des agnelles du parc d'attente au parc de test. Chacune des deux branches disposait d'une fenêtre grillagée permettant à l'animal de percevoir la branche opposée. Deux stimuli visuels ont été utilisés : un seau noir rayé verticalement et un seau jaune rayé horizontalement. Ces deux seaux sont placés aléatoirement dans chaque branche du dispositif en Y.

Pendant trois jours les animaux ont été habitués par paires au dispositif avec de l'aliment posé à même le sol à l'emplacement des seaux. Ensuite, pendant six jours consécutifs, les agnelles ont été entraînées individuellement à différencier les deux stimuli visuels sur une session quotidienne de 5 essais consécutifs de 25 s. Les agnelles de chacun des lots ont été réparties au hasard dans deux groupes de même effectif :

- un groupe devait apprendre que le seau noir à rayures verticales était récompensé (25 g de concentrés) et le seau jaune à rayures horizontales était non récompensé (les concentrés étaient rendus inaccessibles pour l'animal par une grille de fer recouvrant le concentré)
- l'autre groupe devait apprendre les consignes inverses.

### 3.2.2 Mesures comportementales relevées

Les mesures comportementales, directement relevées pendant le test, étaient les vocalisations, les latences d'approche du seau (récompensé ou non récompensé) et le nombre de choix corrects par session. Le choix était défini comme correct lorsque l'agneille choisissait le seau récompensé et mangeait. Le choix était défini comme incorrect lorsque l'agneille choisissait le seau non récompensé (en mettant la tête à l'intérieur du seau) ou lorsqu'elle n'approchait aucun seau dans les 25 s du test. Si l'agneille faisait un choix incorrect, elle était sortie immédiatement du parc de test.

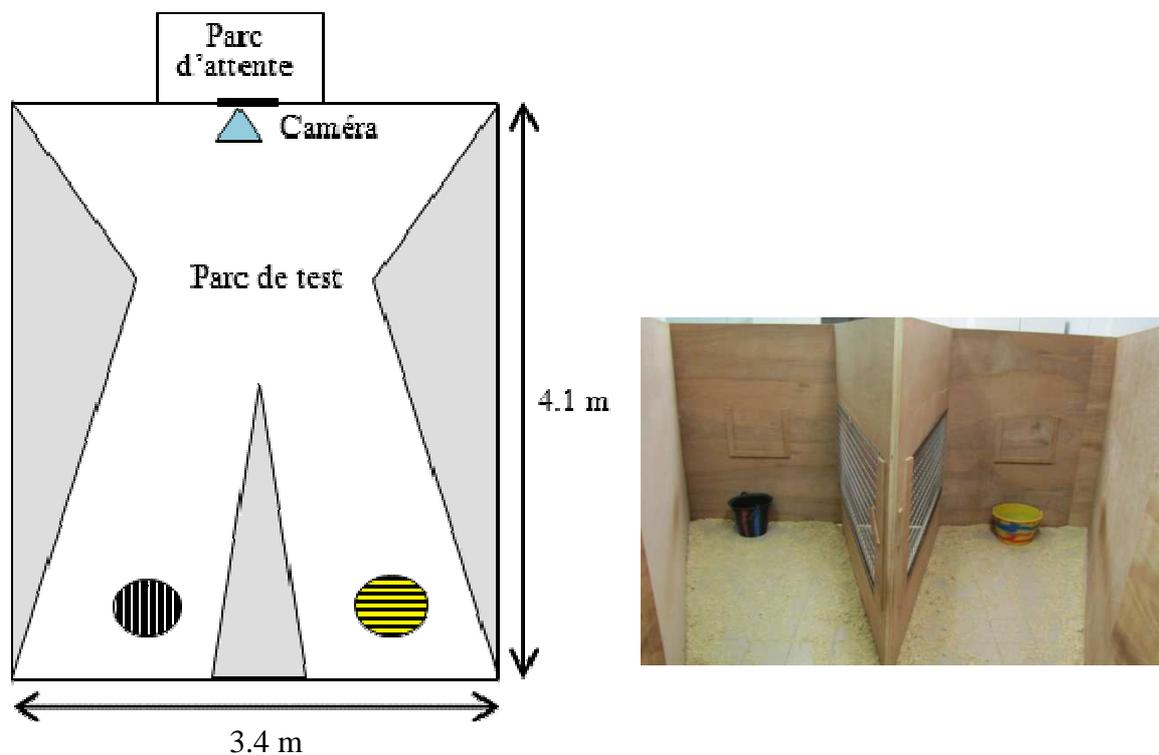


Figure 6. Dispositif du test d'apprentissage avec les deux stimuli visuels : le seau noir rayé verticalement et le seau jaune rayé horizontalement

---

**CHAPITRE 1 - MODÈLE DE STRESS CHRONIQUE ET EFFETS  
SUR LA RÉACTIVITÉ ÉMOTIONNELLE DES ANIMAUX**

---



## *Article 1*

### **Une exposition à long terme à des évènements aversifs, imprévisibles et incontrôlables altère la réactivité émotionnelle du mouton**

Alexandra Destrez, Véronique Deiss, Christine Leterrier, Xavier Boivin et Alain Boissy,  
2012.

*Animal*, accepté.

#### **1. Objectif**

En élevage, les animaux sont soumis de façon répétée à divers événements aversifs (tonte, contention, mélange d'animaux...) voire nociceptifs (castration, écornage...) pouvant contribuer à l'établissement d'un état de stress. Le stress chronique est défini comme un état affectif négatif persistant induit par une accumulation d'expériences émotionnelles négatives, lequel altère les interactions de l'individu avec son environnement physique et social. De nombreuses études ont examiné les effets immédiats et temporaires d'événements aversifs (communément appelés stress aigus) sur la réactivité émotionnelle des animaux d'élevage. Par contre, il existe peu d'informations sur les effets d'une répétition de ces événements (ou accumulation d'expériences négatives) sur une éventuelle modification persistante de la réactivité émotionnelle des animaux, ou les informations disponibles sont peu cohérentes entre elles. Dans cette expérimentation, nous avons pour but principal de construire et de valider un modèle de stress chronique sur ovins, basé sur l'accumulation d'émotions négatives induites par une exposition répétée à des événements aversifs intervenant de manière imprévisible et incontrôlable. Les perturbations comportementales et physiologiques liées au stress ne dépendent pas tant de l'intensité de la nocivité de la stimulation et de son impact physiologique mais de paramètres psychologiques spécifiques comme la nouveauté, la contrôlabilité ou l'imprévisibilité (Anisman and Matheson, 2005). L'effet de ce modèle de stress chronique sur la réactivité émotionnelle des animaux a été testé.

#### **2. Méthodes**

Vingt-quatre agnelles étaient soumises à divers événements aversifs pouvant avoir lieu en élevage pendant 6 semaines consécutives (groupe traité). Les animaux étaient exposés à ces événements de manière imprévisible et incontrôlable, intervenant aussi bien le jour que la nuit. Vingt-quatre autres agnelles (groupe témoin) étaient logées dans des conditions standards d'élevage (i.e. distribution alimentaire régulière et donc prévisible, manipulations

standards). A la fin du traitement, une numération des globules blancs, des mesures de l'activité cardiaque et des niveaux de cortisol ont été mesurés chez les agnelles dans leur parc d'élevage, comme biomarqueurs classiques de stress. En outre, la réactivité émotionnelle a été évaluée, avant et après la période de traitement, en soumettant les agnelles à 3 tests standardisés : une exposition individuelle à la nouveauté puis à la soudaineté dans un parc de test, et une exposition en groupe à un homme immobile dans le parc d'élevage.

### **3. Résultats**

A l'issue du traitement, le groupe traité présentait un taux de globules blancs plus bas que le groupe témoin. De même, leur activité cardiaque et leurs niveaux de cortisol plasmatique étaient plus bas que ceux du groupe témoin.

Avant le traitement, la réactivité émotionnelle des deux groupes n'était pas différente. Par contre, après traitement, les animaux traités s'approchaient moins du nouvel objet, vocalisaient plus lors du test de nouveauté et ils s'approchaient de l'homme moins souvent que les témoins. Aucune différence n'a été observée entre les deux groupes lors du test à la soudaineté.

### **4. Discussion**

L'exposition répétée à des événements à la fois aversifs, imprévisibles et incontrôlables s'est traduit chez les ovins par une altération des systèmes nerveux et immunitaires impliqués dans les réactions de stress, confirmant ainsi l'hypothèse du développement d'un état de stress chronique. Un tel état de stress s'est également accompagné par une exacerbation de la réactivité émotionnelle des animaux dans des situations anxiogènes comme la nouveauté ou la proximité de l'homme. Le caractère quasi-réflexe des réponses à la soudaineté, tel que défini dans les théories cognitives, pourrait expliquer l'absence d'effet du stress dans le test à la soudaineté. L'augmentation de la réactivité émotionnelle pourrait donc être un indicateur non invasif d'un état de stress chronique chez l'animal d'élevage. Néanmoins, d'autres études scientifiques sont nécessaires pour confirmer cette hypothèse.

- ➔ Validation d'un modèle de stress chronique sur ovins, basé sur l'accumulation d'émotions négatives induites par une exposition à des événements aversifs imprévisibles et incontrôlables.
- ➔ Augmentation de la réactivité émotionnelle à la nouveauté et à l'homme chez les animaux stressés chroniquement.

1 **Long-term exposure to unpredictable and uncontrollable aversive events alters**  
2 **fearfulness in sheep**

3

4 A. Destrez<sup>1</sup>, V. Deiss<sup>1</sup>, C. Leterrier<sup>2</sup>, X. Boivin<sup>1</sup>, A. Boissy<sup>1</sup>.

5

6 <sup>1</sup> *INRA UMR1213 Herbivores, INRA-VetAgro Sup, F-63122 Saint-Genès*  
7 *Champanelle, France.*

8 <sup>2</sup> *INRA UMR 85 Physiologie de la Reproduction et des Comportements, INRA-*  
9 *CNRS- Université de Tours-IFCE, F-37380 Nouzilly, France.*

10

11

12

13

14

15

16

17

18 Corresponding author: Alexandra Destrez.

19 E-mail: alexandra.destrez@clermont.inra.fr

20

21 **Abstract**

22 Numerous studies have investigated the emotional effects of various acute,  
23 potentially alarming events in animals, but little is known about how an accumulation  
24 of emotional experiences affects fearfulness. Fearfulness is a temperament trait that  
25 characterizes the propensity of an individual to be frightened by a variety of alarming  
26 events. The aim of this study was to investigate a putative alteration of fearfulness in  
27 sheep repeatedly exposed to various aversive events. Forty-eight five-month-old  
28 female lambs were used. Over a period of 6 weeks, 24 of them (treated group) were  
29 exposed daily to various unpredictable and uncontrollable aversive events related to  
30 predatory cues, social context and negative handling that can occur under farming  
31 conditions. The other 24 lambs (control group) were housed in standard farming  
32 conditions (predictable food distribution and group handling). Fearfulness  
33 (behavioural and physiological responses) was assessed before and after the  
34 treatment period by subjecting the lambs to three standardized tests: individual  
35 exposure to suddenness and then to novelty in a test arena, and group exposure to a  
36 motionless human in the home pen. As biomarkers of stress, leukocyte counts, heart  
37 rate and cortisol concentrations were measured in the lambs in their home pens.  
38 Before the treatment, the emotional responses of the groups did not differ. After the  
39 treatment, treated lambs approached the human less often, had less contact with the  
40 novel object, and vocalized more than controls in individual tests, suggesting that  
41 long-term exposure to unpredictable and uncontrollable aversive events increases  
42 subsequent fearfulness in sheep. In addition, treated lambs had lower leukocyte  
43 counts, heart rate and cortisol levels, pointing to a chronic stress state. These  
44 findings suggest that increased fearfulness may be used as a sign of chronic stress  
45 in farm animals.

46

47 **Implications**

48

49 Farming systems can repeatedly expose animals to various aversive events. Our  
50 results suggest that long-term exposure to such aversive events occurring  
51 unpredictably and uncontrollably increases subsequent emotional reactivity in sheep.  
52 Altered fear-related responses could be used as a warning sign of stress in sheep.  
53 Although our results were obtained in an experimental situation, the risk of increasing  
54 fear reactivity can easily be transposed to the real-world living conditions of farm  
55 animals because we used aversive events commonly occurring on farms as our  
56 stressors.

57

58 **Introduction**

59 Concern for animal welfare stems from the recognition that animals are capable of  
60 experiencing emotions (Dawkins, 2006). Farming systems can repeatedly and  
61 unpredictably expose animals to aversive events such as social mixing, restraint,  
62 transport and delayed food delivery, which can subsequently lead to an accumulation  
63 of negative emotional experiences. Measuring emotional reactions is a key to  
64 assessing animal welfare state (Mendl *et al.*, 2001, Doyle *et al.*, 2011). Emotional  
65 reactions of animals can be inferred from acute physiological and behavioural  
66 adjustments, such as increased heart rate, elevated blood corticoid levels, and  
67 specific behaviours in response to potential alarming events. Boissy (1998) proposed  
68 the term “fearfulness” as a temperamental trait characterizing the propensity of an  
69 individual to be frightened by a variety of alarming events, and which depends on the  
70 individual’s own evaluation of the situation.

71 Numerous studies have investigated the emotional effects of acute alarming events  
72 in farm animals, each event being considered separately (for a review Forkman *et al.*,  
73 2007), but little is known about the effects of long-term repeated emotional  
74 experiences on putative changes in fearfulness (Dantzer and Mormede, 1983,  
75 Rushen, 1991). It has been shown in both humans and laboratory animals that  
76 repeated negative emotional experiences can compromise immune function  
77 (Leonard and Song, 1996, Zager *et al.*, 2007) and lead to behavioural changes (for a  
78 review, Blanchard *et al.*, 2001). Also, in humans, repeated negative emotional  
79 experiences known to induce chronic stress can ultimately heighten fearfulness  
80 (Glaser *et al.*, 2006). The effect of negative emotional experiences on animals'  
81 fearfulness should depend on the strategies the animal is able to develop in  
82 response to the aversive event. Dantzer and Mormede (1983) have hypothesized  
83 that whereas unavoidable aversive events are known to lead to apathy, aversive  
84 events to which animals can respond actively are likely to make them more ready to  
85 react to further changes in their environment. A chronic stress state could thus  
86 potentially be assessed by measuring the increase in fearfulness in acute challenging  
87 situations.

88 However, repeated exposure to aversive events under experimental conditions does  
89 not systematically change reactions to fear-eliciting events (Janssens *et al.*, 1995, de  
90 Jong *et al.*, 2000, Doyle *et al.*, 2011). Calandreau *et al.* (2011) and Doyle *et al.*  
91 (2011) suggest that this lack of change in fearfulness is due to inefficiency of the  
92 experimental treatment in significantly inducing a negative emotional experience.  
93 Interestingly, Ladewig (2000) asserts that unpredictable and uncontrollable exposure  
94 to various aversive events should be repeated to induce a chronic stress state.

95 The aim of our study was to analyse the putative changes in fearfulness in sheep  
96 after several weeks exposure to various unpredictable and uncontrollable aversive  
97 events likely to occur in farming conditions (treated group). Their physiological (heart  
98 rate and cortisol level) and behavioural reactions towards fear-eliciting events based  
99 on novelty, suddenness and human proximity were then compared with those of a  
100 control group of sheep kept in standard farming conditions (predictable food, regular  
101 exposition to humans and objects). For basal parameters, blood cells were counted  
102 and a 24 h time budget was recorded over the treatment period.

103 We hypothesized that fearfulness of treated sheep would increase, their heart rate  
104 and cortisol level following an aversive event would increase (Dwyer and Bornett,  
105 2004) and their total white blood cell count would decrease, as it does in depressed  
106 humans (Leonard and Song, 1996, Bellingrath *et al.*, 2010)

107

## 108 **Materials and methods**

109 The experiment was carried out in accordance with the European Communities  
110 Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) and was approved by a local  
111 ethics committee (CE17-08 CEMEA Auvergne, France).

112

### 113 *Animals and housing*

114 Forty-eight Romane (Romanov x Berrichon-du-Cher) female lambs (aged 5 months)  
115 were housed in four indoor pens, twelve lambs in each. The lambs were fed a daily  
116 ration of concentrate in the morning (0830 h) and hay and straw in the afternoon  
117 (1600 h). The floor of the pen was bedded with straw and the room was artificially lit  
118 from 0730 h to 1930 h. Lambs received half of their concentrate before each  
119 behavioural test to avoid lack of appetite. The other half of the concentrate was

120 dispensed 30 min after test completion (between 1030 h and 1600 h). Feed refusals  
121 were weighed daily and the lambs were weighed once a month.

122

### 123 *Experimental design*

124 For 6 weeks, lambs in two indoor pens were exposed approximately daily to  
125 uncontrollable aversive events regularly encountered in farming systems (treated  
126 lambs). Aversive events were imposed as described in Table 1 (description,  
127 frequency and duration) and were adapted from the literature listed in Table 1  
128 (evidence of aversiveness). The events fell into three classes known to be  
129 biologically significant for sheep: predator, congener, and human activity cues  
130 (Table 1). Besides being uncontrollable, the aversive events were unpredictable for  
131 the lambs, as they occurred at different times of day and (or) night with no  
132 forewarning.

133 During the 6-week treatment, the treated lambs were poorly kept (unpredictable food  
134 distribution and only aversive handling), whereas the control lambs were housed in  
135 standard farming conditions (in two other pens):

- 136 - Predictable food distribution: a light announcing the morning food distribution  
137 each day (5 min before feeding).
- 138 - Familiarization with the human presence conducted twice weekly for 10 min. A  
139 familiar human wearing blue clothes entered the pen, stayed passive and only  
140 gave positive tactile contacts to animals that initiated contacts. Durations of  
141 habituation to human presence for control animals and handling during aversive  
142 events for treated lambs were similar.

143 - Random presentation of four familiar objects (balls or plastic tubes or tyres) was  
144 introduced twice weekly for 10 min and a wool brush was used once per week for  
145 1 h to increase the stimulating level of their housing conditions.

146 We decided not to rear the control lambs in a barren environment to avoid inducing a  
147 negative emotional state, as poor rearing conditions are stressful for animals  
148 (Brydges *et al.*, 2011).

149 To help animals discriminate people *via* the colour of their clothing (Rushen *et al.*,  
150 1999), experimenters wore white clothes for aversive events imposed on treated  
151 lambs, grey-striped clothes for leading animals to tests and blue clothes for normal  
152 farming handling (habituation and feeding for the control group and feeding for the  
153 treated group)

154 [Table 1 to be inserted here]

155

#### 156 *Fear tests*

157 The test area (Figure 1) close to the home pens (on average 20 meters) consisted of  
158 a pre-test pen (waiting pen, 1.5 m<sup>2</sup>) and a test arena (4.5 m<sup>2</sup>) with full wooden walls  
159 (height 1.5 m). A sliding door enabled movement from one pen to another. The test  
160 arena contained a bucket at the end opposite the entrance filled with food pellets  
161 (25 g of concentrate and barley). The lambs underwent a habituation procedure  
162 lasting one week. For two days, lambs of the same home pen were allowed to  
163 explore the test arena freely in pairs for 180 s, with concentrate and barley offered *ad*  
164 *libitum* in the bucket. For the next five days, each lamb was led individually to the test  
165 arena once a day and stayed 75 s. Lambs that ate during the last two days of  
166 habituation were tested on two successive already-standardized fear-eliciting tests:  
167 novelty and suddenness (Désiré *et al.*, 2004). Each lamb was tested twice in each

168 test situation, i.e. before and after the 6-week treatment period. The lambs were  
169 always moved to the test arena by a familiar human wearing grey-striped clothes.  
170 After they had undergone both tests, the lambs were exposed per group to a human  
171 test in their home pen to test their fear reactions.

172

173 *Novelty test.* The lamb entered the test arena where a novel white-and-orange traffic  
174 cone (height 50 cm) was placed 20 cm in front of the filled bucket. The test lasted  
175 75 s.

176

177 *Suddenness test.* A blue-and-white plastic panel was held 1 m above the bucket  
178 behind a wooden board (hidden raised position). An automatic device caused a  
179 sudden vertical movement of the panel (at a speed of about 2 m/s) from the hidden  
180 up position to a visible lowered position just behind the bucket. This automatic device  
181 was triggered 5 s after the lamb began to eat in the bucket. The test lasted 75 s.

182

183 *Human test.* For each home pen, a familiar human in blue clothes quietly entered the  
184 home pen and sat at the end opposite the entrance. A direct 30 s scan-sampling  
185 method was used to evaluate the position of lambs and count the number of contacts  
186 (sniffing or nibbling the observer) for 10 min. Two zones (Z) were established: Z1 1 m  
187 around the familiar human and Z2 for the rest of the pen. To facilitate the  
188 observations, the lambs were individually marked on the back. We hypothesized that  
189 long-term exposure to supposed aversive events would modify fear of humans. For  
190 example, repeated aversive handling treatments in pigs can lead to an increase in  
191 fear of humans as indicated by their approach behaviour (Hemsworth *et al.*, 1987).

192

193 *Equipment and measures*

194 *During individual fear tests.* Following an aversive event, heart rate is a possible  
195 indicator of emotional response in domestic sheep (Palestrini *et al.*, 1998, Désiré *et*  
196 *al.*, 2004). During the novelty and suddenness tests, we recorded cardiac activity for  
197 a 75 s period using a Polar Vantage NV system (Polar, Anglet, France). The heart  
198 rate monitor was placed directly before the test in the pre-test pen. The system  
199 consisted of two electrodes, an emitter and a watch-like receiver fixed to an elastic  
200 belt strapped around the animal's thorax. The heart rate data file created on the  
201 emitter was downloaded onto a computer for analysis. Three days before the test the  
202 lambs went through a habituation procedure in their home pen where they were  
203 caught and strapped with an elastic belt around the thorax, which was left in place for  
204 1 h. Animal behaviour was also recorded using cameras (Sony, Tokyo, Japan)  
205 overlooking the test pens and connected to a video recorder (Sony SVT-96LP, Sony  
206 Corp., Tokyo Japan). The video tapes were later analysed on The Observer software  
207 (Noldus, Wageningen, The Netherlands) using several behavioural patterns by the  
208 same observer (percentage of agreements: 96.8%) (Table 2).

209 [Table 2 to be inserted here]

210

211 *In home pen.* After the treatment period, 14 animals (7 control and 7 treated) were  
212 randomly selected and their cardiac activity was recorded during two phases: (i)  
213 presence of a familiar human wearing blue clothes (0930 h to 0945 h) and (ii) just  
214 after the familiar human left and with no other human activity (0945 h to 1030 h).  
215 Cardiac activity was recorded as described above. Lambs were not pre-tested before  
216 the treatment period owing to technical constraints. The time budget was twice  
217 studied from a 24 h interval of observation, before the beginning and after the end of

218 the treatment period, with the same apparatus as described above. The 24 h videos,  
219 running from the concentrate feed at 0800 h to the next concentrate feed the day  
220 after, were analysed by scan sampling every 10 min using the following ethogram:  
221 lying, standing, feeding (taking food into the mouth, chewing food, searching for food  
222 or drinking) and moving.

223

#### 224 *Assays*

225 Blood samples from each lamb (5 mL, anticoagulant: EDTA) were collected twice  
226 from the jugular vein, before and after the treatment period (0900 h), to determine  
227 cortisol level 10 min after a group confinement (an event known to be aversive) and  
228 blood parameters. Other blood samples were collected for cortisol level 20 minutes  
229 after each fear test (between 0930 h and 1600 h).

230

231 *Blood cell count and plasma cortisol levels.* Blood cell count was performed using an  
232 electronic cell counter (scil Vet abc, Germany). To determine levels of cortisol, blood  
233 samples were centrifuged at 3000 *g* for 10 min at 4°C and plasma samples were  
234 stored at -20°C until assay. Plasma cortisol levels were determined by a  
235 radioimmunoassay method (Boissy and Bouissou, 1994) using an antibody produced  
236 by Cognié and Poulin (INRA, Tours, France).

237

238 *ACTH challenge.* Lambs underwent an ACTH challenge after treatment, based on a  
239 previously validated method (Veissier *et al.*, 2001), to assess the capacity of the  
240 adrenal cortex to produce cortisol. A first blood sample was collected in the afternoon  
241 (1700 h), and dexamethasone (20 µg/kg BW; Dexalone, COOPHAVET, Ancenis,  
242 France) was injected intramuscularly to obtain the lowest blood cortisol level before

243 the ACTH challenge. On the following morning, ACTH (0.7 IU/kg; Synacthène ND  
244 Novartis-Pharma, Rueil-Malmaison, France) was injected intravenously. Blood  
245 samples were taken just before ACTH injection, and 30, 120 and 180 min after ACTH  
246 injection, *via* jugular venepuncture. Blood samples were immediately centrifuged, and  
247 plasma stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ . Plasma cortisol was measured as described above.

248

#### 249 *Statistical analysis*

250 Data was analysed using SAS software (version sas9x, SAS<sup>TM</sup> Inst., Cary, NC  
251 USA). Cardiac activity (i.e. heart rate in beats per minute), behaviour in tests, cortisol  
252 levels and blood cell count data met the requirements for parametric tests in either  
253 untransformed or transformed state. Treatment effect was analysed by ANOVA.  
254 Values are expressed as means  $\pm$  SEM (estimated by the model). After treatment, for  
255 the human test, the sum of lambs' numbers from each scan in zone Z1 (1 m around  
256 the observer) was analysed using chi-squared tests. The limit of significance was set  
257 at  $P = 0.05$ .

258

## 259 **Results**

### 260 *Before treatment*

261 Before treatment, no significant difference was observed in any of the physiological  
262 or behavioural parameters between the two animal groups.

263

### 264 *After treatment*

#### 265 *Fear tests*

266 *Novelty test* (Table 3). Treated lambs vocalized more than controls. Treated and  
267 control lambs spent the same total time looking at the novel object ( $15.7 \pm 1.5$  s), but

268 each look towards the novel object was shorter in treated lambs than controls.  
269 Treated lambs spent less time than controls making contacts with the novel object.  
270 There was no significant difference between the two groups in crossed zones ( $P =$   
271 0.6). Heart rates were lower in the treated lambs than in the controls. Plasma cortisol  
272 concentrations of treated and control groups were not significantly different.

273

274 *Suddenness test.* No significant difference between treated and control lambs was  
275 found in any of the behavioural or physiological reactions (Table 4). Plasma cortisol  
276 concentrations tended to be lower in the treated group than in the controls ( $P = 0.09$ ).  
277 The panel was activated around 13 s after the beginning of the test. Following this  
278 activation, all the animals exhibited a startle response and took around 0.9 s to  
279 resume eating. During the test, the lambs vocalized around 5 bleats, had an average  
280 heart rate of 166 bpm, and spent around 33 s feeding and 8 s looking at the trough.

281 [Tables 3 and 4 to be inserted here]

282

283 *Human test.* The treated lambs made fewer contacts with the human than did  
284 controls ( $0.9 \pm 0.3$  vs.  $3.2 \pm 0.3$ ,  $F = 53.3$ ,  $P < 0.001$ ), and the controls moved closer  
285 to the human than treated lambs (67% vs. 36% of animals in Z1,  $P < 0.0001$ ).

286

287 *Measures in home-pen conditions during the treatment period*

288 *Time budget and weight.* Over a 24 h interval, the proportions of lambs lying,  
289 standing, feeding and moving in the two groups (Figure 2) were not significantly  
290 different. Treated and control animals showed the same feeding behaviour, achieved  
291 the same feed intake, and had the same weight levels ( $50.6 \pm 0.4$  kg).

292

293 *Cortisol in response to confinement.* Treated lambs had lower cortisol level than  
294 controls ( $F = 3.9$ ,  $P = 0.05$ ), i.e.  $7.3 \pm 1.1$  ng/ml vs.  $10.2 \pm 1.1$  ng/ml for treated vs.  
295 control lambs, respectively (Figure 3.a).

296

297 *ACTH challenge.* Plasma cortisol concentrations of treated lambs were  $12.9 \pm$   
298  $2.0$  ng/ml the day before ACTH challenge,  $0.2 \pm 0.05$  ng/ml on the day of the  
299 challenge just before the ACTH injection,  $41.3 \pm 1.8$  ng/ml 30 min after ACTH  
300 injection,  $9.3 \pm 1.3$  ng/ml at 120 min post-injection and  $2.7 \pm 0.2$  ng/ml at 180 min  
301 post-injection. Plasma cortisol concentrations of control lambs at the same time  
302 points were  $9.8 \pm 2.0$  ng/ml,  $0.1 \pm 0.05$  ng/ml,  $38.1 \pm 1.8$  ng/ml,  $11.0 \pm 1.3$  ng/ml and  
303  $3.0 \pm 0.2$  ng/ml, respectively. There was a significant effect of time ( $F = 284$ ,  
304  $P < 0.0001$ ), but cross-comparison of these results indicated no significant treatment  
305  $\times$  time interactions ( $F = 1.4$ ,  $P = 0.2$ ) or effect of treatment *per se* ( $F = 0.7$ ,  $P = 0.4$ ).

306

307 *Cardiac activity* (Figure 3.b). In the presence of the familiar human (phase 1), heart  
308 rate tended to be lower in treated lambs than in controls ( $F = 3.55$ ,  $P = 0.08$ ). During  
309 phase 2, just after the familiar human left and with no other human activity, heart rate  
310 was significantly lower in treated lambs than in controls ( $F = 16.6$ ,  $P < 0.0001$ ).

311

312 *Blood cell count* (Table 5). White blood cells, particularly granulocytes, were  
313 significantly fewer in treated lambs than in controls ( $F > 7.2$ ,  $P < 0.01$ ). The ratio of  
314 different white blood cell types (mononuclear leucocytes and granulocytes) to total  
315 white blood cells was significantly different between groups ( $F > 9.4$ ,  $P = 0.004$ ), with  
316 a lower granulocyte population in treated lambs. Mean platelet volume was lower in  
317 treated lambs than in controls ( $F = 7.1$ ,  $P = 0.01$ ).

318 [Table 5 to be inserted here]

319

## 320 **Discussion**

321 After exposure to various unpredictable and uncontrollable aversive events over 6  
322 consecutive weeks, lambs increased their reactions to alarming events such as the  
323 presence of novel object and the proximity with a familiar human, revealing an  
324 increased emotional arousal by these stimuli compared with control lambs.

325 In response to the novel object, treated lambs were more disturbed than controls  
326 (they vocalized more, spent less time making contact with the novel object, and their  
327 bouts looking at the novel object were longer). Vocalizations are known to express  
328 negative feelings towards social isolation in farm animals (Manteuffel *et al.*, 2004).

329 Many studies (Erhard *et al.*, 1999, Dalmau *et al.*, 2009) have assumed that active  
330 avoidance of novel objects is an indicator of fear. Due to the unpredictable part of the  
331 treatment, a novel object introduced in a usual environment may be seen as  
332 predicting a potential aversive event. Similarly, Hemsworth *et al.* (1987) showed that  
333 pigs subjected to an unpredictable treatment (randomly-applied unpleasant and  
334 pleasant handlings) generalized all handlings to aversive handlings. Thus long-term  
335 exposure to uncontrollable common aversive events occurring unpredictably  
336 increases neophobia in lambs.

337 The control lambs had been exposed to the introduction of few objects in their home  
338 pen, so such additional experiences may have reduced neophobia in control lambs.

339 However, over the 6 weeks of treatment, the effective exposure to additional objects  
340 represented a total duration of only 480 min (10 min twice weekly and 1 h once a  
341 week). This duration was very short compared with the long duration of exposure to  
342 objects added to really enrich the environment, necessary to induce behavioural

343 effects in rats (Brydges *et al.*, 2011) or pigs (for a review van de Weerd and Day,  
344 2009). The environmental enrichment in these studies was permanent.

345 Our treated lambs made less contact with the motionless familiar person wearing  
346 blue clothes and remained farther away from him than did control lambs. According  
347 to Estep and Hetts (1992), human-animal relationships are based on the history of  
348 interactions between two individuals. Throughout our experiments, humans wore  
349 white clothes for aversive events (only for the treated group) and blue clothes for  
350 normal farming handling (habituation and feeding for the control group and feeding  
351 for the treated group). Hence despite the association of feeding (a positive event)  
352 with a human in blue, aversive experiences in the presence of a human in white  
353 seemed to have damaged the human-animal relationships in the treated group.

354 Three explanatory hypotheses can be suggested:

355 (i) The human wearing blue clothes was seated during the test, instead of standing,  
356 the posture usually taken during feed distribution. The sitting posture of the human  
357 may have been perceived as new by the lambs. This novel situation may have been  
358 more stressful for treated lambs, as we found them more reactive to novelty.

359 (ii) The lambs did not take clothing colour into account despite their known ability to  
360 discriminate colours (Alexander and Stevens, 1979), but did recognize the human, as  
361 the experimenter present during the test was one of their familiar handlers. Boivin *et*  
362 *al.* (1998) showed that beef calves were able to discriminate a familiar stockperson  
363 even when this person changed his/her clothes. It thus seems that treated lambs  
364 may not have taken into account the difference between the “aversive handler” in  
365 white and the “gentle handler” in blue because they were able to recognize the  
366 human responsible for both aversive and positive events during the treatment period.  
367 In this case, inability to discern the intention of the human according to the colour of

368 their clothes could have placed the treated lambs in an ambiguous situation. Some  
369 recent papers in farm animals report the negative perception of animals in response  
370 to probe events under chronic stress (Doyle *et al.*, 2011).

371 (iii) The lambs generalized their negative experience with the white human to all  
372 humans. Long-term exposure to unpredictable and uncontrollable aversive events  
373 increased lambs' fearfulness of human delivering positive actions (in blue clothes  
374 here) and damaged the human-animal relationships. Confirming a number of  
375 experiments (for a review Rushen *et al.*, 1999), treated animals may tend to  
376 generalize aversive experiences with one handler to all people.

377 To test these three hypotheses, complementary tests on reactivity to humans could  
378 be performed with an unfamiliar human and a familiar human wearing differently  
379 coloured clothes (here: white, blue and a new colour).

380 Unlike treated lambs, control animals may have developed a positive perception of  
381 the human wearing blue clothes. In addition, tactile stimulations could increase the  
382 control group's motivation to interact with humans (Hemsworth *et al.*, 1987, Boivin *et*  
383 *al.*, 1998). Gentling sheep reduces fear of humans, but it seems that this effect may  
384 not be generalizable to other fear situations (Dwyer and Bornett, 2004).

385 During the suddenness test, all the lambs stopped eating and showed a startle  
386 response in reaction to the sudden event, with no difference between treated and  
387 control animals. This lack of difference may be due to a ceiling effect, because all the  
388 lambs exhibited very strong responses to the sudden vertical movement of the panel.

389 This hypothesis was also suggested by Boissy *et al.* (2001) for chronically-stressed  
390 calves that reacted like control calves during a suddenness test (involving a  
391 suddenly-opened umbrella). In addition, according to the appraisal theories of  
392 cognitive psychology to assess emotions (Scherer, 1999), the evaluation of

393 suddenness is the most automatic evaluative process. It can be argued that  
394 suddenness caused specific reflex responses, making it difficult to discriminate the  
395 variation in sentience and decision-making between individuals.

396 Our treatment may have lastingly but only partly altered the lambs' fearfulness by  
397 negatively modifying their own perception of their environment, as differences in  
398 reactions to novelty and the human were found, even though lambs were not  
399 exposed to an alarming event just before being tested. This long-lasting change  
400 could have led to the development of a negative affective state, as is the case with  
401 chronic stress. However, more evidence is needed to confirm that lambs subjected to  
402 this long-term exposure to unpredictable and uncontrollable aversive events were  
403 experiencing chronic stress. Most physiological measures performed as biomarkers  
404 of chronic stress (cardiac activity, immune system, corticosteroids) did not differ  
405 between lambs, or were discrepant with the hypothesis. Acute stress in animals is  
406 often associated with higher cardiac activity and higher cortisol levels (for reviews  
407 Korte, 2001, von Borell *et al.*, 2007), while under chronic stress, variation in these  
408 parameters is not always consistent (Rushen, 1991). Baseline plasma cortisol levels  
409 increased in long-term tethered pigs (Janssens *et al.*, 1995), whereas no change was  
410 reported in some other experiments also developing chronic stress (Veissier *et al.*,  
411 2001, Doyle *et al.*, 2011), and even a decrease in basal cortisol concentrations has  
412 sometimes been reported (de Jong *et al.*, 2000, Cyr and Romero, 2007). The  
413 physiological stress-related response seem to depend on time of day of the  
414 application, type of aversive event (i.e. physical or psychological challenge), and  
415 mainly whether the animal is able to develop a coping strategy. For example, a social  
416 instability challenge induced a higher sensitivity of the adrenal glands following an  
417 ACTH injection (Dantzer *et al.*, 1983, Veissier *et al.*, 2001), whereas tethering

418 induced apathy and a lower sensitivity of adrenal glands (Broom, 1987, Ladewig and  
419 Smidt, 1989). Here, exposure to various unpredictable and uncontrollable aversive  
420 events tended to decrease cortisol levels in response to negative events  
421 (suddenness and confinement), but had no effect on ACTH challenge or on time  
422 budget. Physiological differences between treated and control groups were few, and  
423 a bias due to the pulsatile nature of cortisol release could be induced. Multiple blood  
424 sampling would enable us to determine the effect of treatment on the hypothalamic-  
425 pituitary-adrenal axis more exactly.

426 In addition, in experimental situations (novelty and with no human activity), treated  
427 lambs had a significantly lower heart rate than controls. This may appear somewhat  
428 surprising, but a few studies in humans (Lucini *et al.*, 2005) do report that chronically-  
429 stressed individuals can also show a decrease in cardiac activity. During the heart  
430 rate recordings in home pens, the phase with no human activity could correspond to  
431 a baseline cardiac activity measure. However, interpretation of heart rate in our study  
432 is very difficult because heart rate is known to be influenced by motor activity, but no  
433 behavioural measurement was made to take into account a putative difference in  
434 behavioural activity. It would have been interesting to analyse the variation in cardiac  
435 activity during fear tests from this basal activity. Owing to a lack of data (cardiac  
436 activity in home pens was recorded only on 7 animals per treatment), we were not  
437 able to carry out this analysis. Also, although the number of crossed zones during the  
438 novelty test did not differ between the two groups, a more specific analysis of the  
439 locomotor activity could have explained the differences in cardiac activity.

440 White blood cells, and particularly granulocytes, were significantly fewer in treated  
441 lambs than in controls. This same pattern has been observed in humans, total white  
442 blood cells (leukocytes) decreasing in depressed patients (Leonard and Song, 1996,

443 Bellingrath *et al.*, 2010). Also, chronic stress in rats led to a decrease in total  
444 leukocyte and lymphocyte counts (Zager *et al.*, 2007). These results therefore  
445 suggest that our long-term exposure to unpredictable aversive events may induce a  
446 chronic stress state in lambs, characterized among other things by a low granulocyte  
447 count.

448

#### 449 **Conclusion**

450 To conclude, long-term negative experience based on repeated exposure to various  
451 unpredictable and uncontrollable aversive events increased lambs' fear of humans  
452 and of novelty. The fact that some physiological markers of stress were also altered  
453 in treated lambs suggests the stressfulness of the treatment. Our findings suggest  
454 that the mechanism underlying a long-lasting negative affective state may be the  
455 accumulation of negative emotions. Measuring altered fearfulness may be used as a  
456 simple indicator of chronic stress in farm animals, but further work is still required to  
457 gain a fuller understanding of unexpected effects on physiological arousal.

458

#### 459 **Acknowledgements**

460 The authors thank D. Chassaignes of the experimental farm for animal care and help  
461 in data collection. We are also grateful to H. Chandèze, C. Ravel, E. Delval, C. Mallet  
462 and S. Andanson for their help with data collection and analysis. This study was  
463 supported by the French National Research Agency (grant ANR-09-BLAN-0339-01)  
464 and the Région Auvergne.

465

#### 466 **References**

467 Alexander G and Stevens D 1979. Discrimination of colours and grey shades by  
468 Merino ewes: Tests using coloured lambs. *Applied Animal Ethology* 5, 215-231.

469 Arnould C, Malosse C, Signoret JP and Descoins C 1998. Which chemical  
470 constituents from dog feces are involved in its food repellent effect in sheep?  
471 *Journal of Chemical Ecology* 24, 559-576.

472 Baldock NM and Sibly RM 1990. Effects of handling and transportation on the heart  
473 rate and behaviour of sheep. *Applied Animal Behaviour Science* 28, 15-39.

474 Bellingrath S, Rohleder N and Kudielka BM 2010. Healthy working school teachers  
475 with high effort–reward-imbalance and overcommitment show increased pro-  
476 inflammatory immune activity and a dampened innate immune defence. *Brain,*  
477 *Behavior, and Immunity* 24, 1332-1339.

478 Blanchard RJ, McKittrick CR and Blanchard DC 2001. Animal models of social  
479 stress: effects on behavior and brain neurochemical systems. *Physiology &*  
480 *Behavior* 73, 261-271.

481 Boissy A 1998. Fear and fearfulness in determining behavior. Grandin, T., San  
482 Diego.

483 Boissy A and Bouissou MF 1994. Effects of androgen treatment on behavioral and  
484 physiological-responses of heifers to fear-eliciting situation *Hormones and*  
485 *Behavior* 28, 66-83.

486 Boissy A, Veissier I and Roussel S 2001. Behavioural reactivity affected by chronic  
487 stress: An experimental approach in calves submitted to environmental instability.  
488 *Animal Welfare* 10, S175-S185.

489 Boivin X, Garel JP, Mante A and Le Neindre P 1998. Beef calves react differently to  
490 different handlers according to the test situation and their previous interactions  
491 with their caretaker. *Applied Animal Behaviour Science* 55, 245-257.

492 Broom DM 1987. Applications of neurobiological studies to farm animal welfare. In  
493 *Biology of Stress in Farm Animals: an Integrative Approach* (Ed. PR Wiepkema),  
494 pp. 101-110. Kluwer Academic Publishers.

495 Brydges NM, Leach M, Nicol K, Wright R and Bateson M 2011. Environmental  
496 enrichment induces optimistic cognitive bias in rats. *Animal Behaviour* 81, 169-  
497 175.

498 Calandreau L, Favreau-Peigne A, Bertin A, Constantin P, Arnould C, Laurence A,  
499 Lumineau S, Houdelier C, Richard-Yris MA, Boissy A and Leterrier C 2011. Higher  
500 inherent fearfulness potentiates the effects of chronic stress in the Japanese quail.  
501 *Behavioural Brain Research* 225, 505-510.

502 Cyr NE and Romero LM 2007. Chronic stress in free-living European starlings  
503 reduces corticosterone concentrations and reproductive success. *General and*  
504 *Comparative Endocrinology* 151, 82-89.

505 Dalmau A, Fabrega E and Velarde A 2009. Fear assessment in pigs exposed to a  
506 novel object test. *Applied Animal Behaviour Science* 117, 173-180.

507 Dantzer R and Mormede P 1983. Stress in farm animals - A need for reevaluation.  
508 *Journal of Animal Science* 57, 6-18.

509 Dantzer R, Mormede P, Bluthe RM and Soissons J 1983. The effect of different  
510 housing conditions on behavioural and adrenocortical reactions in veal calves.  
511 *Reproduction Nutrition Development* 23, 501-508.

512 Dawkins MS 2006. A user's guide to animal welfare science. *Trends in Ecology &*  
513 *Evolution* 21, 77-82.

514 de Jong IC, Prelle IT, van de Burgwal JA, Lambooy E, Korte SM, Blokhuis HJ and  
515 Koolhaas JM 2000. Effects of environmental enrichment on behavioral responses  
516 to novelty, learning, and memory, and the circadian rhythm in cortisol in growing  
517 pigs. *Physiology & Behavior* 68, 571-578.

518 Désiré L, Veissier I, Despres G and Boissy A 2004. On the way to assess emotions  
519 in animals: Do lambs (*Ovis aries*) evaluate an event through its suddenness,  
520 novelty, or unpredictability? *Journal of Comparative Psychology* 118, 363-374.

521 Doyle RE, Lee C, Deiss V, Fisher AD, Hinch GN and Boissy A 2011. Measuring  
522 judgement bias and emotional reactivity in sheep following long-term exposure to  
523 unpredictable and aversive events. *Physiology & Behavior* 102, 503-510.

524 Dwyer CM and Bornett HLI 2004. Chronic stress in sheep: assessment tools and  
525 their use in different management conditions. *Animal Welfare* 13, 293-304.

526 Erhard HW, Mendl M and Christiansen SB 1999. Individual differences in tonic  
527 immobility may reflect behavioural strategies. *Applied Animal Behaviour Science*  
528 64, 31-46.

529 Estep DQ and Hetts S 1992. Interactions, relationships, and bonds: the conceptual  
530 basis for scientist-animal relations. Cambridge University Press, Cambridge, UK,  
531 6-26.

532 Forkman B, Boissy A, Meunier-Salauen MC, Canali E and Jones RB 2007. A critical  
533 review of fear tests used on cattle, pigs, sheep, poultry and horses. *Physiology &*  
534 *Behavior* 92, 340-374.

535 Glaser J-P, van Os J, Portegijs PJM and Myin-Germeys I 2006. Childhood trauma  
536 and emotional reactivity to daily life stress in adult frequent attenders of general  
537 practitioners. *Journal of Psychosomatic Research* 61, 229-236.

538 Hemsworth PH, Barnett JL and Hansen C 1987. The influence of inconsistent  
539 handling by humans on the behaviour, growth and corticosteroids of young pigs.  
540 *Applied Animal Behaviour Science* 17, 245-252.

541 Janssens CJJG, Helmond FA and Weigant VM 1995. The effect of chronic stress on  
542 plasma cortisol concentrations in cyclic female pigs depends on the time of day.  
543 *Domestic Animal Endocrinology* 12, 167-177.

544 Korte SM 2001. Corticosteroids in relation to fear, anxiety and psychopathology.  
545 *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 25, 117-142.

546 Ladewig J 2000. Chronic intermittent stress: a model for the study of long-term  
547 stressors. B. I. Publishing CABI Publishing, 159-169.

548 Ladewig J and Smidt D 1989. Behavior, episodic secretion of cortisol, and  
549 adrenocortical reactivity in bulls subjected to tethering *Hormones and Behavior* 23,  
550 344-360.

551 Leonard BE and Song C 1996. Stress and the immune system in the etiology of  
552 anxiety and depression. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 54, 299-303.

553 Lucini D, Di Fede G, Parati G and Pagani M 2005. Impact of chronic psychosocial  
554 stress on autonomic cardiovascular regulation in otherwise healthy subjects.  
555 *Hypertension* 46, 1201-1206.

556 Manteuffel G, Puppe B and Schön PC 2004. Vocalization of farm animals as a  
557 measure of welfare. *Applied Animal Behaviour Science* 88, 163-182.

558 Mendl M, Burman O, Laughlin K and Paul E 2001. Animal memory and animal  
559 welfare. *Animal Welfare* 10, S141-S159.

560 Palestini C, Ferrante V, Mattiello S, Canali E and Carezzi C 1998. Relationship  
561 between behaviour and heart rate as an indicator of stress in domestic sheep  
562 under different housing systems. *Small Ruminant Research* 27, 177-181.

563 Rushen J 1991. Problems associated with the interpretation of physiological data in  
564 the assessment of animal welfare. *Applied Animal Behaviour Science* 28, 381-386.

565 Rushen J, Taylor AA and de Passille AM 1999. Domestic animals' fear of humans  
566 and its effect on their welfare. *Applied Animal Behaviour Science* 65, 285-303.

- 567 Scherer KR 1999. On the sequential nature of appraisal processes: Indirect evidence  
568 from a recognition task. *Cognition & Emotion* 13, 763-793.
- 569 Schwartzkopf-Genswein KS, Booth-McLean ME, Shah MA, Entz T, Bach SJ, Mears  
570 GJ, Schaefer AL, Cook N, Church J and McAllister TA 2007. Effects of pre-haul  
571 management and transport duration on beef calf performance and welfare. *Applied*  
572 *Animal Behaviour Science* 108, 12-30.
- 573 Terlouw EMC, Boissy A and Blinet P 1998. Behavioural responses of cattle to the  
574 odours of blood and urine from conspecifics and to the odour of faeces from  
575 carnivores. *Applied Animal Behaviour Science* 57, 9-21.
- 576 van de Weerd HA and Day JEL 2009. A review of environmental enrichment for pigs  
577 housed in intensive housing systems. *Applied Animal Behaviour Science* 116, 1-  
578 20.
- 579 Veissier I, Boissy A, dePassille AM, Rushen J, van Reenen CG, Roussel S,  
580 Andnason S and Pradel P 2001. Calves' responses to repeated social regrouping  
581 and relocation. *Journal of Animal Science* 79, 2580-2593.
- 582 von Borell E, Langbein J, Després G, Hansen S, Leterrier C, Marchant-Forde J,  
583 Marchant-Forde R, Minero M, Mohr E, Prunier A, Valance D and Veissier I 2007.  
584 Heart rate variability as a measure of autonomic regulation of cardiac activity for  
585 assessing stress and welfare in farm animals -- A review. *Physiology & Behavior*  
586 92, 293-316.
- 587 Zager A, Andersen ML, Ruiz FS, Antunes IB and Tufik S 2007. Effects of acute and  
588 chronic sleep loss on immune modulation of rats. *American Journal of Physiology-*  
589 *Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 293, R504-R509.
- 590  
591

Table 1. Assumed aversive events used during the 6 week treatment of chronic stressful experience.

Events used during the 6 weeks (description)	Frequency over 6 weeks	Duration of event for each home pen	Evidence of aversiveness in literature
<b>Predator signals</b>			
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sheep dog handling</li> </ul> <i>Lambs were moved in groups of four using a sheep dog, from their pens and along the corridors of the building</i>	3	30 min	Baldock and Sibly 1990
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aversive contact with a dog</li> </ul> <i>A very large barking Beauceron dog (resembling a wolf) entered or walked around the lambs' home pen</i>	7	30 min	Baldock and Sibly 1990
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Howl of dogs and wolves</li> </ul> <i>Howls sounded at set hours during the night</i>	11	4 sessions of 15 min	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Odours of dog's faeces</li> </ul> <i>Boxes of dog faeces placed in home pen</i>	7	24 h	Arnould <i>et al.</i> 1998
<b>Congener signals</b>			
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Odours of blood taken at slaughterhouse</li> </ul> <i>Boxes of sheep blood taken at slaughterhouse and placed in home pen</i>	7	24 h	Terlouw <i>et al.</i> 1998
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Odours of urine taken at slaughterhouse</li> </ul> <i>Boxes of sheep's urine taken at slaughterhouse and placed in home pen</i>	7	24 h	Terlouw <i>et al.</i> 1998
<b>Human activity signals</b>			
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Individual restraint</li> </ul> <i>Shackles fixed on the lambs' forelegs and head in home pen</i>	4	1 h	Baldock and Sibly 1990
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Shearing</li> </ul> <i>Woollen fleece of lamb cut short</i>	2	1 h	Schwartzkopf-Genswein <i>et al.</i> 1997
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Presence of a noisy man</li> </ul> <i>Loud metallic noise made by a man with a bar</i>	4	15 min	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Disturbance of the food distribution</li> </ul> <i>Late or unreachable food given</i>	12	15 min to 1 h	Doyle <i>et al.</i> 2011
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Wet bedding</li> </ul> <i>Lambs stayed in a pen with wet bedding straw</i>	8	4 h	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Light during the night</li> </ul> <i>Light turned on by a programmer at set hours during the night</i>	8	4 sessions of 30 min	Doyle <i>et al.</i> 2011
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Crossing of a footbath</li> </ul> <i>A group of four lambs crossed a footbath moved by a sheepdog or human wearing white clothes</i>	8	30 min	Doyle <i>et al.</i> 2011
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Transport in cattle truck</li> </ul> <i>Lambs transported grouped by pen, in a truck.</i>	3	1 h	Baldock and Sibly 1990

Table 2. Description of observed activities during fear tests

Activity	Description	Context
Crossed zones (number)	Number of crossings of zones (see Fig. 1) A lamb was defined as entering a zone when its two forelegs were in this zone	Novelty test Suddenness test
Vigilance (s)	Time spent immobile, head in an upright position, ears immobile or moving back and forth Start: animal stops moving End: animal moves again	
Vocalizations* (number)	Number of bleats with mouth closed or opened	
Looking at the trough (s)	Head and ears oriented towards trough and animal is more than 20 cm from trough	
Contact with the trough (s)	Head and ears oriented towards trough and animal is less than 20 cm from trough	
Feeding (s)	Taking food into the mouth or chewing	
Startle responses (number)	Visible transient contraction of the shoulder and (or) hindquarters of the animal occurring with bending of the legs or with the legs moving away from each other	Suddenness test
Looking at the object (s)	Head and ears oriented towards the traffic cone and animal's nose is more than 10 cm away	Novelty test
Contact with object (s)	Head and ears oriented towards the traffic cone while animal's nose is less than 10 cm from the cone	

\* noted manually.

Table 3. Behaviours and physiological parameters (means  $\pm$  SEM) of treated ( $n = 23$ ) and control animals ( $n = 24$ ) during novelty test after six weeks of treatment (bout = duration/frequency).

Activity	Control	Treated	SEM	<i>P</i>
Number of bleats	3.0 <sup>A</sup>	7.5 <sup>B</sup>	0.9	0.001
Duration looking at the novel object (s)	16.5	14.8	1.5	0.4
Bout looking at the novel object (s)	1.8 <sup>A</sup>	1.4 <sup>B</sup>	0.1	0.01
Duration of contact with the object (s)	5.3 <sup>a</sup>	2.9 <sup>b</sup>	0.9	0.05
Bout of contact with the object (s)	1.4	0.9	0.2	0.1
Heart rate (bpm)	121.3 <sup>a</sup>	103.3 <sup>b</sup>	2.3	0.04
Plasma cortisol 20 min after the end of test (ng/ml)	11.4	11.3	1.1	0.96

a, b for  $P < 0.05$ ; A, B for  $P < 0.01$

Table 4. Behaviours and physiological parameters (means  $\pm$  SEM) of treated ( $n = 23$ ) and control animals ( $n = 24$ ) during suddenness test after six weeks of treatment.

Activity	Control	Treated	SEM	<i>P</i>
Number of bleats	4.5	5.6	1.4	0.6
Duration looking at the trough (s)	8.4	8.3	1.0	0.9
Duration of feeding (s)	30.7	35.6	4.5	0.4
Latency to eat after the panel (s)	1.4	0.32	0.6	0.2
Number of startle responses	1.23	1.25	0.2	0.7
Heart rate (bpm)	176.9	155.1	5.4	0.1
Plasma cortisol (ng/ml)	12.4	10.0	1.0	0.09

a, b for  $P < 0.05$ ; A, B for  $P < 0.01$

Table 5. Blood analysis of lambs 6 weeks after treatment (means  $\pm$  SEM)

Blood cell components	Control	Treated	SEM	<i>P</i>
Red blood cells ( $10^6/\text{mm}^3$ )	9.4	9.5	0.2	0.7
Haemoglobin (g/dl)	10.2	10.0	0.1	0.2
Haematocrit (%)	29.0	29.3	0.5	0.5
Platelets ( $10^3/\text{mm}^3$ )	384.1	426.2	20.6	0.1
Mean platelet volume ( $\mu\text{m}^3$ )	6.1 <sup>A</sup>	5.7 <sup>B</sup>	0.2	0.01
White blood cells ( $10^3/\text{mm}^3$ )	9.6 <sup>A</sup>	8.5 <sup>B</sup>	0.3	0.01
Mononuclear cells ( $10^3/\text{mm}^3$ )	4.2	4.0	0.2	0.5
Granulocytes ( $10^3/\text{mm}^3$ )	5.4 <sup>A</sup>	4.5 <sup>B</sup>	0.2	0.001
Mononuclear cells per total white blood cells (%)	44.4 <sup>A</sup>	48.4 <sup>B</sup>	0.9	0.004
Granulocytes per total white blood cells (%)	55.6 <sup>A</sup>	51.6 <sup>B</sup>	0.9	0.004

a, b for  $P < 0.05$ ; A, B for  $P < 0.01$

### **Captions for figures**

Figure 1. Testing area of novelty and suddenness tests.

Figure 2. Time spent doing the main activities (% of total observations) during time budget (24 h) for control and treated groups ( $n = 48$ ) after treatment.

Figure 3. Physiological measures of control and treated groups after treatment. 3.a. Average of basal cortisol concentrations ( $n = 48$ , \*  $P < 0.05$ ). 3.b. Average of heart rates recorded during 45 minutes in period without human activity and 15 minutes in presence of human of control and treated lambs ( $n = 14$ , \*\*  $P < 0.0001$ ).

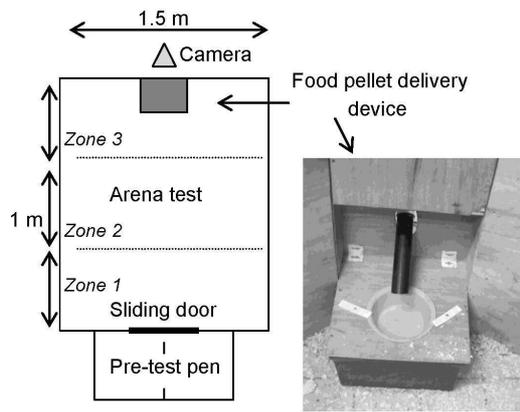


Figure 1.

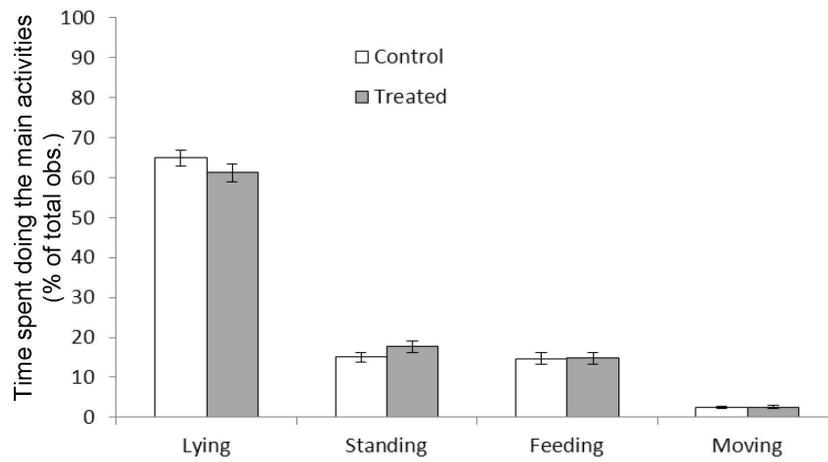


Figure 2.

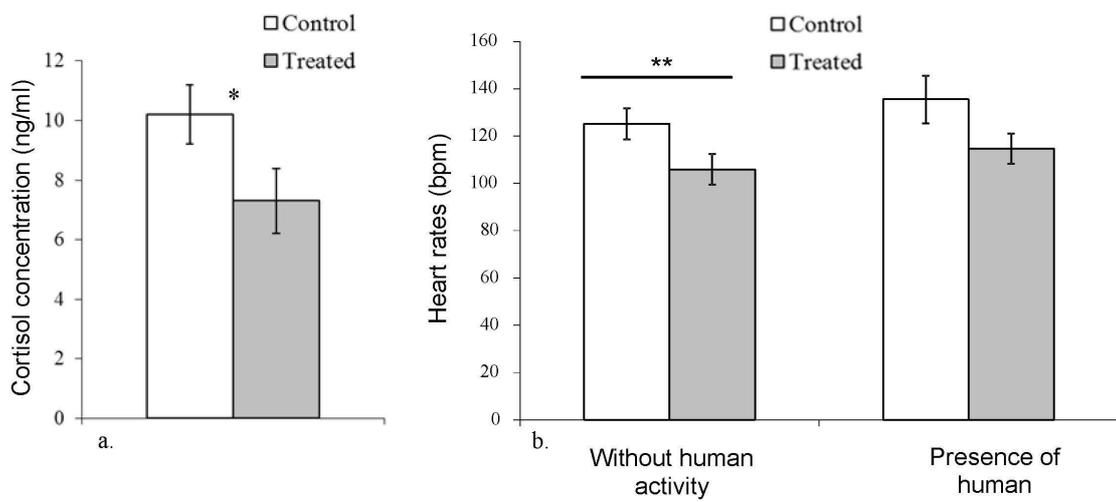


Figure 3.

---

**CHAPITRE 2 - EFFETS DU STRESS CHRONIQUE SUR DES  
FONCTIONS COGNITIVES DES ANIMAUX : JUGEMENT,  
APPRENTISSAGE ET DISCRIMINATION**

---



**L'état de stress chronique induit un jugement pessimiste et des déficits mnésiques chez le mouton**

Alexandra Destrez, Véronique Deiss, Frédéric Levy, Ludovic Calandreau, Caroline Lee, Elodie Chaillou et Alain Boissy, 2012.

*Animal Cognition*, soumis.

**1. Objectif**

Le stress chronique peut être défini comme un état affectif négatif persistant induit par une accumulation d'expériences émotionnelles négatives. Cet état affectif négatif altère durablement les relations que l'individu entretient avec son environnement extérieur. Chez l'homme, plusieurs travaux de psychologie rapportent qu'un stress chronique se traduit par des biais cognitifs persistants de jugement et d'apprentissage. Dans cette expérimentation, nous avons pour but d'examiner chez le mouton si de tels biais cognitifs pouvaient être mis en évidence.

**2. Méthodes**

Vingt-quatre agnelles étaient soumises au traitement de stress chronique pendant 6 semaines comme développé précédemment. Ce traitement correspond à une exposition répétée de manière imprévisible et incontrôlable à divers événements aversifs pouvant avoir lieu en élevage. Vingt-quatre autres agnelles étaient utilisées comme groupe témoin. Au préalable, toutes les agnelles avaient été entraînées à approcher (position positive) ou à éviter (position négative) un seau selon sa position. Après le traitement, les agnelles étaient exposées à deux tests :

- (i) un test de biais de jugement réalisé dans les conditions du test d'approche/évitement appris avant le traitement. Les animaux étaient libres d'approcher ou au contraire d'éviter le seau placé non seulement dans les deux positions préalablement apprises (positive et négative) mais aussi dans trois positions intermédiaires entre les positions apprises. Ces trois positions étaient plus ou moins ambiguës : une plus proche de la position positive, une au centre, et une plus proche de la position négative.

(ii) un test d'apprentissage. Les agnelles devaient d'abord apprendre à distinguer deux stimuli visuels de couleur et de forme différentes pendant six jours consécutifs (phase d'acquisition) puis elles étaient réexposées à ces deux stimuli deux jours après la fin de la phase d'acquisition (phase de rappel).

### **3. Résultats**

Lors du test de biais de jugement, les agnelles traitées mettaient significativement plus de temps à approcher les positions ambiguës du seau par rapport aux témoins.

Pendant la phase d'acquisition du test d'apprentissage, aucune différence significative n'a été trouvée entre les agnelles traitées et les témoins. Par contre, lors du rappel, seulement 26 % des agnelles traitées continuaient à distinguer les deux stimuli contre 65 % des agnelles témoins.

### **4. Discussion**

Le fait que les agnelles stressées chroniquement mettaient plus de temps à approcher le seau placé dans les positions ambiguës est interprété comme l'expression d'un jugement négatif (ou jugement pessimiste). De plus, les agnelles stressées chroniquement se définissent par un déficit mnésique puisqu'elles ne parviennent plus à discriminer entre les deux consignes deux jours après la fin de l'apprentissage. Ainsi, un état de stress chronique chez le mouton induit des biais de jugement et de mémoire, qui pourraient être de nouvelles mesures pour évaluer plus subtilement les altérations psycho-cognitives dans les états affectifs que les tests classiques de réactivité émotionnelle.

- Utilisation du modèle de stress chronique validé dans le chapitre 1.
- Mise en évidence de biais de jugement et de mémoire chez des agnelles stressées chroniquement, qui pourrait contribuer à entretenir la perception négative des conditions environnementales.

## **Chronic stress induces pessimistic-like judgment and learning deficits in sheep**

Alexandra Destrez<sup>1\*</sup>, Véronique Deiss<sup>1</sup>, Frédéric Levy<sup>2</sup>, Ludovic Calandreau<sup>2</sup>, Caroline Lee<sup>3</sup>,  
Elodie Chaillou<sup>2</sup>, Alain Boissy<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> INRA UMR1213 Herbivores, Centre de Clermont-Ferrand/Theix, F-63122 Saint-Genès  
Champanelle, France.

<sup>2</sup> INRA UMR 6175 Physiologie de la Reproduction et des Comportements, 37380 Nouzilly,  
France.

<sup>3</sup> CSIRO Animal, Food and Health Sciences, Locked Bag 1, Armidale NSW 2350, Australia.

\* To whom correspondence should be addressed: alexandra.destrez@clermont.inra.fr,

Tel: +33 473 62 44 50

Fax: +33 473 62 41 18

## **Abstract**

Chronic stress can be described as a long-term negative affective state induced by an accumulation of negative emotional experiences that alters an individual's interactions with the environment. In humans, chronic stress induces both persistent judgment biases and learning deficits. We investigated whether similar cognitive biases could occur in sheep. Twenty-four lambs were subjected to a chronic stress treatment for 6 weeks (exposure to various unpredictable, uncontrollable and aversive events, day or night) and 24 other lambs were used as a control group. Before treatment all the lambs had been trained to approach or avoid a food bucket depending on its location. After treatment, the lambs were individually exposed to two tests: (i) a food bucket approach/avoidance test, by testing the response of lambs to ambiguous locations of the bucket, i.e. a judgment bias test, (ii) a learning test consisting of training on six consecutive days to distinguish between two visual stimuli differing in their colour and shape (acquisition phase) and re-exposure to the test conditions 2 days after the end of the acquisition phase (recall phase). In the judgment bias test, treated lambs took longer to approach the ambiguous locations of the bucket ( $P < 0.05$ ). During the recall phase of the learning test, only 26% of the treated lambs vs. 65% of the control lambs distinguished between the two stimuli ( $P < 0.02$ ). Hence sheep experiencing repeated aversive events demonstrated pessimistic-like judgment biases and learning deficits. These may be useful measures to assess long-term emotional states in animals.

## **Keywords**

Emotion, judgment, learning, cognitive bias, chronic stress, sheep

## 1. Introduction

Animals are able to experience emotions (Duncan et al., 1996; Dantzer, 2002b). An emotion is an intense but brief subjective experience of an event, expressed by specific body changes described through autonomic and behavioural components (Désiré et al., 2002). Animals are also capable of various cognitive functions (Paul et al., 2005). Here we use the definition of Shettleworth (2001) of cognition: “the mechanisms by which animals acquire, process, store and act on information from the environment”, which encompasses the capacities of judgment and learning. Emotions and cognition are intimately linked: cognitive processes are known to induce emotions (Scherer, 2001) and emotions can influence cognitive processes by biasing judgment and learning functions, as widely reported in human psychology (Clore and Huntsinger, 2007; Sandi and Pinelo-Nava, 2007; Clore and Palmer, 2009). For example, sad people have been reported to make more negative judgments of ambiguous facial expressions than happy people (Lee et al., 2008).

Various studies in animals suggest that repeated negative experiences affect the way they appraise their environment, making them less aware of positive cues and more sensitive to negative ones. Using methods based on human psychology, studies in various animal species have shown that emotions can induce cognitive biases (rodents: Paul et al., 2005; Bateson and Matheson, 2007; sheep: Doyle et al., 2009; birds: Brilot et al., 2010). For example, exposure to acute stress, such as modification of light level, restraint or isolation, have induced pessimistic-like judgment of ambiguous events (i.e. negative cognitive bias) in both rats (Burman et al., 2009) and sheep (Doyle et al., 2009).

In contrast to the briefness of an acute stress, chronic stress states can be described as negative long-term emotional states induced by an accumulation of negative emotions (Dantzer and Mormede, 1983; Willner et al., 1992; Désiré et al., 2006). In humans, chronic stress states are associated with mnemonic deficits and executive impairment (see for review Austin et al., 2001). Chronically stressed people are reported to exhibit a judgment bias toward negative emotional cues (words, images and faces) and to pay less attention to positive stimuli (Eizenman et al., 2003; Leppänen et al., 2004; Dai and Feng, 2011). Studies in animals also suggest that long-term emotional states may induce judgment biases and learning deficits. For instance, rats in a negative long-term emotional state were less likely to show an optimistic-like bias than enriched rats (i.e. rats in a positive long-term emotional state) in their judgment of an ambiguous location (Harding et al., 2004; Burman et al., 2008). Likewise, Doyle et al. (2011) showed that a 4-week exposure to aversive events common to production systems in

sheep induced a pessimistic-like judgment of ambiguous events. In addition, a negative long-term emotional state in laboratory animals can lead to memory disruption (Mendl, 1999). Likewise, chronically stressed mice displayed reversal learning deficits (Knapman et al.). However, the relations between cognitive bias and learning functions have never been fully investigated.

The aim of this work was to study the effects of chronic stress, as a negative long-term emotional state, on both judgment and learning functions in sheep. Doyle et al. (2011) reported a pessimistic-like judgment induced by a 4-week chronic stress treatment, but they found no modification of emotional reactivity in sheep. They suggested that the stress induced may have been too low to induce changes in emotional reactivity. In order to increase the severity of stress in sheep in the current experiment, we used 6-week exposure to unpredictable and aversive events that could take place at any time during the 24 hours of each day and not only during light periods, as in Doyle et al (2011). Also, confirming the severity of our chronic stress treatment, previous research (Destrez et al., Submitted) showed that this treatment induced a modification of emotional reactivity in sheep. In short, we exposed sheep to a treatment known to induce chronic stress and we then measured putative biases in both learning and judgment.

## **2. Methods**

The experiment was carried out in compliance with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) and was approved by a local ethics committee (CE17-08 CEMEA Auvergne, France).

### ***2.1. Animals and housing***

Forty-eight Romane (Romanov × Berrichon-du-Cher) female lambs aged 5 months were housed in four indoor pens, each housing twelve lambs, allocated to two adjacent rooms for two weeks before starting habituation procedures and experiments. The lambs were fed a daily ration of concentrate in a predictable manner each morning (0830 h) signalled by an additional light switched on 5-10 minutes before delivery of the concentrate, and hay and straw in the afternoon (1600 h). They were exposed to human handling related to feeding and pen cleaning (once a week). The floor of their pen was bedded with straw and the room was artificially lit from 0730 h to 1930 h. The lambs received half of their concentrate before each

behavioural test to avoid lack of appetite. The other half of the concentrate was provided 30 min after test completion (between 1030 h and 1600 h). Timing of the experimental procedures is described in Fig1.

## ***2.2. Chronic stress treatment***

For a period of at least 6 weeks, the lambs in one room were exposed daily to a treatment of assumed aversive events regularly encountered in farming systems (treated lambs). Aversive events fell into three classes known to be biologically significant for sheep: predator, conspecific and human cues (Table 1). Each exposure to an aversive event was uncontrollable and unpredictable for the lambs, occurring at different times of the day or night. Control lambs were housed in the two pens of the other room. In addition, in order to facilitate all the lambs being able to discriminate human beings according to the type of handling (Rushen et al., 1999), the experimenters wore blue clothing during breeding, grey clothes with horizontal stripes for leading animals to the tests and white clothing during aversive events (i.e. only for treated animals).

## ***2.3. Judgment bias test***

This experiment was designed to assess influence of treatment on the judgment of the lambs. A compound (4.5 × 3 m) with solid wooden walls (1.5 m high) was used as the test arena (Fig2). The lambs entered and exited *via* a guillotine door from a start box. Wooden panels in the front corners of the test pen could also be raised vertically to expose the lamb to a negative stimulus (an automatic blower).

### ***2.3.1. Habituation and training procedure***

Before treatment, all the lambs underwent a 1-month period of habituation and training. For 3 days, 48 lambs were habituated daily to the facility by entering in pairs and receiving a food reward. Then, over 3 weeks, the lambs were trained to complete an operant task, which required them to differentiate spatially between two different locations in the testing facility. This spatial differentiation task was adapted from methodology used by Burman et al. (2008) and Doyle et al. (2009). The lambs were randomly assigned to either the left ( $n = 24$ ) or the right ( $n = 24$ ) corner of the facility for positive training. Positive training sessions involved the feed bucket being placed in the allocated corner and allowing the lamb to approach and

eat from the bucket (25 g of concentrate and barley). This was done in a session of five consecutive entries a day for 25 s each. After two weeks, negative training (5 days) was initiated and involved splitting the five consecutive entries into negative or positive events. The first four were done in a random order and the fifth entry was always a positive event. This order was chosen to prevent the last tested negative association from masking the preceding positive associations made by the lambs. The negative event involved the bucket being placed in the corner opposite the positive location. If the lamb approached within a 30 cm radius of the bucket, the side panel lifted to reveal the blower. The negative bucket contained unreachable barley (blocked by a shelf) to ensure that the choice made by the lambs resulted from the learning of the paradigm and not from olfactory cues. As soon as the lamb retreated from the 30 cm radius, the panel was lowered and the blower stopped. On each entry, the lamb had a 25 s time limit to approach the bucket before this was deemed a no-go response. For the lambs to be classified as trained they had to approach all positive buckets (a go response) and not approach any negative buckets (a no-go response) for two consecutive training sessions.

### *2.3.2. Experimental procedure: judgment testing*

From the 48 animals that underwent training, 37 were classified as trained (18 were allocated to the control group and 19 to the treated group). Next, the treatment of repeated exposure to aversive events began and once a week, lambs had a recall training session (one session, consisting in splitting the five consecutive entries into negative or positive events).

After 6 weeks of treatment, all the lambs were tested on two consecutive days (D1 and D2) in the test pen (Fig1). Judgment assessment involved presenting the feed bucket in three ambiguous locations in addition to the two learnt locations, one at a time. The three ambiguous locations were: a partially positive location (L+, 0.5 m from the positive corner of the facility), a center location (L, 1 m from both corners of the facility), and a partially negative location (L-, 0.5 m from the negative corner of the facility). The three ambiguous buckets were empty. First positive and second negative bucket positions were presented to remind the lambs of the locations they had learnt previously. Then the three ambiguous locations were presented in the order: L+/L-/L on D1 and L/L+/L- on D2. If the lamb did not approach within a 30 cm radius of a bucket in 25 s, this was deemed a no-go response and the lamb was released from the test facility.

### *2.3.3. Behavioural and physiological measurements*

The number of lambs with a go response for each bucket location, latency of approach for each bucket location and number of vocalizations were recorded. For cortisol assay, blood samples (5 mL, anticoagulant: EDTA) were collected by jugular venous puncture 20 minutes after the end of the judgment test. Blood samples were immediately centrifuged at 3000g for 10 min and plasma samples were stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until cortisol assay. Plasma cortisol levels were determined by a radioimmunoassay method (Boissy and Bouissou, 1994) using an antibody produced by Cognié and Poulin (INRA, Tours, France). The detection limit was 0.02 ng/ml and the within- and between-assay CV values were 6.5% and 13% for low controls (4 ng/ml) and 11% and 13% for high controls (32 ng/ml).

To measure cardiac activity, three days before the test, lambs were subjected to a habituation procedure: they were caught in their home pen and an elastic belt was strapped around the thorax for a one-hour period. Ten seconds before the beginning of the test, in the start box (Fig2), cardiac activity was recorded *via* a Polar Vantage NV system (Polar, Anglet, France). The system consisted of two electrodes, an emitter and a watch-like receiver, fixed to an elastic belt strapped around the thorax. Heart rate (beats per minute, bpm) was recorded as averages over 1 s intervals. The data file created on the emitter was downloaded onto a computer for analysis.

## *2.4. Learning test*

This experiment was designed to assess the influence of treatment on learning and memory functions of the lambs. A Y-maze with solid wooden walls (1.5 m high) was used as the test arena (Fig3). The lambs entered and exited *via* the guillotine door of the start box. Two different food buckets (visual stimuli) were randomly placed in each arm of the maze: one was black with vertical stripes (BV) and the other was yellow with horizontal stripes (YH). The learning test consisted of two phases (see section below): an acquisition phase and a recall phase.

### *2.4.1. Habituation*

Following 7 weeks of treatment, for 3 days the 48 lambs were habituated to the Y-maze by entering in pairs and receiving a food reward on the floor.

#### *2.4.2. Experimental procedure*

*Acquisition phase.* The lambs were individually trained to differentiate between the two buckets BV and YH. Bucket BV choice was rewarded (correct choice: 25 g of concentrate and barley) and bucket YH choice was penalized (incorrect choice: unreachable concentrate and barley blocked by a shelf) for half of the treated and control groups ( $n = 24$ ). For the other lambs ( $n = 24$ ), BV choice was penalized and YH choice rewarded. If the lamb made the penalized choice (put its head in the bucket) or did not approach any bucket within 25 s, it was immediately released from the test facility (incorrect choice). A correct choice was established when the lamb chose the reward bucket and ate from it. The learning criterion was three correct choices in the three trials (100% success). For each of six consecutive days (day 1 to day 6), lambs were given one session of three consecutive trials (of 25 s) in the Y-maze to distinguish between the two visual stimuli.

*Recall phase.* After 2 days of rest (days 7 and 8), lambs that had met the criterion at least once during the six consecutive days were tested again ( $n = 39$ , day 9) with three consecutive trials per day.

#### *2.4.3. Behavioural measurements*

Latency to approach the reward bucket, number of lambs that met the learning criterion per day, number of correct choices per day and number of days needed to meet the criterion for the first time were recorded.

### **2.5. Equipment**

The behaviour of the tested lamb was recorded with cameras (Sony Corp., Tokyo Japan) overlooking the test pens and connected to a video recorder (Sony SVT-96LP, Sony Corp., Tokyo Japan). Subsequent analysis of video recordings was carried out using The Observer software (Noldus, Wageningen, The Netherlands).

### **2.6. Statistical analysis**

The SAS software (version sas9x, SAS/STAT Inst., Cary, NC USA) was used to analyse data. Data from the judgment test: cardiac activity, cortisol levels and vocalization, and data from

the learning test: number of days needed to meet the criterion for the first time and latencies of approach of the reward bucket met the requirements for parametric tests in either an untransformed or transformed state. These data were analysed using ANOVAs.

Latencies for the subjects to approach the different bucket locations in the judgment test and number of correct choices per day in the learning test were non-normally distributed and so could not be analysed with traditional parametric statistics. A randomization test (resampling statistical technique also called permutation test) was used with 10,000 replications (method described by Adams and Anthony, 1996).

A Wilcoxon signed-rank test ( $W$ ) against a constant was used to determine whether the number of correct choices per day in the learning test was greater than chance level (1.5 correct choices per day).

The number of lambs with a go response for each bucket location during the judgment test and number of lambs that met the learning criterion during the learning test were analysed using  $\chi^2$  tests. We calculated Spearman's rank correlations between latencies to approach the different bucket locations on D1/D2 in the judgment test and number of correct choices during the recall phase of the learning test.

The significance limit was set at  $P = 0.05$  for all the analyses.

### **3. Results**

#### ***3.1. Judgment bias test***

##### *3.1.1. Behaviour*

For D1 and D2 of testing, the time to approach the positive location of the bucket did not differ between treated and control lambs (Fig4 and Fig5). Treated lambs took significantly longer to approach the negative and L- locations of the buckets than controls on D1 (Fig4). Treated animals took significantly longer to approach all three ambiguous locations (L+, L, L-) and the negative location than controls on D2 (Fig5).

During the training procedure and its recalls, the numbers of lambs with a go response vs. a no-go response, for positive and negative locations of the bucket, were not different between treated and control animals ( $\chi^2$  tests  $P > 0.1$ ). During the last recall of the training procedure (before D1 and D2), there was no effect of treatment; 97% of all the trained lambs ( $n = 37$ )

displayed a go response for the positive location and 83% a no-go response for the negative location.

Control lambs did not change their latencies of approach between D1 and D2 for positive and ambiguous locations of the bucket ( $P > 0.05$ ). However, they significantly increased their latencies of approach between D1 and D2 for the negative ( $P = 0.02$ ) location of the bucket. Treated lambs did not change their latencies of approach between D1 and D2 for the positive, L and L- locations of buckets. They significantly increased their latencies of approach between D1 and D2 for L+ ( $P = 0.03$ ) and negative ( $P = 0.02$ ) locations of the bucket.

On both days, treated lambs vocalized more than controls (D1:  $9.2 \pm 1.9$  vs.  $1.4 \pm 0.6$ ,  $F = 15.3$ ,  $P < 0.0001$ ; D2:  $9.7 \pm 2.2$  vs.  $2.5 \pm 0.8$ ,  $F = 10.0$ ,  $P = 0.003$ ).

### *3.1.2. Cardiac activity*

On D1, there was no difference in cardiac activity between treated and control animals ( $199.7 \pm 10.3$  vs.  $172.1 \pm 19.9$  bpm;  $F = 1.5$ ;  $P = 0.23$ ).

On D2 treated lambs tended to have a higher cardiac activity than controls ( $165.2 \pm 16.9$  vs.  $128.3 \pm 11.7$  bpm;  $F = 3.6$ ,  $P = 0.07$ ).

### *3.1.3. Cortisol levels*

On D1, there was no difference in cortisol level between treated and control lambs ( $11.1 \pm 1.2$  vs.  $13.5 \pm 2.2$  ng/ml;  $F = 0.9$ ;  $P = 0.4$ ).

On D2, treated lambs tended to have lower cortisol level than controls ( $9.9 \pm 1.1$  vs.  $12.5 \pm 1.1$  ng/ml;  $F = 3.0$ ,  $P = 0.09$ ).

## **3.2. Learning test**

During the acquisition phase of the learning test, the number of lambs that learned the criterion (i.e. three correct choices in the three trials of a session) every day was not different between control and treated groups. During the recall phase (day 9, Table 2), more lambs in the control group met the criterion than in the treated group (65% vs. 26%, chi<sup>2</sup> tests  $P = 0.02$ ). Hence the treated lambs had a lower mean of correct choices than the controls (Fig6). No difference was observed between treated and control lambs for the number of days needed to meet the criterion for the first time ( $4.5 \pm 0.6$  vs.  $4.0 \pm 0.6$  days;  $F = 0.3$ ;  $P = 0.6$ ). No difference was observed between treated and control lambs for latencies to approach the reward bucket on day 1 through to day 9 ( $4.8 \pm 0.5$  vs.  $4.0 \pm 0.3$  s;  $F = 2.5$ ,  $P = 0.1$ ).

On day 1, the number of correct choices per day of treated lambs was lower than chance level ( $W = 45.5$ ,  $P = 0.041$ ) and the number of correct choices per day of control lambs did not differ from chance level ( $W = 103.5$ ,  $P = 0.97$ ).

On day 2, the number of correct choices per day of control lambs was greater than chance level ( $W = 162.5$ ,  $P = 0.02$ ) and the number of correct choices per day of treated lambs did not differ from chance level ( $W = 82$ ,  $P = 0.6$ ).

On day 3 and day 4, there was no significant difference between the number of correct choices per day and chance level for all lambs ( $W < 96$ ,  $P > 0.3$ ). From day 5 to day 9, the number of correct choices per day of all lambs was greater than chance level ( $W > 143$ ,  $P < 0.05$ ).

### ***3.3. Correlations between behaviours from the judgment bias and learning tests***

There was no correlation ( $P > 0.1$ ) between behaviours from the judgment bias and learning tests in the control lambs. In the treated lambs, the number of correct choices during the recall phase of the learning test was negatively correlated with latencies of approach to two ambiguous bucket locations, L+ ( $r = -0.75$ ,  $P = 0.001$ ) and L ( $r = -0.84$ ,  $P < 0.0001$ ), on D2 of the judgment test.

## **4. Discussion**

Chronic stress (i.e. a long-term negative affective state) in sheep generates negative effects on cognitive functions by inducing both biases in judgment and deficits in learning functions. This was reflected in treated lambs by high latencies to approach ambiguous locations in the judgment test and a low number of correct choices in the learning test.

Lambs exposed to a long-lasting stress treatment tended on the second day of the judgment test to have a higher cardiac response and a lower plasma cortisol level than controls. In the literature, variation in these physiological parameters is not always consistent in chronically stressed animals (Rushen, 1991). For example, the baseline plasma cortisol levels increased in long-term tethered pigs (Janssens et al., 1995), whereas no change was reported in chronically stressed calves or sheep (Veissier et al., 2001; Doyle et al., 2011), and even a decrease in basal cortisol concentrations has sometimes been reported (de Jong et al., 2000; Calandreau et al., 2011b). In addition to the slight effects on physiological parameters, chronic stress in our

experiment modified behavioural parameters of lambs. Treated animals vocalized in test conditions more often than controls, which is known to be an expression of negative feelings in farm animals (Manteuffel et al., 2004). Also, treated lambs took significantly longer to approach ambiguous locations. Like other studies in sheep or rats (Burman et al., 2009; Doyle et al., 2010), our results suggest that chronically stressed lambs display a pessimistic-like judgment of the environment. Treated lambs also took longer to approach the ambiguous location of the bucket closest to the negative location on the first day and the three ambiguous bucket locations on the second day compared with control lambs. During the judgment test, the pessimistic-like judgment in treated lambs was stronger on the second day than on the first day. Two explanatory hypotheses can be suggested:

(i) For all the lambs, the three intermediate locations of the bucket, i.e. L+, L and L-, could be judged as both ambiguous and novel on the first day, but they could be judged as only ambiguous on the second day. On the first day, the fact that the difference was smaller between treated and control lambs could be explained by the novelty of the bucket locations for all the lambs. According to appraisal theories originally developed in humans (Scherer, 1999) and extended to animals (Désiré et al., 2002), the evaluation of the novelty of a situation, irrespective of its suddenness, predictability or pleasantness, is known to elicit negative emotions (Désiré et al., 2004). Therefore, the repetition of the experimental conditions on the second day may have improved evaluation of the judgment of ambiguous events in lambs in the absence of other challenging events and so the stronger pessimistic-like judgment in treated lambs may have been better displayed.

(ii) The differences between the first and the second days in approach to the bucket may be a consequence of a learning process. Our previous study in sheep suggested that the repetition of these testing procedures for judgment bias could influence the choices made (Doyle et al., 2010): lambs may have learned that ambiguous locations were unreinforced, resulting in a decline in the tendency for them to approach such locations. In our current study, control lambs did not change their latencies to approach ambiguous locations of buckets between the first and second days, whereas treated lambs increased their latencies to approach the intermediate location close to the learnt negative location. On the second day, treated lambs may have displayed better learning capacities than controls because they paid more attention to negative events (i.e. lack of food). Improved learning to avoid negative events may be a sign of a cognitive bias in chronically-stressed animals.

Treated lambs seemed to display a pessimistic-like judgment of ambiguous events, but also better learning capacities when punishment was used. On the first and second day, treated

lambs took longer to approach the negative bucket than controls. The judgment test could reveal both pessimistic-like bias in judgment for ambiguous events and learning bias for negative events in chronically-stressed animals.

During the recall phase of the learning test, treated lambs showed fewer correct choices than controls. This suggests that treated lambs displayed a deficit in memory capacity. Chronic stress is a potent modulator of learning and memory processes and its effects are varied and can be facilitating or impairing (for review Sandi and Pinelo-Nava, 2007). Mendl et al. (2001) also indicated that environmental disturbances, including common husbandry procedures, could also disrupt memory.

Sandi and Pinelo-Nava (2007) suggest that chronic stress can modify learning and memory systems differently: chronic stress tends to facilitate basic learning such as Pavlovian conditioning, but is detrimental to complex learning processes such as spatial information processing. In our study, during the acquisition phase, there was no significant difference between treated and control lambs, whereas during the recall phase, there was a significant difference between the two groups. The acquisition phase was basic learning, i.e. simple discrimination (Herrnstein, 1990), which did not require significant cognitive capacities. By contrast, the recall phase was more complex learning, requiring lambs to remember the discrimination (Zayan and Vauclair, 1998). Hence we can hypothesise, like Sandi and Pinelo-Nava (2007), that chronic stress may be detrimental to complex learning processes in lambs.

The number of correct choices during the recall phase of the learning test was negatively correlated with latencies of approach to ambiguous locations in treated lambs. These results also suggest that the more pessimistic-like judgment the lambs had, the greater learning deficit they exhibited.

Cognitive processes are thus pivotal in the development of affective states, acting as the mechanism by which triggering situations impact on animals while at the same time being affected by these situations. Evidence of systematic cognitive biases in the way an animal evaluates its environment, reduced anticipatory behaviour to positive events, or low reactivity to the environment signal a likely persistent state of poor welfare. Sandi and Richter-Levin (2009) suggested that cognitive biases by themselves might be indicators of negative long-term emotional states such as depression in humans. In addition, recent studies in animals emphasize the role of these interactions between negative emotions and cognitive biases to better assess chronic stress in animals (Paul et al., 2005; Boissy et al., 2007b; Mendl et al.,

2009). Our findings add support to the belief that farm animals are sentient. The repetition of short-lived negative emotions can lead to prolonged affective states. Both judgment bias and learning bias may be valuable indicators of long-term emotional states in animals. Further research needs to be conducted to determine whether these cognitive biases have the potential to be useful chronic stress measures.

## **Acknowledgments**

This experiment would not have been possible without the assistance of D. Chassaignes for animal care and help in data collection. The authors are also very grateful to H. Chandèze, C. Ravel, E. Delval and S. Andanson for their help in data collection and analysis, and to Nicolas Rossignol for his statistical advice. This study was supported by the French National Research Agency (grant No. ANR-09-BLAN-0339-01) and the Région d'Auvergne.

## **References**

- Adams DC, Anthony CD (1996) Using randomization techniques to analyse behavioural data. *Anim Behav* 51 (4):733-738
- Arnould C, Malosse C, Signoret JP, Descoins C (1998) Which chemical constituents from dog feces are involved in its food repellent effect in sheep? *J Chem Ecol* 24 (3):559-576. doi:10.1023/a:1022321104758
- Austin MP, Mitchell P, Goodwin GM (2001) Cognitive deficits in depression - Possible implications for functional neuropathology. *Br J Psychiatry* 178:200-206. doi:10.1192/bjp.178.3.200

- Baldock NM, Sibly RM (1990) Effects of handling and transportation on the heart rate and behaviour of sheep. *Appl Anim Behav Sci* 28 (1-2):15-39. doi:10.1016/0168-1591(90)90044-e
- Bateson M, Matheson SM (2007) Performance on a categorisation task suggests that removal of environmental enrichment induces 'pessimism' in captive European starlings (*Sturnus vulgaris*). *Anim Welf* 16:33-36
- Boissy A, Bouissou MF (1994) Effects of androgen treatment on behavioral and physiological-responses of heifers to fear-eliciting situation *Horm Behav* 28 (1):66-83. doi:10.1006/hbeh.1994.1006
- Boissy A, Manteuffel G, Jensen MB, Moe RO, Spruijt B, Keeling LJ, Winckler C, Forkman B, Dimitrov I, Langbein J, Bakken M, Veissier I, Aubert A (2007) Assessment of positive emotions in animals to improve their welfare. *Physiol Behav* 92 (3):375-397. doi:10.1016/j.physbeh.2007.02.003
- Brilot BO, Asher L, Bateson M (2010) Stereotyping starlings are more 'pessimistic'. *Anim Cogn* 13 (5):721-731. doi:10.1007/s10071-010-0323-z
- Burman OHP, Parker R, Paul ES, Mendl M (2008) A spatial judgement task to determine background emotional state in laboratory rats, *Rattus norvegicus*. *Anim Behav* 76 (3):801-809
- Burman OHP, Parker RMA, Paul ES, Mendl MT (2009) Anxiety-induced cognitive bias in non-human animals. *Physiol Behav* 98 (3):345-350
- Calandreau L, Favreau-Peigne A, Bertin A, Constantin P, Arnould C, Laurence A, Lumineau S, Houdelier C, Richard-Yris MA, Boissy A, Leterrier C (2011) Higher inherent fearfulness potentiates the effects of chronic stress in the Japanese quail. *Behavioural Brain Research* 225 (2):505-510. doi:10.1016/j.bbr.2011.08.010

- Clore GL, Huntsinger JR (2007) How emotions inform judgment and regulate thought. *Trends Cogn Sci* 11 (9):393-399
- Clore GL, Palmer J (2009) Affective guidance of intelligent agents: How emotion controls cognition. *Cogn Syst Res* 10 (1):21-30
- Dai Q, Feng Z (2011) Deficient interference inhibition for negative stimuli in depression: An event-related potential study. *Clin Neurophysiol* 122 (1):52-61
- Dantzer R (2002) Is it important to know about emotions in order to study emotions? *Behav Process* 60 (2):v-vii. doi:10.1016/s0376-6357(02)00077-3
- Dantzer R, Mormede P (1983) Stress in farm animals - A need for reevaluation. *J Anim Sci* 57 (1):6-18
- de Jong IC, PELLE IT, van de Burgwal JA, Lambooi E, Korte SM, Blokhuis HJ, Koolhaas JM (2000) Effects of environmental enrichment on behavioral responses to novelty, learning, and memory, and the circadian rhythm in cortisol in growing pigs. *Physiol Behav* 68 (4):571-578
- Désiré L, Boissy A, Veissier I (2002) Emotions in farm animals: a new approach to animal welfare in applied ethology. *Behav Process* 60 (2):165-180. doi:10.1016/s0376-6357(02)00081-5
- Désiré L, Veissier I, Despres G, Boissy A (2004) On the way to assess emotions in animals: Do lambs (*Ovis aries*) evaluate an event through its suddenness, novelty, or unpredictability? *J Comp Psychol* 118 (4):363-374. doi:10.1037/0735-7036.118.4.363
- Désiré L, Veissier I, Despres G, Delval E, Toporenko G, Boissy A (2006) Appraisal process in sheep (*Ovis aries*): Interactive effect of suddenness and unfamiliarity on cardiac and behavioral responses. *J Comp Psychol* 120 (3):280-287. doi:10.1037/0735-7036.120.3.280

- Destrez A, Deiss V, Leterrier C, Boivin X, Boissy A (Submitted) Long-term exposure to unpredictable and uncontrollable aversive events alters fearfulness in sheep.
- Doyle RE, Fisher AD, Hinch GN, Boissy A, Lee C (2009) Release from restraint generates a positive judgement bias in sheep. *Appl Anim Behav Sci* 122 (1):28-34
- Doyle RE, Lee C, Deiss V, Fisher AD, Hinch GN, Boissy A (2011) Measuring judgement bias and emotional reactivity in sheep following long-term exposure to unpredictable and aversive events. *Physiol Behav* 102 (5):503-510
- Doyle RE, Vidal S, Hinch GN, Fisher AD, Boissy A, Lee C (2010) The effect of repeated testing on judgement biases in sheep. *Behav Process* 83 (3):349-352
- Duncan GE, Knapp DJ, Breese GR (1996) Neuroanatomical characterization of Fos induction in rat behavioral models of anxiety. *Brain Research* 713 (1-2):79-91
- Eizenman M, Yu LH, Grupp L, Eizenman E, Ellenbogen M, Gemar M, Levitan RD (2003) A naturalistic visual scanning approach to assess selective attention in major depressive disorder. *Psychiat Res* 118 (2):117-128
- Harding EJ, Paul ES, Mendl M (2004) Animal behavior - Cognitive bias and affective state. *Nature* 427 (6972):312-312. doi:10.1038/427312a
- Herrnstein RJ (1990) Levels of stimulus control: A functional approach. *Cognition* 37 (1-2):133-166. doi:10.1016/0010-0277(90)90021-b
- Janssens CJG, Helmond FA, Weigant VM (1995) The effect of chronic stress on plasma cortisol concentrations in cyclic female pigs depends on the time of day. *Domestic Animal Endocrinology* 12 (2):167-177
- Knapman A, Heinzmann JM, Holsboer F, Landgraf R, Touma C (2010) Modeling psychotic and cognitive symptoms of affective disorders: Disrupted latent inhibition and reversal learning deficits in highly stress reactive mice. *Neurobiology of Learning and Memory* In Press, Corrected Proof

- Lee TMC, Ng EHH, Tang SW, Chan CCH (2008) Effects of sad mood on facial emotion recognition in Chinese people. *Psychiat Res* 159 (1-2):37-43
- Leppänen JM, Milders M, Bell JS, Terriere E, Hietanen JK (2004) Depression biases the recognition of emotionally neutral faces. *Psychiat Res* 128 (2):123-133
- Manteuffel G, Puppe B, Schön PC (2004) Vocalization of farm animals as a measure of welfare. *Appl Anim Behav Sci* 88 (1-2):163-182. doi:10.1016/j.applanim.2004.02.012
- Mendl M (1999) Performing under pressure: stress and cognitive function. *Appl Anim Behav Sci* 65 (3):221-244. doi:10.1016/s0168-1591(99)00088-x
- Mendl M, Burman O, Laughlin K, Paul E (2001) Animal memory and animal welfare. *Anim Welf* 10:S141-S159
- Mendl M, Burman OHP, Parker RMA, Paul ES (2009) Cognitive bias as an indicator of animal emotion and welfare: Emerging evidence and underlying mechanisms. *Appl Anim Behav Sci* 118 (3-4):161-181
- Paul ES, Harding EJ, Mendl M (2005) Measuring emotional processes in animals: the utility of a cognitive approach. *Neurosci Biobehav Rev* 29 (3):469-491
- Rushen J (1991) Problems associated with the interpretation of physiological data in the assessment of animal welfare. *Appl Anim Behav Sci* 28 (4):381-386. doi:10.1016/0168-1591(91)90170-3
- Rushen J, Taylor AA, de Passille AM (1999) Domestic animals' fear of humans and its effect on their welfare. *Appl Anim Behav Sci* 65 (3):285-303. doi:10.1016/s0168-1591(99)00089-1
- Sandi C, Pinelo-Nava MT (2007) Stress and memory: behavioral effects and neurobiological mechanisms. *Neural plasticity* 2007:78970
- Sandi C, Richter-Levin G (2009) From high anxiety trait to depression: a neurocognitive hypothesis. *Trends Neurosci* 32 (6):312-320. doi:10.1016/j.tins.2009.02.004

- Scherer KR (1999) On the sequential nature of appraisal processes: Indirect evidence from a recognition task. *Cogn Emot* 13 (6):763-793. doi:10.1080/026999399379078
- Scherer KR (2001) Appraisal considered as a process of multilevel sequential checking. *Appraisal processes in emotion: Theory, methods, research*:92-120. doi:citeulike-article-id:2880009
- Schwartzkopf-Genswein KS, Booth-McLean ME, Shah MA, Entz T, Bach SJ, Mears GJ, Schaefer AL, Cook N, Church J, McAllister TA (2007) Effects of pre-haul management and transport duration on beef calf performance and welfare. *Appl Anim Behav Sci* 108 (1-2):12-30. doi:10.1016/j.applanim.2006.11.012
- Shettleworth SJ (2001) Animal cognition and animal behaviour. *Anim Behav* 61:277-286. doi:10.1006/anbe.2000.1606
- Terlouw EMC, Boissy A, Blinet P (1998) Behavioural responses of cattle to the odours of blood and urine from conspecifics and to the odour of faeces from carnivores. *Appl Anim Behav Sci* 57 (1-2):9-21. doi:10.1016/s0168-1591(97)00122-6
- Veissier I, Boissy A, dePassille AM, Rushen J, van Reenen CG, Roussel S, Andnason S, Pradel P (2001) Calves' responses to repeated social regrouping and relocation. *J Anim Sci* 79 (10):2580-2593
- Willner P, Muscat R, Papp M (1992) Chronic mild stress-induced anhedonia: a realistic animal model of depression. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 16 (4):525-534. doi:10.1016/s0149-7634(05)80194-0
- Zayan R, Vauclair J (1998) Categories as paradigms for comparative cognition. *Behav Process* 42 (2-3):87-99. doi:10.1016/s0376-6357(97)00064-8

## Figure captions

**Fig1** Diagram depicting the timing of the treatment, training, judgment test (D1 and D2: the two consecutive days of judgment bias testing) and learning test (graphics program: MS Office).

**Fig2** The judgment bias testing facility. For a lamb trained for the left corner to be positive (P) and the right corner to be negative (N) the three ambiguous locations are partially positive (L+), central (L) and partially negative (L-) from left to right. (graphics program: MS Office).

**Fig3** The learning test facility. Two different food buckets (visual stimuli) were randomly placed in each arm of the maze: one was black with vertical stripes (BV) and the other was yellow with horizontal stripes (YH). For half of the animals BV choice was rewarded; for the other half YH choice was rewarded. (graphics program: MS Office).

**Fig4** Latencies of approach to the different buckets on the first day of the judgment bias test (D1, randomization test  $*P < 0.05$ ). (graphics program: MS Office).

**Fig5.** Latencies of approach to the different buckets on the second day of the judgment bias test (D2, randomization test  $*P < 0.05$ ). (graphics program: MS Office).

**Fig6.** Means ( $\pm$  SE.) of number of correct choices (on 3 trials) every day (d) for control and treated groups ( $n = 39$ ) randomization test  $** P < 0.01$ ). (graphics program: MS Office).

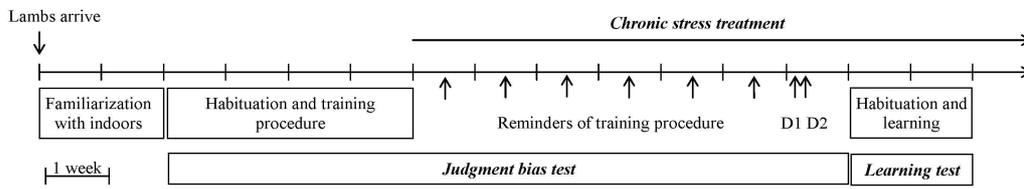


Fig1

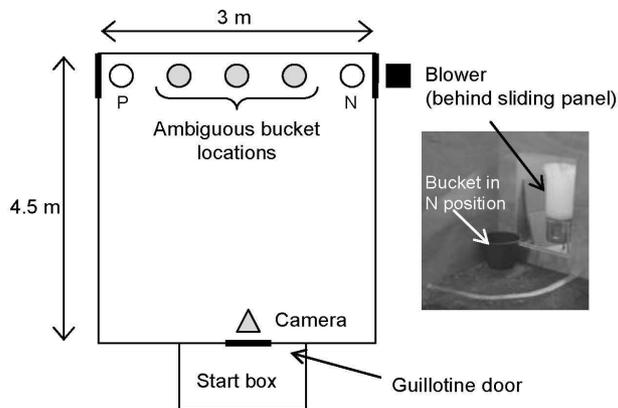
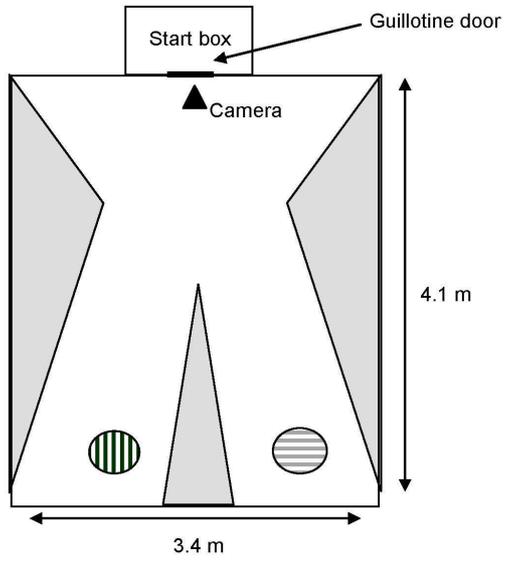
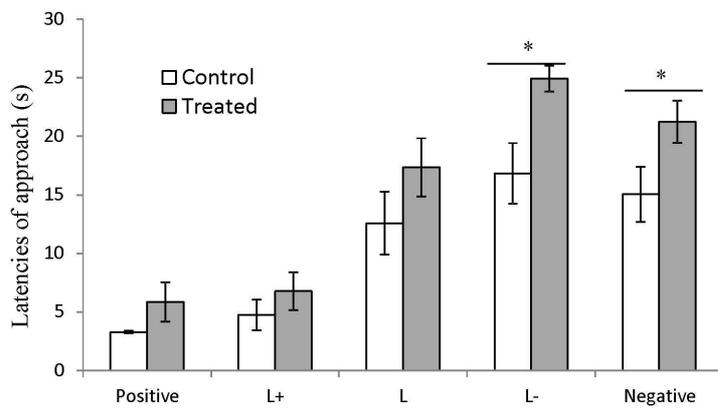


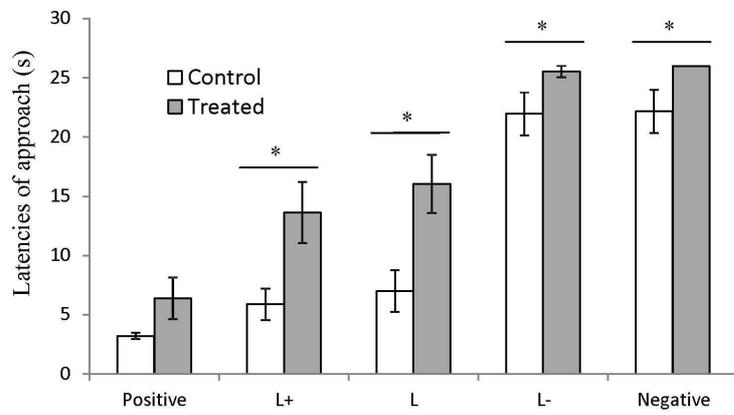
Fig2



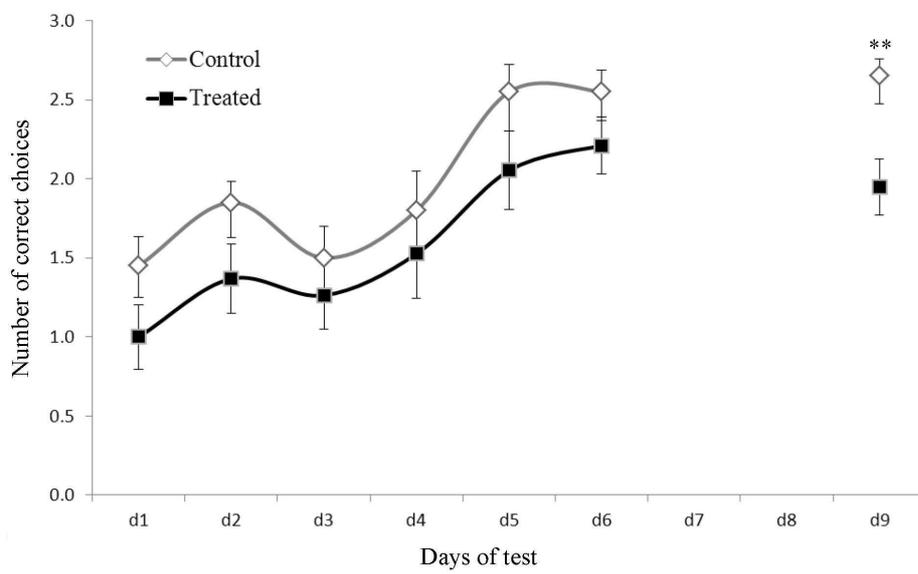
**Fig3**



**Fig4**



**Fig5**



**Fig6**

Table 1. Aversive events (description, frequency and duration) that lambs were exposed to for the 6 weeks of the chronic stress treatment

Aversive events	Frequency over 6 weeks	Duration of event	Evidence of aversiveness
<b>Predator signals</b>			
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sheep dog handling <i>A group of four lambs followed a dog from their home pen to the corridors of the breeding space and returned to their home pen</i></li> </ul>	3	30 min	Baldock and Sibly 1990
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aversive contact with a dog <i>A large barking Beauceron dog (similar to a wolf) entered or turned around the lambs' home pen</i></li> </ul>	7	30 min	Baldock and Sibly 1990
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Howl of dogs and wolves <i>Sound of howls played during the night</i></li> </ul>	11	4 sessions of 15 min	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Odor of dog's feces <i>Containers of dog's feces placed in home pen</i></li> </ul>	7	24 h	Arnould et al. 1998
<b>Conspecific signals</b>			
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Odor of blood taken from a slaughterhouse <i>Containers of sheep's blood collected in a slaughterhouse placed in home pen</i></li> </ul>	7	24 h	Terlouw et al. 1998
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Odor of urine taken from a slaughterhouse <i>Containers of sheep's urine collected in a slaughterhouse placed in home pen</i></li> </ul>	7	24 h	Terlouw et al. 1998
<b>Human signals</b>			
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Individual restraint <i>Fetters were fixed on the lambs' forelegs in home pen</i></li> </ul>	4	1 h	Baldock and Sibly 1990
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Shearing <i>Fleece of lamb shorn off.</i></li> </ul>	2	1 h	Schwartzkopf-Genswein et al. 1997
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Presence of a noisy human <i>Loud noises made by a man hitting a bar against metal</i></li> </ul>	4	15 min	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Disturbance of food distribution <i>Unreachable or late food distributed</i></li> </ul>	12	15 min to 1 h	Doyle et al. 2011
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Wet bedding <i>Wet bedding straw placed on floor of pens</i></li> </ul>	8	4 h	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Light during the night <i>Light turned on at set times during the night</i></li> </ul>	8	4 sessions of 30 min	Harding et al. 2004
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Crossing of a footbath <i>A group of four lambs crossed a footbath with or without a shepherd dog</i></li> </ul>	8	30 min	Doyle et al. 2011
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Transport in cattle truck <i>All lambs of one home pen transported in a truck</i></li> </ul>	3	1 h	Baldock and Sibly 1990

Table 2. Percentage of lambs that learned the criterion (i.e. 3 correct choices on the 3 trials of a session) on each day (d) for control and treated groups during the learning test;  $\chi^2$  test: a, b,  $P < 0.05$ .

Day	Acquisition phase						Reminder phase		
	d1	d2	d3	d4	d5	d6	d7	d8	d9
Control (%) ( $n = 20$ )	5	10	20	30	65	60	rest	rest	<b>65a</b>
Treated (%) ( $n = 19$ )	0	11	11	26	42	42	rest	rest	<b>26b</b>

**Une expérience émotionnelle à long terme avec l'éleveur module les processus cognitifs de discrimination/généralisation chez le mouton**

Alexandra Destrez, Marjorie Coulon, Véronique Deiss, Eric Delval, Alain Boissy  
et Xavier Boivin, 2012.

*Journal of Animal Science*, soumis.

**1. Objectif**

De nombreuses études ont montré que les animaux de ferme sont capables de discriminer les humains grâce à des stimuli sensoriels. Il est important de savoir si ces animaux généralisent plus ou moins facilement leur expérience émotionnelle avec une personne spécifique (par exemple leur éleveur) à d'autres personnes, selon le type de pratiques relationnelles. En effet, la variabilité des réactions des animaux par rapport à l'homme en général peut refléter les différents types de pratiques relationnelles en élevage et de comportements des éleveurs. Dans cette expérimentation, nous avons pour but d'étudier les processus cognitifs de discrimination/généralisation chez des ovins vis-à-vis de l'homme en fonction de leur expérience affective (positive ou négative) avec l'éleveur.

**2. Méthodes**

Deux types de pratique d'élevage opposés et réalisés par les éleveurs habituels étaient choisis :

- une pratique relationnelle "positive" de l'élevage c'est-à-dire une association de l'homme à des événements positifs comme la présence d'objets d'enrichissement du milieu, la distribution alimentaire journalière prévisible et des contacts positifs avec l'homme (voire des caresses). Les interactions homme/animal négatives comme celles occasionnées par les prises de sang étaient limitées.
- une pratique relationnelle "négative" de l'élevage c'est-à-dire une association de l'homme à des manipulations aversives (au moins 3 par semaine), intervenant pour l'animal de manière imprévisible et incontrôlable comme la contention, la tonte, le passage dans un pédiluve, le transport en bétailière... La distribution alimentaire qui pouvaient être considérée comme une interaction positive, était présentée à l'animal de manière imprévisible dans le but de minimiser la valence positive.

Durant près de 5 mois, 15 agnelles ont été exposées à la pratique positive (agnelles traitées positivement) et 15 autres agnelles à la pratique négative (agnelles traitées négativement). Pour faciliter la discrimination par l'animal, les éleveurs (hommes familiers) portaient des vêtements blancs lors des événements aversifs et des vêtements verts lors de la distribution alimentaire et des événements positifs.

La représentation de l'homme par l'animal a été explorée à l'issue de la période de traitement, en soumettant les agnelles en groupe à deux tests standardisés : i/ la présence d'un homme immobile assis dans le parc d'élevage (un homme familial habillé en blanc *vs.* un homme familial habillé en vert *vs.* un homme non familial avec des vêtements non familiers rayés noir et blanc), et ii/ la présence d'un homme actif dans le parc d'élevage (un homme familial habillé en blanc *vs.* un homme familial habillé en vert *vs.* un homme non familial avec des vêtements non familiers rayés noir et blanc).

### **3. Résultats**

Lors du test de l'homme immobile, les agnelles traitées négativement passaient moins de temps dans la zone où se situait l'homme, mettaient plus de temps à s'en approcher et effectuaient moins de contacts avec l'homme par rapport aux agnelles traitées positivement et cela quelle que soit la couleur de la tenue vestimentaire de l'homme (i.e., couleur blanche, verte ou noire et blanche). Lors du test de l'homme actif, les agnelles traitées négativement avaient également une distance de fuite plus importante que les agnelles traitées positivement et cela quelle que soit la couleur de la tenue vestimentaire de l'homme.

Les agnelles traitées négativement se comportaient de la même manière à l'égard de l'homme quel que soit le type d'homme. Quant aux agnelles traitées positivement, elles mettaient plus de temps à s'approcher de l'homme et passaient moins de temps à proximité quand l'homme était inconnu (habillé avec des vêtements rayés blanc et noir) par rapport à ses réactions quand il était familial (habillé en vert ou en blanc).

### **4. Discussion**

Les agnelles traitées négativement généralisent donc leurs expériences aversives infligées par des personnes habillées de couleur spécifique (vêtues de blanc) à l'ensemble des apparences vestimentaires de l'homme : elles ont exprimé aussi peu d'approches envers les hommes familiers en vert ou blanc qu'envers l'homme inconnu. A l'inverse, les agnelles traitées positivement parviennent à discriminer les hommes familiers en vert ou blanc de l'homme inconnu.

Le type de pratiques relationnelles que l'éleveur engage avec ses animaux, déterminant l'expérience émotionnelle de l'animal avec son éleveur, peut donc moduler leurs performances cognitives de discrimination/généralisation vis-à-vis de l'homme.

- ➔ Développement de deux types de pratiques relationnelles d'élevage (19 semaines) basées sur l'accumulation d'émotions soit négatives soit positives.
- ➔ Modification des performances cognitives des animaux en matière de discrimination/généralisation de l'homme en fonction de la valence émotionnelle de leur expérience préalable avec l'éleveur.



1 **The valence of the long-lasting emotional experiences with various handlers modulates**  
2 **sheep discrimination/generalization of individual humans**

3

4 A. Destrez\*, M. Coulon, V. Deiss, E. Delval, A. Boissy, X. Boivin.

5

6 *INRA UMR1213 Herbivores, INRA-VetAgro Sup, F-63122 Saint-Genès Champanelle,*  
7 *France.*

8

9

10

11

12

13

14

15

16 \* Corresponding author: Alexandra Destrez.

17 E-mail: alexandra.destrez@clermont.inra.fr

18

For Peer Review

19 **Abstract**

20 Variation among farms in the animal reactions to humans can reflect various management  
21 styles and behavioural tendencies among the farmers. Animals are well-known to discriminate  
22 among humans however one important question is whether they are more or less easily  
23 generalizing their experience from specific humans to others depending on the management  
24 style. Here, we choose two opposite management styles realized by usual handlers: a “gentle”  
25 management i.e. a long-lasting exposure to positive human interactions (with limited negative  
26 interactions) and an “aversive” management i.e. a long-lasting exposure to various negative  
27 human interactions (with only food delivery considered as positive interaction). Over a period  
28 of 19 weeks, 15 female lambs were exposed to the gentle management (gently treated group)  
29 and 15 other lambs (aversively treated group) were exposed to the aversive management. To  
30 facilitate discrimination by animals, experimenters wore white clothes for aversive events and  
31 green clothes for farming handling (positive handling and feeding for gently treated group and  
32 feeding for aversively treated group). The perception of the human by the animals was  
33 assessed after the management period by submitting lambs in group to two standardized tests:  
34 i/ the presence of a stationary human (familiar human in white vs. familiar human in green vs.  
35 unknown human) and ii/ the presence of a moving human (familiar human in white vs.  
36 familiar human in green vs. unknown human). As expected, during the stationary human test,  
37 aversively treated lambs spent less time in human zone ( $p < 0.0001$ ), had a higher latency of  
38 approach the humans ( $p = 0.05$ ) and had fewer contacts with them ( $p = 0.05$ ) than gently  
39 treated lambs. During the moving human test, aversively treated lambs had also higher  
40 distance of escape humans than gently treated lambs ( $p < 0.0001$ ). Aversively treated lambs  
41 had the same fear reactions towards familiar and unknown humans and tended to generalize  
42 their aversive experiences with one handler to all humans. By contrast, gently treated lambs

43 seemed to discriminate familiar humans from unfamiliar humans. Different management  
44 styles could modulate farm animal's generalization to humans.

45 **Key words:** human-animal relationships, lambs, welfare.

46

For Peer Review

47

**Introduction**

48

49 In farms, the animals' perception of humans is strongly influenced by their previous  
50 experiences with humans (Hemsworth et al., 1998; Rushen et al., 1999a) depending on  
51 attitudes and behaviours of the stockpersons (Hemsworth and Boivin, 2011). The animals'  
52 perception of humans can be positive or negative and is often the result of an associated  
53 learning process. The ability of farm animals to discriminate different humans has been  
54 described in several studies (Sheep: Davis et al., 1998; Cattle: Rybarczyk et al., 2003; Pigs:  
55 Tanida and Nagano, 1998).

56 One important question is whether farm animals generalize their experience from one human  
57 to others and whether they discriminate among humans. A number of experiments show that  
58 animals tend to generalize positive or negative experiences with one handler to all other  
59 handlers (for review Rushen *et al.*, 1999b). Variation among farms in their animals reactions  
60 to humans can reflect management styles and various behavioural tendencies among the  
61 farmers (for review Hemsworth and Boivin, 2011). But this hypothesis has not been tested  
62 yet.

63 A rough handler is often associated for the animals to a negative valence (aversive cues such  
64 as hits and shouts), and express sudden, unpredictable and uncontrollable behaviours. All  
65 these cognitive checks are implicated in the development of negative emotions such as fear  
66 according to the cognitive theory of emotion (Désiré et al., 2006; Scherer, 1999). So we  
67 hypothesise that towards an unknown person, animals should quickly generalise their fear  
68 responses from the familiar aversive human to the unknown one as a secure strategy. By  
69 contrast, gentled animals would show more discriminative behaviours and be more fearful  
70 towards the unknown humans than toward the familiar one even if they would approach him

4

71 more than will do the badly treated ones. In this purpose, we choose two opposite  
72 management styles, gentle and aversive, realized by usual handlers.

73

74

#### **Material and methods**

75

76 The experiment was carried out in accordance with the European Communities Council  
77 Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) and was approved by a local ethics committee  
78 (CE1-11 CEMEA Auvergne, France).

79

#### ***Animals and housing***

80 Thirty Romane (Romanov x Berrichon-du-Cher) female lambs (at 5 months of age) were  
81 housed in six indoor pens, each housing five lambs. Animals were fed a daily ration of  
82 concentrate in the morning (08:30 h) and hay and straw in the afternoon (16:00 h). The floor  
83 of the pen was bedded with straw and the room received artificial lighting from 07:30 h to  
84 19:30 h. During the experiment, all animals were exposed twice to blood sample collection  
85 due to husbandry reason with familiar human wearing white clothes.

86

#### ***Experimental design***

87  
88 During 19 weeks, animals of three indoor pens were exposed to an aversive management i.e. a  
89 long-lasting exposure to various unpredictable and uncontrollable aversive events regularly  
90 encountered in farming systems (i.e. aversively treated animals). They were exposed to five  
91 aversive events per week during the seven first weeks and to three aversive events per week  
92 during the next 12 weeks. Aversive events were classified into 3 classes known to be  
93 biologically significant for sheep: predator, congener, and human cues (Table 1). Each  
94

95 exposure to an aversive event was uncontrollable and unpredictable for the animals since it  
96 occurred at different hours of the day and/or night.

97 In addition, animals of the three other indoor pens (i.e. gently treated animals) were exposed  
98 to a gentle management i.e. a long-lasting exposure to positive events:

99 - Random presentation of four objects given by a familiar human: balls or plastic tubes or tires  
100 used for exploration behavior twice weekly for a period of 10 min and a wool brush used for  
101 scratching behavior once per week for 1 h.

102 - Predictable food distribution for positive anticipation: a daily light announcing the morning  
103 food distribution by a familiar human (5 min before feeding).

104 - Positive farming handling: an exposition to a familiar gentle human carried out twice weekly  
105 for 10 min. Familiar human wearing green clothes entered in the pen, stayed passive and only  
106 gave positive tactile contacts to animals which initiated contacts. Durations of exposition to  
107 gentle human were approximately similar to durations of handling during negative events for  
108 aversively treated animals.

109 Experimenters wore white clothes for husbandry blood sample collection and for aversive  
110 events imposed to aversively treated animals, grey striped clothes for leading all animals to  
111 tests and green clothes for farming handling (positive handling and feeding for gently treated  
112 group and feeding for aversively treated group) in order to discriminate humans via the color  
113 of their clothing (Rushen *et al.*, 1999b).

114

#### 115 *Tests of reactivity to human*

116 *Test 1: Stationary human test.* The test was adapted from Boivin *et al.* (1997). The indoor  
117 pen of each group was used as test pen (3 x 4.5 m). The lambs were tested in their own group.  
118 The 6 groups of five lambs were moved to the corridors of breeding space in another room.  
119 The test pen was divided into three zones of 1.5 m<sup>2</sup> by white lines painted on the fences. The

120 tested group was carried by a human wearing a grey coverall over 10 m between the corridor  
121 and the test pen and introduced into the test pen via the door. The test was made of three 2-  
122 min phases. In phase 1, the animals were left alone. In phase 2, a human entered the pen via  
123 the door and crouched in the middle of the opposite side of the pen. In phase 3, the human left  
124 the pen and the animals were again left alone for 2 min. This test was repeated three times on  
125 the following days (one test per day) in order to test the responses of lambs to different  
126 humans: a familiar human wearing white clothes (= human in white), another familiar human  
127 wearing green clothes (= human in green) and an unfamiliar human wearing unknown black  
128 and white striped lab coat (= unknown human). During the 3 days of test, each human (i.e.  
129 human in white, human in green and unknown human) was tested in crossover.  
130 For each test, the locomotor activity (number of zones crossed) and the time spent in the  
131 human zone were measured for each phase and for each animal. In the phase 2, the latency to  
132 human contact and the number of contacts with human were also noted.

133

134 ***Test 2: Moving human test.*** The same design was repeated on the day 4 but each human  
135 (aversive, gentle and unknown) was mobile in the phase 2. This test was repeated three times  
136 on the same day, each human was tested in crossover. The human entered the pen via the door  
137 and stopped in the middle of the opposite side of the pen. Then he walked in direction of an  
138 animal until this animal started to escape and noted the distance between him and the animal.  
139 The human started over for each animal of the group from the same starting point. The  
140 locomotor activity (number of zones crossed) and the time spent in the human zone were  
141 measured for each individual for the phases 1 and 3.

142

143 During the tests 1 and 2, animal behavior was recorded using cameras (Sony, Tokyo, Japan)  
144 overlooking the test pens and connected to a video recorder (Sony SVT-96LP, Sony Corp.,

7

145 Tokyo Japan). The video tapes were converted in media files and later analyzed on The  
146 Observer software (Noldus, Wageningen, The Netherlands) using several behavioral patterns.  
147

#### 148 *Statistical analysis*

149 Data was analyzed using SAS software (version sas9x, SAS Inst., Cary, NC USA).  
150 Behavior in tests data met the requirements for parametric tests in either untransformed or  
151 transformed state. For data of test 1, the effects of the management (aversive *vs.* gentle  
152 management), the phases (1, 2 and 3), the type of human (human in white *vs.* human in green  
153 *vs.* unknown human) and the interactions human\*management, phase\*management and  
154 phase\*human were tested using the MIXED procedure (generalization of the standard linear  
155 model with REML and ML estimation methods implemented with a Newton–Raphson  
156 algorithm, SAS Institute Inc., 1999) and with the individual in their group as a random effect.  
157 Post hoc comparisons after ANOVA were run using Least Square Differences (LSD). For  
158 data collected in phase 2, the same model was used without the effect of the phase.  
159 For data of test 2, the effects of the management (aversive *vs.* gentle management), the phase  
160 (phase 1 and 3) and the type of human (human in white *vs.* human in green *vs.* unknown  
161 human) and the interactions human\*management, phase\*management and phase\*human were  
162 tested using the MIXED procedure (generalization of the standard linear model with REML  
163 and ML estimation methods implemented with a Newton–Raphson algorithm, SAS Institute  
164 Inc., 1999) and with the individual in their group as a random effect. Post hoc comparisons  
165 after ANOVA were run using Least Square Differences (LSD). For data collected in phase 2  
166 (distance of approach), the same model was used without the effect of the phase.  
167 Values are expressed as means  $\pm$  SEM. Limit of significance was set at  $P = 0.05$ .

168

169

## Results

170

171 **Test 1**

172 **Management effect.** During each phase of the test, aversively treated animals had a lower  
173 number of crossed zones than gently treated animals. Gently treated animals increased their  
174 locomotion between phase 1 (without human) and phase 2 (with human) while aversively  
175 treated animals kept the same locomotion ( $F = 4.4$ ,  $P = 0.01$ , Fig. 1).

176 During phase 1 (without human), gently treated animals spent less time in human zone than  
177 aversively treated animals (Fig. 2). During phase 2 (with stationary human), gently treated  
178 animals spent more time in human zone than aversively treated animals ( $F = 25.4$ ,  $P < 0.0001$ ,  
179 Fig. 2).

180 Whatever the type of human, aversively treated animals took more time to approach human  
181 than gently treated animals ( $F = 3.2$ ,  $P = 0.05$ , Fig. 3). Gently treated animals had more  
182 contacts with familiar human (in white or in green) than aversively treated animals ( $F = 3.1$ ,  $P$   
183  $= 0.05$ , Fig. 4).

184

185 **Effect of human type.** Gently treated animals took more time to approach the unknown  
186 human than familiar humans in white and in green ( $F = 3.2$ ,  $P = 0.05$ , Fig. 3). They had more  
187 contacts with the human in green than with the human in white or the unknown human ( $F =$   
188  $3.1$ ,  $P = 0.05$ , Fig. 4). They stayed less time in the human zone with the unknown human than  
189 with the humans in white and in green (Fig. 5).

190 Aversively treated animals took significantly the same time to approach all types of human  
191 (humans in white and in green, unknown human) ( $F = 3.2$ ,  $P = 0.05$ , Fig. 3). Whatever the  
192 type of human, they had significantly the same number of contacts with human ( $F = 3.1$ ,  $P =$   
193  $0.05$ , Fig. 4) and spent significantly the same time in human zone ( $F = 4.6$ ,  $P = 0.01$ , Fig. 5).

9

194 All animals had a lower number of crossed zones with the unknown human than with the  
195 familiar humans in white or in green ( $F = 9.2, P < 0.0001$ , Fig. 6).

196

197 ***Interaction between management and type of human.*** Gently treated animals had more  
198 contacts with the human in white or the human in green than aversively treated animals (Fig.  
199 4). There was no significant difference between aversively and gently treated animals for the  
200 number of contacts with the unknown human ( $F = 3.1, P = 0.05$ , Fig. 4). Gently treated  
201 animals spent more time in human zone than aversively treated animals in presence of the  
202 human in white or the human in green (Fig. 5). There was no significant difference between  
203 aversively and gently treated animals for the time spent in human zone with the unknown  
204 human ( $F = 4.6, P = 0.01$ , Fig. 5).

205 Aversively treated animals had a lower number of crossed zones than gently treated animals  
206 in presence of familiar human (in green or in white, global interaction human\*management  $F$   
207  $= 2.7, P = 0.07$ , Fig. 7). There was no significant difference between aversively and gently  
208 treated animals for number of crossed zones in presence of the unknown human.

209

#### 210 ***Test 2***

211 ***Management effect.*** There was no significant difference between aversively and gently  
212 treated animals for the number of crossed zones ( $F = 7.9, P = 0.006$ , Fig. 8). Gently treated  
213 animals increased their number of crossed zones between phases 1 and 3 while aversively  
214 treated animals kept the same number of crossed zones between phases 1 and 3. For time  
215 spent in the human zone during phases 1 and 3, there was no significant difference between  
216 management ( $F = 0.2, P = 0.7$ ). All animals spent more time in human zone during phase 1  
217 than phase 3 (92.1 sec in phase 1 vs. 31.2 sec in phase 3;  $F = 288.2, P < 0.0001$ ).

10

218 The distance of escape for the moving human was higher for aversively treated animals than  
219 for gently treated animals ( $F = 21.9$ ,  $P < 0.0001$ , Fig. 9).

220

221 *Effect of the human characteristic.* For all animals, there was an effect of the type of  
222 human on the distance of escape with the highest distance with the unknown human and the  
223 lowest distance with the human in green ( $F = 5.3$ ,  $P = 0.008$ , Fig. 10).

224

225 There was no interaction between management and types of human.

226

## 227 Discussion

228

229 In our study, the management style focused for 19 consecutive weeks modulated the human-  
230 animal relationships: gentle management improved human-animal relationships while  
231 aversive management damaged this relation. During the stationary human test, aversively  
232 treated lambs spent less time in human zone, had a higher latency of approach the different  
233 humans (familiar human in white, familiar human in green and unknown human) and had  
234 fewer contacts with them than gently treated lambs. Moreover, aversively treated lambs had  
235 higher distance of escape humans than gently treated lambs during the moving human test.  
236 Aversively treated lambs were more frightened by all types of humans than gently treated  
237 lambs. Previous studies also showed that management style modulated the human-animal  
238 relationships. For example, Hemsworth et al. (1987) showed that pigs submitted to an  
239 unpredictable treatment (randomly-applied unpleasant and pleasant handlings) were more  
240 fearful of human than pigs submitted to a pleasant handling treatment, as indicated by less  
241 approach to a stationary human. Likewise, sheep submitted to aversive handling did not  
242 approach a stationary human compared to sheep submitted to gentle handling (Hild *et al.*,

243 2011). In addition, aversively treated lambs had lower number of crossed zones without  
244 human presence and with the different types of human than gently treated lambs in the  
245 stationary human test. Dantzer and Mormede (1983) have hypothesized that the experience of  
246 unavoidable aversive events are known to lead to apathy. Aversively treated lambs may  
247 perceive the isolation and presence of human as an unavoidable aversive event therefore they  
248 had less activity than gently treated lambs. Moreover, aversively treated lambs had a higher  
249 distance of escape than gently treated lambs. Two different types of fear-related reactions to a  
250 human are observed in sheep: a passive defensive reaction which involves immobilisation and  
251 glancing or gazing at the stimulus and an active defensive reaction which is associated with  
252 mobility and vocalisation (Vandehede et al., 1998). Thus, we can hypothesize that level of  
253 fear-related reaction was link to locomotion in our lambs according to the behaviour of the  
254 human: when the human was immobile, locomotion decreased in aversively treated animals.  
255 In contrast, when the human was moving, we observe an active defensive reaction associated  
256 with a higher distance of escape in aversively treated animals. In contrast, in gentle treated  
257 lambs, the gentle interactions seemed to have increased animal motivation to interact with  
258 humans. This result is in accordance with previous studies showing that the quality of the  
259 interactions with the familiar stockperson influenced the response of the lambs to his presence  
260 in the rearing pen (Tallet et al., 2005). Human contact especially stroking and feeding seems  
261 to be very important to induce a lasting improvement in the human-animal relationship  
262 (Boivin et al., 2000).

263

264 Aversively treated lambs had the same number of contacts, the same latency of approach, the  
265 same number of crossed zones and the same duration spent in human zone in presence of  
266 familiar human in white, familiar human in green and unknown human. Hence, aversively  
267 treated animals had the same fear-related reactions towards “gentle” human i.e. familiar

12

268 human in green which fed them, “aversive” human i.e. familiar human in white which  
269 negatively handled them and unknown human. We may suppose that aversively treated lambs  
270 generalized negative events with the familiar aversive human (wearing white clothes) to the  
271 presence of the familiar gentle human (wearing green clothes) or the unknown human  
272 (wearing white and black striped clothes) in their indoor pen. According to Estep and Hetts  
273 (1992), human-animal relationships are based on the history of interactions between the two  
274 individuals. During all along our experimentation, human wore white clothes for aversive  
275 events and green clothes for positive events. Hence, despite feeding with a human in green,  
276 aversive events with a human in white seemed to have damaged the human-animal  
277 relationships in aversively treated group. In confirmation of a number of experiments (for  
278 review Rushen et al., 1999b), aversively treated animals may tend to generalize aversive  
279 experiences with one handler to all other handlers. This generalization process may come  
280 from a pessimistic-like judgment bias of human presence. Doyle et al. (2011) showed a  
281 pessimistic-like judgment in chronically stressed sheep which negatively perceived  
282 ambiguous situations (e.g. they had a much lower frequency of approach to the ambiguous  
283 location of a reward than control lambs). Here, human presence may be perceived as an  
284 ambiguous situation because human could be aversive, gentle or unknown. Therefore animals  
285 may quickly generalise their fear responses from the familiar aversive person to the unknown  
286 one as a secure strategy.

287

288 Besides, independently of the management, all lambs had a higher distance of escape with the  
289 unknown human than with the familiar human wearing green clothes. Our results confirmed  
290 that sheep are able to discriminate individual humans as shown by Davis et al. (1998). The  
291 regular positive handling of the familiar human wearing green clothes could overcome a  
292 generalized fear of humans resulting from aversive handling as it has been observed in calves

293 by De Passillé et al. (1996). Hemsworth et al. (1994) found that pigs did not make such  
294 discriminations between humans but, rather, tended to generalize their fear due to aversive  
295 handling to all humans. This may reflect species differences or methodological differences  
296 between the studies. For example, the handlers wore overalls with the same color in  
297 Hemsworth's study. As Hemsworth et al. (1994) pointed out discrimination between humans  
298 would be easier if animals had a larger number of cues they can discriminate. In our study, the  
299 handlers were differently dressed to maximize the lambs' ability to tell them apart. However,  
300 the color of the clothes worn may not have been the only cue used by the sheep to distinguish  
301 between humans (e.g. facial cues Kendrick et al., 2001). In our study, gently treated lambs  
302 had higher latency of approach human, spent less time in human zone and had a lower number  
303 of crossed zones in presence of the unknown human than the familiar humans wearing green  
304 or white clothes. They had also fewer contacts with the unknown human than the familiar  
305 human in green. Gently treated lambs seemed to discriminate between humans and the results  
306 clearly showed the persistent impact of gentle interactions between lambs and the human  
307 wearing green clothes following on the subsequent lamb responses to their familiar  
308 stockperson. Boivin et al. (1997) demonstrated also that lambs can distinguish among  
309 different humans and that the knowledge of the shepherd has a great impact on the reactions  
310 of lambs to the human: bottle-fed lambs vocalized less, approached more quickly, and  
311 interacted more with the known than with an unknown shepherd. This increased approach  
312 behaviour to the human wearing green clothes by lambs may be a consequence of learning  
313 processes occurring during treatment such as conditioning. The presence of humans was  
314 associated with elements which may be rewarding to the animals such as petting by the  
315 experimenter and close investigation of the experimenter. However, Boivin et al. (1997)  
316 found that at 14 weeks the behaviour of the lambs was not different towards known and  
317 unknown handlers anymore. This may reflect methodological differences. In our study, the

318 gentle treated lambs still received gentle interactions compared to Boivin's study where the  
319 contacts were reduced after weaning.

320

321 To conclude, long-lasting exposure to unpredictable and uncontrollable aversive events with  
322 human seemed to damage the human-animal relationships in lambs while long-lasting  
323 exposure to positive events seemed to improve the human-animal relationships. Moreover,  
324 while aversively treated lambs seemed to generalize their fear of known stockman to  
325 unknown humans, gently treated lambs still showed different reaction toward humans  
326 according to their familiarity. The difference in behavior of the lambs observed towards the  
327 human dressed in a specific colour compared to the humans in other colours and the higher  
328 number of contacts suggests a specific relationship with this human.

329

### 330 **Acknowledgements**

331

332 The authors thank D. Chassaignes and B. Viillard of the experimental farm for animal care  
333 and help in data collection. This study was supported by the French National Research  
334 Agency (grant ANR-09-BLAN-0339-01) and the Région Auvergne.

335

### 336 **References**

- 337 Boivin, X., R. Nowak, G. Despres, H. Tournadre, and P. LeNeindre. 1997. Discrimination  
338 between shepherds by lambs reared under artificial conditions. *J. Anim. Sci.* 75: 2892-  
339 2898.
- 340 Boivin, X., H. Tournadre, and P. Le Neindre. 2000. Hand-feeding and gentling influence  
341 early-weaned lambs' attachment responses to their stockperson. *J. Anim. Sci.* 78: 879-  
342 884.
- 343 Dantzer, R., and P. Mormede. 1983. Stress in farm animals - A need for reevaluation. *J.*  
344 *Anim. Sci.* 57: 6-18.
- 345 Davis, H., C. Norris, and A. Taylor. 1998. Wether ewe know me or not: the discrimination of  
346 individual humans by sheep. *Behav. Process.* 43: 27-32.
- 347 De Passillé, A. M., J. Rushen, J. Ladewig, and C. Petherick. 1996. Dairy calves'  
348 discrimination of people based on previous handling. *J. Anim. Sci.* 74: 969-974.

15

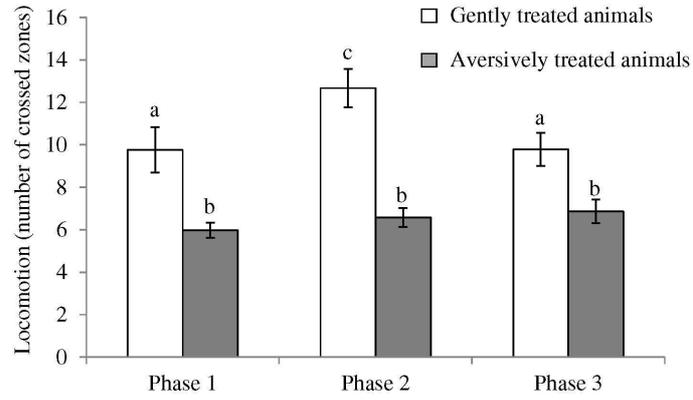
ScholarOne, 375 Greenbrier Drive, Charlottesville, VA, 22901

- 349 Désiré, L. et al. 2006. Appraisal process in sheep (*Ovis aries*): Interactive effect of suddenness  
350 and unfamiliarity on cardiac and behavioral responses. *J. Comp. Psychol.* 120: 280-  
351 287.
- 352 Doyle, R. E. et al. 2011. Measuring judgement bias and emotional reactivity in sheep  
353 following long-term exposure to unpredictable and aversive events. *Physiol. Behav.*  
354 102: 503-510.
- 355 Estep, D. Q., and S. Hetts. 1992. Interactions, relationships, and bonds: the conceptual basis  
356 for scientist-animal relations. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- 357 Hemsworth, P. H., J. L. Barnett, and C. Hansen. 1987. The influence of inconsistent handling  
358 by humans on the behaviour, growth and corticosteroids of young pigs. *Appl. Anim.*  
359 *Behav. Sci.* 17: 245-252.
- 360 Hemsworth, P. H., and X. Boivin. 2011. Human contact. Pages 246-262 in *Animal welfare,*  
361 *ed. Appleby, M. C. Mench J. A. Olsson I. A. S. Hughes B. O. CAB International.*
- 362 Hemsworth, P. H., G. J. Coleman, M. Cox, and J. L. Barnett. 1994. Stimulus generalization:  
363 the inability of pigs to discriminate between humans on the basis of their previous  
364 handling experience. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 40: 129-142.
- 365 Hemsworth, P. H., G. J. Coleman. 1998. Human-livestock interactions: the stockperson and  
366 the productivity and welfare of intensively farmed animals. Centre for Agriculture and  
367 Biosciences Int, Wallingford UK.
- 368 Hild, S., M. Coulon, A. Schroerer, I. L. Andersen, and A. J. Zanella. 2011. Gentle vs. aversive  
369 handling of pregnant ewes: I. Maternal cortisol and behavior. *Physiol. Behav.* 104:  
370 384-391.
- 371 Kendrick, K. M., A. P. da Costa, A. E. Leigh, M. R. Hinton, and J. W. Peirce. 2001. Sheep  
372 don't forget a face. *Nature* 414: 165-166.
- 373 Rushen, J., A. M. B. De Passille, and L. Munksgaard. 1999a. Fear of people by cows and  
374 effects on milk yield, behavior, and heart rate at milking. *J. of Dairy Sci.* 82: 720-727.
- 375 Rushen, J., A. A. Taylor, and A. M. de Passille. 1999b. Domestic animals' fear of humans and  
376 its effect on their welfare. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 65: 285-303.
- 377 Rybarczyk, P., J. Rushen, and A. M. de Passillé. 2003. Recognition of people by dairy calves  
378 using colour of clothing. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 81: 307-319.
- 379 Scherer, K. R. 1999. On the sequential nature of appraisal processes: Indirect evidence from a  
380 recognition task. *Cogn. Emot.* 13: 763-793.
- 381 Tallet, C., I. Veissier, and X. Boivin. 2005. Human contact and feeding as rewards for the  
382 lamb's affinity to their stockperson. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 94: 59-73.
- 383 Tanida, H., and Y. Nagano. 1998. The ability of miniature pigs to discriminate between a  
384 stranger and their familiar handler. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 56: 149-159.
- 385 Taylor, A. A., and H. Davis. 1998. Individual humans as discriminative stimuli for cattle (*Bos*  
386 *taurus*). *Appl. Anim. Behav. Sci.* 58: 13-21.
- 387 Vandenhede, M., M. F. Bouissou, and M. Picard. 1998. Interpretation of behavioural  
388 reactions of sheep towards fear-eliciting situations. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 58: 293-  
389 310.
- 390
- 391
- 392

393

394 Figure 1.

395



396

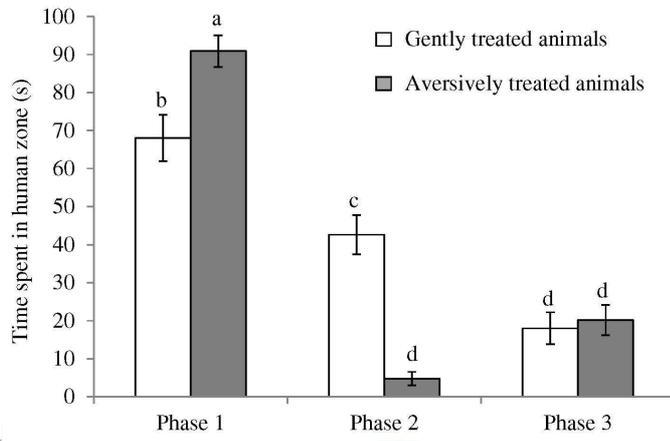
397

398

Peer Review

399 Figure 2.

400



401

402

403

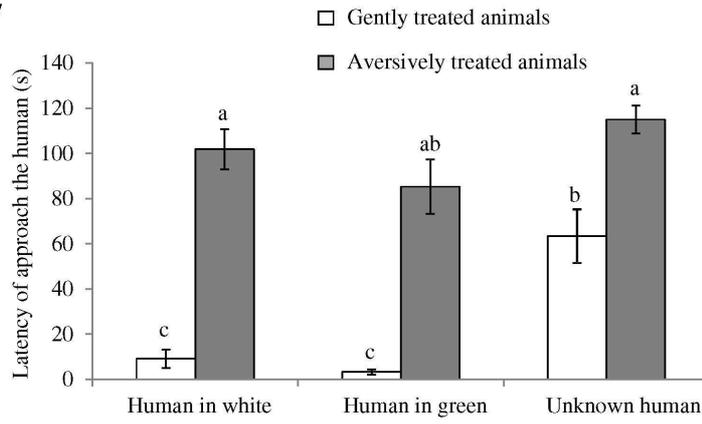
Peer Review

404

405 Figure 3.

406

407



408

409

410

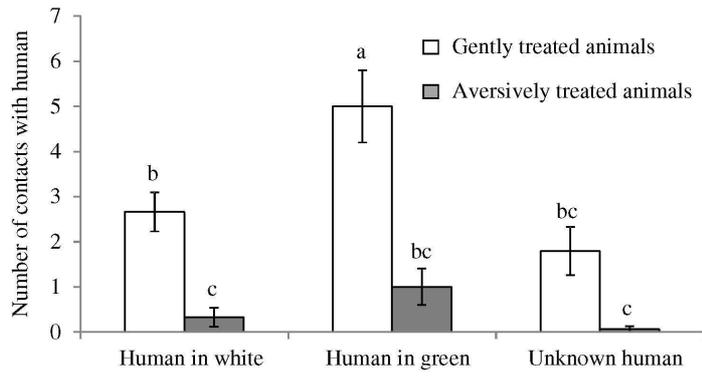
er Review

411

412

413 Figure 4.

414



415

416

417

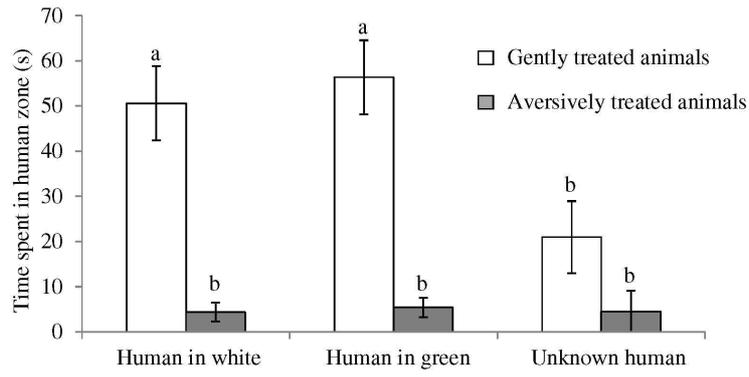
er Review

418

419 Figure 5.

420

421



422

423

424

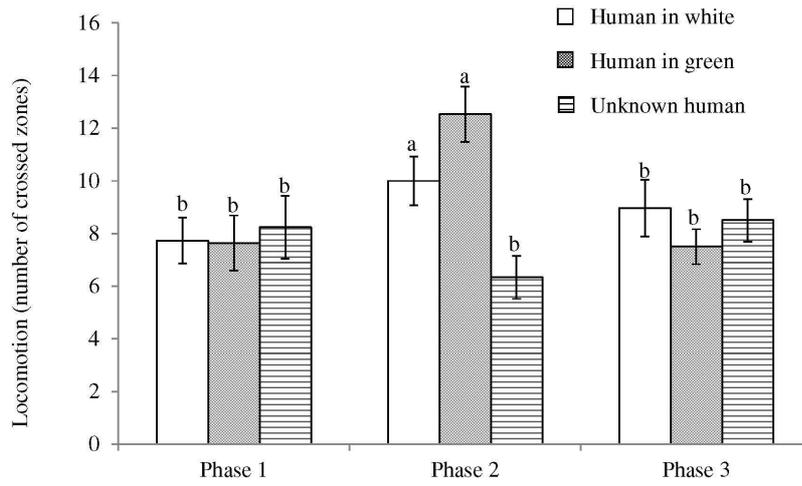
er Review

425

426 Figure 6.

427

428



429

430

431

432

review

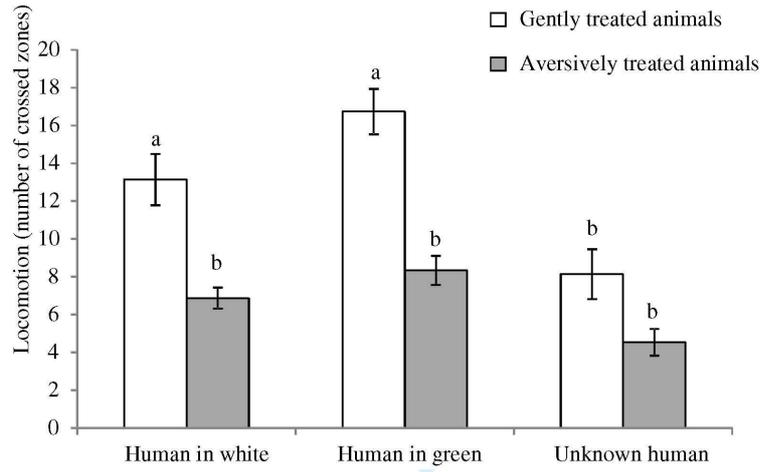
433  
434 Figure 7.

435

436

437

438



439

440

441

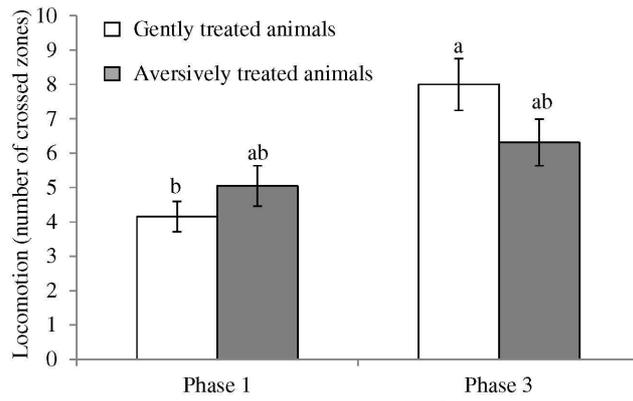
442

443 Figure 8.

444

445

446



447

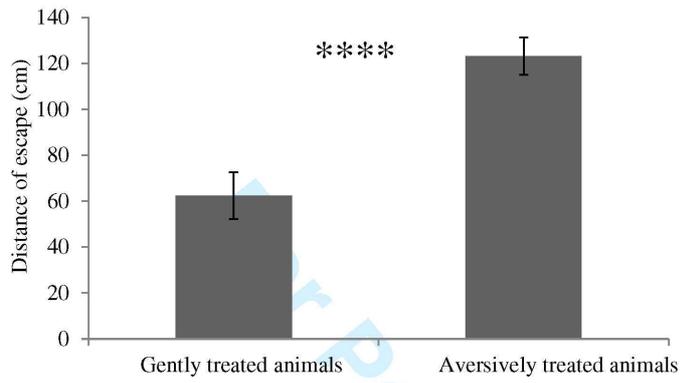
448

Review

449 Figure 9.

450

451



452

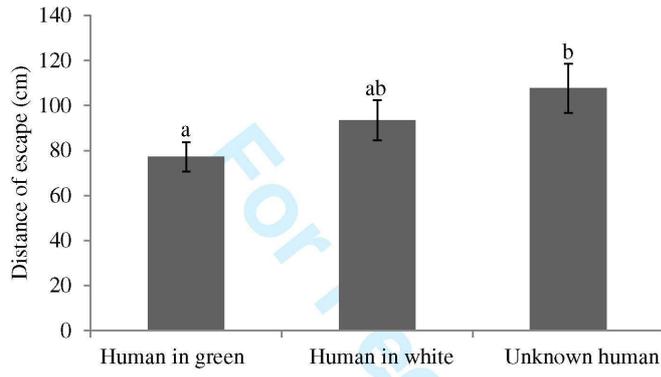
453

454

455 Figure 10.

456

457



458

459

460

461 **Figure captions**

462 Figure 1. Locomotion of gently and aversively treated animals during stationary human test  
463 (a, b and c, procmixed,  $F = 4.4$ ,  $P = 0.01$ ).

464 Figure 2. Time spent in human zone of gently and aversively treated animals during stationary  
465 human test (a, b, c and d, procmixed,  $F = 25.4$ ,  $P < 0.0001$ )

466 Figure 3. Latency of approach of the different types of human (human in white vs. human in  
467 green vs. unknown human) of gently and aversively treated animals during stationary human  
468 test (a, b and c, procmixed,  $F = 3.2$ ,  $P = 0.05$ )

469 Figure 4. Number of contacts with the different types of human (human in white vs. human in  
470 green vs. unknown human) of gently and aversively treated animals during stationary human  
471 test (a, b and c, procmixed,  $F = 3.1$ ,  $P = 0.05$ )

472 Figure 5. Time spent in human zone in function of the different types of human (human in  
473 white vs. human in green vs. unknown human) for gently and aversively treated animals  
474 during stationary human test (a and b, procmixed,  $F = 4.6$ ,  $P = 0.01$ )

475 Figure 6. Locomotion of animals in function of the different types of human (human in white  
476 vs. human in green vs. unknown human) during stationary human test (a and b, procmixed,  $F$   
477  $= 9.2$ ,  $P < 0.0001$ )

478 Figure 7. Locomotion of gently and aversively treated animals in function of the different  
479 types of human (human in white vs. human in green vs. unknown human) during stationary  
480 human test (a and b, procmixed,  $F = 2.7$ ,  $P = 0.07$ )

481 Figure 8. Locomotion of gently and aversively treated animals during moving human test (a  
482 and b, procmixed,  $F = 7.9$ ,  $P = 0.006$ )

483 Figure 9. Distance of escape of gently and aversively treated animals during moving human  
484 test (procmixed,  $F = 21.9$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ )

485 Figure 10. Distance of escape of all animals in function of the different types of human  
486 (human in white vs. human in green vs. unknown human) during moving human test (a and b,  
487 procmixed,  $F = 5.3$ ,  $P = 0.008$ )  
488  
489

For Peer Review

Table 1 Aversive events used during the 19-week aversive management.

Predator signals	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sheep dog handling <i>Lambs were moved in groups of five using a sheep dog, from their pens and along the corridors of the building</i></li> <li>• Aversive contact with a dog <i>A very big barking Beauceron dog (resembling a wolf) entered in or walked around the lambs' home pen</i></li> <li>• Howl of dogs and wolves <i>At fixed times the sound of howls was played during the night</i></li> <li>• Odours of dog's faeces <i>Boxes of dog faeces were placed in home pen</i></li> </ul>
Conspecific signals	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Odours of blood taken in slaughterhouse <i>Boxes of sheep blood taken in slaughterhouse were placed in home pen</i></li> <li>• Odours of urine taken in slaughterhouse <i>Boxes of sheep urine taken in slaughterhouse were placed in home pen</i></li> </ul>
Human signals	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Individual restraint <i>Shackles were fixed on the lambs' forelegs and head in home pen</i></li> <li>• Shearing <i>Woollen fleece of lamb was shorn off</i></li> <li>• Presence of a noisy man <i>Loud metallic noise was made by a man with a bar</i></li> <li>• Disturbance of the food distribution <i>Late or unreachable food was given</i></li> <li>• Wet bedding <i>Lambs stayed in a pen with wet bedding straw</i></li> <li>• Light during the night <i>At fixed hours light turned off by a programmer during the night</i></li> <li>• Crossing of a footbath <i>Lambs crossed a footbath with or without a shepherd dog</i></li> <li>• Transport in cattle truck <i>Lambs were transported in a truck</i></li> </ul>



---

**CHAPITRE 3 - RÉDUCTION DES ALTÉRATIONS COGNITIVES  
CONSÉCUTIVES À UN STRESS PAR L'INDUCTION  
D'EXPÉRIENCES ÉMOTIONNELLES POSITIVES**

---



#### Article 4

### **Est-ce que la diminution de l'anxiété sur des agnelles tend à réduire leur pessimisme?**

Alexandra Destrez, Véronique Deiss, Catherine Belzung, Caroline Lee et Alain Boissy, 2012.

*Applied Animal Behaviour Science*, 139 (2012) 233-241.

#### **1. Objectif**

De plus en plus d'études sur différents modèles animaux soulignent le rôle important des interactions entre les émotions et le processus d'évaluation de l'environnement. Les approches psychopharmacologiques représentent une démarche expérimentale intéressante pour tenter de manipuler l'état émotionnel des animaux et explorer ainsi les conséquences sur leur perception du monde environnant. Cependant, peu de travaux ont été réalisés sur les mammifères d'élevage pour lesquels il est pourtant nécessaire de parvenir à mieux comprendre les processus mentaux qui sous-tendent leurs états de bien-être. Le Diazepam offre une possibilité de manipuler de façon pharmacologique l'état affectif. Ce médicament est généralement utilisé chez l'homme pour ses propriétés anxiolytiques qui permettent de réduire les états affectifs négatifs. Néanmoins, les effets centraux de cette molécule ont été très peu étudiés chez les mammifères d'élevage. Dans cette étude sur agnelles, nous avons pour but par approche pharmacologique 1) d'évaluer l'effet du Diazepam sur la réactivité émotionnelle des agnelles, et 2) d'examiner si une diminution de la réactivité émotionnelle pouvait réduire leur perception négative d'événements ambigus. Des agnelles recevant une injection de Diazepam à une dose non sédative réagiraient moins à des situations anxiogènes et évalueraient de manière plus positive des événements environnementaux ambigus.

#### **2. Méthodes**

Quarante-huit agnelles ont été utilisées dans deux expériences consécutives. Dans l'Expérience 1, les agnelles avaient été habituées à un parc de test pendant 7 jours. Ce parc contenait une auge dans laquelle était distribuée de l'aliment 1 minute après l'entrée de l'animal. A l'issue de cette phase d'habituation, les 41 agnelles qui acceptaient de s'alimenter ont été exposées à un test anxiogène validé par ailleurs : soit un test d'isolement (21 agnelles) soit un test de soudaineté (20 agnelles). Quel que soit le test utilisé, la moitié des animaux recevaient une injection intraveineuse de Diazepam (0.10 mg/kg) et l'autre moitié une injection de solution saline en guise de témoin, 10 minutes avant l'exposition au test anxiogène. Dans l'Expérience 2, 20 agnelles choisies parmi les 41 ayant acceptées de

s'alimenter en isolement ont été entraînées individuellement à réaliser un comportement opérant de type go/no-go : elles devaient différencier spatialement deux positions du seau (à droite ou à gauche) au fond d'un parc de test. L'approche de l'une des deux positions était récompensée par de l'aliment (i.e., approche du seau) et l'approche de l'autre position était punie par la présentation d'un dispositif anxiogène (i.e., évitement du seau). Seize agnelles étaient parvenues au critère d'apprentissage discriminant. Ces agnelles ont alors été exposées de nouveau au dispositif mais cette fois-ci le seau était localisé dans 5 positions différentes : les 2 positions apprises (positive et négative) et 3 positions ambiguës placées plus ou moins proches de l'une des 2 positions apprises. La moitié des agnelles recevaient une injection intraveineuse de Diazepam et l'autre moitié une injection de solution saline. Elles étaient ensuite soumises au test du biais à deux reprises : 10 minutes et 3 heures après l'injection.

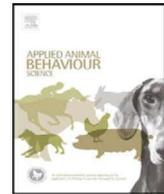
### **3. Résultats**

Dans l'Expérience 1, les agnelles qui avaient reçu une injection de Diazepam avaient une moindre réactivité à l'isolement ou à la soudaineté par rapport aux témoins. Dans l'Expérience 2, 3 heures après l'injection, les agnelles sous Diazepam tendaient à s'approcher plus rapidement que les témoins de la position intermédiaire la plus proche du seau récompensé. De plus, les agnelles sous Diazepam se sont approchées des seaux intermédiaires avec la même latence entre les tests réalisés 10 minutes et 3 heures après les injections, alors que les témoins ont mis beaucoup plus de temps à s'approcher des positions intermédiaires lors de la seconde reprise.

### **4. Discussion**

L'Expérience 1 a permis de vérifier l'effet anxiolytique du Diazepam chez le mouton. Les différences relevées lors de l'Expérience 2 reflètent un biais dans le jugement d'événements ambigus, qui serait lié à l'état émotionnel des animaux : les agnelles sous Diazepam tendent à avoir un jugement plus positif que les agnelles témoins. Un état émotionnel moins négatif induirait chez les ovins une perception plus positive des événements survenant dans l'environnement mais cela requière d'autres études, en particulier des études comparant la pertinence de l'approche des biais cognitifs (biais d'anticipation et/ou d'évaluation) par rapport à d'autres approches de l'état affectif des animaux.

→ Induction d'une représentation plus optimiste de l'environnement par la diminution pharmacologique de l'état réactionnel des animaux.



## Does reduction of fearfulness tend to reduce pessimistic-like judgment in lambs?

Alexandra Destrez<sup>a,\*</sup>, Véronique Deiss<sup>a</sup>, Catherine Belzung<sup>b</sup>, Caroline Lee<sup>c</sup>, Alain Boissy<sup>a</sup>

<sup>a</sup> INRA UMR 1213 Herbivores, F-63122 Saint-Genès-Champanelle, France

<sup>b</sup> INSERM UMR 930, Université François-Rabelais, Tours, France

<sup>c</sup> CSIRO Livestock Industries, Locked Bag 1, Armidale, NSW 2350, Australia

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Accepted 5 April 2012

Available online 24 April 2012

#### Keywords:

Welfare

Fear

Judgment bias

Optimistic-like

Diazepam

Sheep

### ABSTRACT

Recent studies emphasize the role of interactions between emotions and judgment of environment to better assess affective state in animals. Diazepam offers a way to pharmacologically manipulate the affective state. This drug is generally used to reduce negative affective states, mainly by reducing fearfulness. Here we investigated whether a reduction of fearfulness through a pharmacological approach could reduce pessimistic-like judgment in lambs. We tested the effects of diazepam (0.10 mg/kg), a benzodiazepine known for its anxiolytic properties in many species, in 5-months old female lambs submitted to two experiments: the first one to assess their fear-related reactions (cortisol, cardiac and behavioural measures) to isolation and suddenness tests, and the second one to assess their putative judgment bias. In experiment 1, the lambs treated with diazepam were less frightened by isolation and suddenness than the control lambs injected with vehicle, which tended to confirm the anxiolytic effect of diazepam on sheep. In experiment 2, the lambs were first trained to perform a spatial location task to test for judgment bias in sheep. This task required a go/no-go response according to the location of a bucket in a pen, with one location being reinforced positively (with a feed reward) and the other negatively (with a fan-forced blower). Once trained, lambs ( $n = 16$ ) were exposed twice (10 min and 3 h after injections) to five consecutive bucket locations: the two learnt locations plus three unrewarded, ambiguous locations set between the learnt locations. Control lambs increased their latency to approach one of the ambiguous bucket locations ( $P < 0.05$ ), while treated lambs maintained the same latency to approach this location. This difference may reflect a bias in judgment in relation to fearfulness: treated lambs seemed to display a more positive judgment of an ambiguous event than control lambs. Reduction of fearfulness may thus induce a more positive affective state but this requires further investigation, with additional studies comparing the efficacy of the cognitive bias approach to other measures of affective state.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

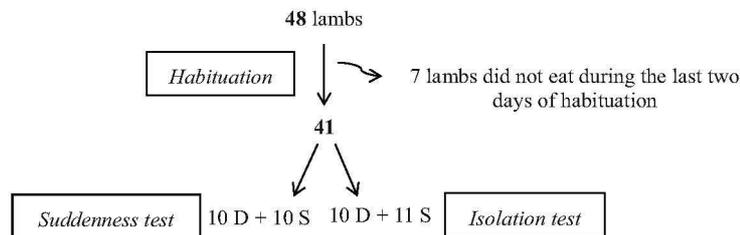
Animals have the ability to experience emotions i.e. brief affective reactions (Paul et al., 2005). Recent studies emphasize the role of interactions between emotions

and cognition to better assess welfare in animals (Desire et al., 2002; Paul et al., 2005; Boissy et al., 2007; Mendl et al., 2009). Here, cognition is defined as “mechanisms by which animals acquire, process, store and act on information from the environment” (Shettleworth, 2001). As originally shown in human studies (see for review Scherer, 1999), there is growing evidence that emotions in animals result from cognitive processes of appraisal based on elementary characteristics of a situation, from the simplest

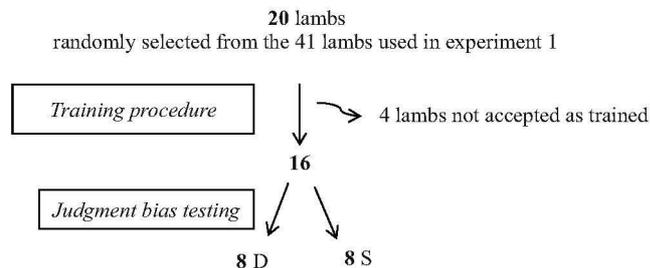
\* Corresponding author. Tel.: +33 473 62 40 94; fax: +33 473 62 41 18.  
E-mail address: [alexandra.destrez@clermont.inra.fr](mailto:alexandra.destrez@clermont.inra.fr) (A. Destrez).

D = Diazepam  
S = Saline

### Experiment 1. Effect of diazepam on fearfulness



### Experiment 2. Effect of diazepam on judgment bias



**Fig. 1.** Allocation of animals used in fearfulness and judgment bias tests. During judgment bias test, half of diazepam-treated animals and half of control animals had already received diazepam in fearfulness tests one month before.

(e.g. suddenness) to the most complex (e.g. controllability of an event). In turn, emotions can influence cognitive functions such as attention and mnemonic capacities by biasing environment perception, as widely shown in human psychology (see for review Clore and Huntsinger, 2007; Clore and Palmer, 2009; Lanteaume et al., 2009). For example, sad people were reported to make more negative judgments of ambiguous facial emotion expressions than happy people (Lee et al., 2008). Affective state disorders such as depression are also associated with both mnemonic deficits (explicit verbal and visual memory) and executive impairment (see for review Austin et al., 2001). People with depressive disorders exhibit a specific attention bias toward negative emotional cues (words, images and faces) and pay less attention to positive stimuli (Eizenman et al., 2003; Leppänen et al., 2004; Dai and Feng, 2011).

Experiments in laboratory animals and more recently in farm animals suggest that cognitive biases may be valuable indicators of animal affective states (Burman et al., 2008, 2009; Doyle et al., 2009). Furthermore, such biases in animals could help to understand how a state of stress-related discomfort develops. For instance, a persistent negative bias in environment perception may induce a negative affective state. Different judgment biases have been induced by environmental manipulations in animal studies. Exposure to long-term negative treatments induced a negative affective state particularly by pessimistic-like judgments in both laboratory animals (Harding et al., 2004; Burman et al., 2009) and farm animals (Doyle et al., 2010b). A few studies also report that an enriched environment may result in more positive or optimistic-like judgments in mammals (rats: Burman et al., 2008; dogs: Burman et al.,

2011) and in birds (Matheson et al., 2008). However, there is still a lack of information on affective states in farm animals.

To manipulate the affective state of animals, it is possible to use a pharmacological approach, such as that of Doyle et al. (2010a) in sheep. These authors showed that depletion of brain serotonin, a neurotransmitter involved in the etiology of major depression, caused pessimistic-like judgment bias. Diazepam, a classical benzodiazepine, also offers a way to pharmacologically manipulate the affective state in animals. Diazepam is generally used to reduce negative affective states: this drug has appeasing properties in various animal species (Hamed et al., 2009; Ibáñez and Anzola, 2009) and reduces fear, anxiety and frustration in cattle (Sandem et al., 2006). This being the case, will reduction of fearfulness (induced by diazepam) reduce pessimistic-like bias in animals? Fearfulness is generally defined as the propensity of an animal to be frightened to some degree following the perception of a danger (Boissy, 1998; Jones and Boissy, 2010).

In the present study, we examined the ability of diazepam treatment to induce a reduction of fearfulness (Experiment 1) which may induce an optimistic-like judgment bias (Experiment 2) in lambs, common small farm ruminants.

## 2. Methods

The experiments were carried out in accordance with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) and were approved by a local ethics committee (CE17-08 CEMEA Auvergne, France).

## 2.1. Animals and housing

For 2 weeks before the start of the habituation procedure and experiments, forty-eight Romane (Romanov  $\times$  Berrichon du Cher) female lambs (5 months of age) were kept in four indoor pens, each housing 12 lambs. The lambs were fed daily with concentrate in the morning (08:30 h) and with hay and straw mixed with molasses in the afternoon (16:00 h). The floor of each pen was bedded with straw and the room received artificial lighting from 07:30 h to 19:30 h. The lambs received no concentrate before each behavioural test to avoid lack of appetite. Concentrates were provided half an hour after completion of the test. The number of animals used for each experiment of this study is described in Fig. 1.

## 2.2. Administration of diazepam

Treated animals received an intravenous injection of diazepam at 0.10 mg/kg (0.02 mL/kg, water–ethanol solution). At this dose, diazepam induced an anxiolytic effect, but neither ataxia nor sedation (Wood and Harding, 1989). Control animals received saline in an equal volume. Four days before the first behavioural test, blood collections and injections were simulated daily on each lamb for habituation by jugular venepuncture, but no blood was collected. The animals were tested in 2 experiments, the first one to assess their fearfulness and the second one to assess a putative judgment bias.

## 2.3. Experiment 1

This experiment was designed to test the effect of diazepam on the fear-related reactions of lambs in two standardized tests. Animals ( $n=21$ ) from two home pens were tested in an isolation test; animals ( $n=20$ ) from the other two home pens were individually tested in a suddenness test (Fig. 1). Half of the animals from each home pen were treated with diazepam (0.10 mg/kg) and the other half with saline, 10 min before testing. The testing area (Fig. 2) consisted of a pre-test pen (waiting pen, 1.5 m<sup>2</sup>) and an arena test (4.5 m<sup>2</sup>) with wooden walls (1.5 m high). A sliding door allowed transit from one pen to another. The arena contained a food pellet delivery device at the side opposite to the entrance. The food delivery device consisted of a deck placed 30 cm above floor level with a central hole containing an adjustable trough 15 cm in diameter. Food pellets (25 g of barley extra) were dispensed in the trough by an automatic control system outside the arena.

### 2.3.1. Habituation and training procedure

The lambs were submitted to a habituation procedure lasting one week (between 09:00 h and 11:00 h). For two days, animals from the same home pen were placed in the arena and allowed to explore freely in groups of three, for about 3 min. For the next three days, each lamb was led individually to the arena test once a day, and stayed there for about 90 s. Barley was provided *ad libitum* in the trough on all five days of habituation. For the last two days of habituation, each lamb was placed in the arena for about 90 s, but the delivery of the food pellets was deferred until 1 min

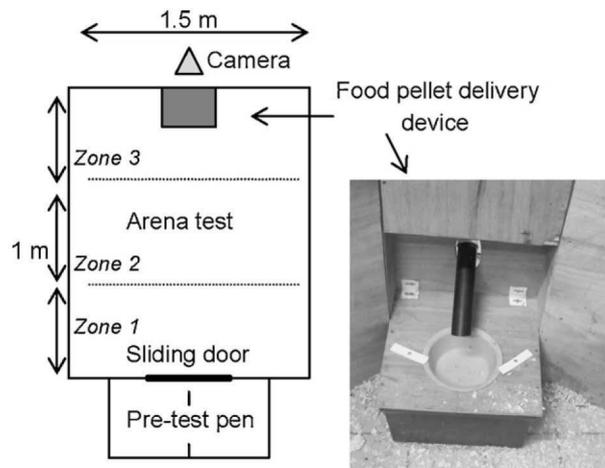


Fig. 2. The fearfulness testing facility. At each delivery, barley fell from the tube to the trough.

after the animal's entry. Food pellets (barley) that were not consumed were removed from the trough. Only animals that ate during the last two days of habituation ( $n=41$ ) underwent isolation and suddenness tests.

### 2.3.2. Experimental procedure

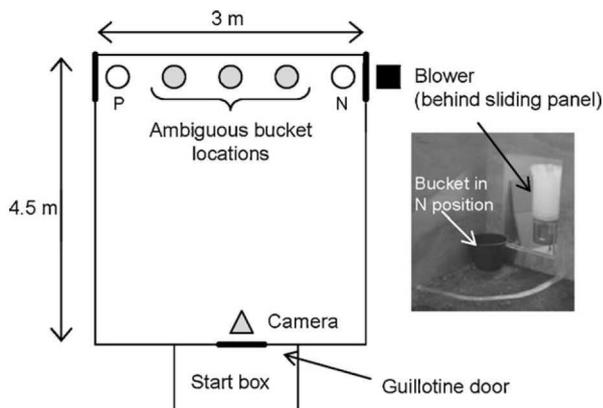
**2.3.2.1. Isolation test.** Each lamb was individually placed in the arena for 90 s. The food pellets were delivered 1 min after the animal had entered.

**2.3.2.2. Suddenness test.** A blue-and-white plastic panel 1 m above the trough was hidden behind a wooden board; 5 s after the lamb began to eat in the trough, an automatic device caused the panel to drop down suddenly and appear just behind the trough (speed about 2 m/s). The suddenness test lasted 90 s.

During the isolation and suddenness tests, various behavioural measurements of the tested animal were recorded (see Section 2.5 for details).

## 2.4. Experiment 2

This experiment was designed to assess the influence of diazepam on judgment bias of lambs. A facility (4.5 m  $\times$  3 m) with solid wooden walls (1.5 m high) was used as the test arena (Fig. 3). The lambs entered and exited by the drop-down door (i.e. guillotine door) of the start box. Wooden panels in the front corners of the test pen could also be raised to expose the lamb to the negative stimulus (an automatic blower). Habituation and training procedures (see description below) were performed on 20 lambs pseudo-randomly chosen from the 41 lambs used in the experiment 1 (Fig. 1). Only 20 lambs were chosen due to logistical limitations i.e. the judgment bias testing had to be completed in one day to prevent an effect of time. Judgment bias testing was performed one month after experiment 1 only on the lambs that had completed the operant task at the end of the training procedure (see description below).



**Fig. 3.** The judgment bias testing facility. For a lamb trained for the left corner to be positive (P) and the right corner to be negative (N) the three ambiguous locations are partially positive, central and partially negative from left to right.

#### 2.4.1. Habituation and training procedure

Over three days, the 20 lambs were habituated daily to the facility by entering in pairs and receiving a food reward. Next, for two days (five times a day), they were individually habituated to receiving a food reward in the bucket used throughout the experiment (25 g of barley). The lambs were then individually trained to complete an operant task, which required them to differentiate spatially between two different locations in the testing facility. This spatial differentiation task was adapted from the methodology used by Burman et al. (2008) and Doyle et al. (2009). The lambs were randomly assigned to either the left ( $n = 10$ ) or right ( $n = 10$ ) corner of the facility for positive training. Positive training involved the feed bucket being placed in the allocated corner and allowing the lamb to approach and eat from the bucket. This was performed daily in a session of five consecutive entries each lasting 25 s. After one week, negative training (13 days) was initiated, which involved splitting the five entries of the training session into negative or positive events. The fourth entries were run in a pseudo-random order (i.e. equal numbers of trials to both positive and negative events) and the fifth entry was always a positive event. This was done to prevent the last tested negative association masking the preceding positive associations made by the animals. For the negative event, the bucket was placed in the corner opposite the positive location. If a lamb approached within a 30 cm radius of the bucket, the side panel was lifted to reveal the blower. The negative bucket contained inaccessible barley (blocked by a shelf) to ensure that the choice made by lambs was the result of learning the paradigm and not due to olfactory cues. As soon as the lamb retreated away from the 30 cm radius the panel was lowered and the blower stopped. On each entry a lamb was allowed 25 s to approach the bucket before the response was deemed no-go. For lambs to be accepted as trained they had to approach all positive buckets (go response) and not approach any negative buckets (no-go response) in two consecutive training sessions.

#### 2.4.2. Experimental procedure (judgment bias testing)

After 4 weeks of training, 16 out of the 20 animals used were accepted as trained. The other animals ( $n = 4$ ) were not accepted as trained due to repeatedly not eating from the positive bucket. The trained animals were pseudo-randomly chosen and assigned to a treatment ( $n = 8$ ) or a control group ( $n = 8$ ). The two groups had equal numbers of left and right positively trained lambs.

All the animals were tested twice in the test pen: 10 min after the injections of diazepam or saline (minimum time needed to experience the anxiolytic effects of diazepam (Kreeger et al., 1991), Session 1) and 3 h (minimum time needed to test all the lambs in the test pen during the first session, Session 2). The judgment bias test involved presenting the feed bucket in three ambiguous locations in addition to the two learnt locations, one at a time. The three ambiguous locations were: a partially positive location (L+, 0.5 m from the positive corner of the facility), a central location (L, 1 m from both corners of the facility), and a partially negative location (L-, 0.5 m from the negative corner of the facility). The three ambiguous buckets were empty to limit the formation of positive or negative associations during Session 2. Firstly positive (rewarded with food) and secondly negative (unrewarded with blower) bucket positions were presented for 25 s each to reinforce learning in the lambs. The three ambiguous locations were then presented one by one, for 25 s each in the order L+/L-/L 10 min after injections, and L/L+/L- 3 h after injections. If the lamb did not approach within a 30 cm radius of a bucket in 25 s, its response was deemed no-go response and the animal was released from the test facility. The go/no go response of the lambs to the buckets was recorded to assess judgment bias.

#### 2.5. Equipment for behavioural and physiological measurements

Three days before the fearfulness tests, lambs underwent a habituation procedure to familiarise them with the heart rate monitoring equipment. Lambs were caught in their home pen, and an elastic belt was strapped around their thorax for 1 h. Cardiac activity was recorded throughout the fearfulness tests via a Polar Vantage NV system (Polar, Anglet, France). The system consisted of two electrodes, an emitter and a watch-like receiver, fixed to an elastic belt strapped around the animal's thorax. Heart rate (beats per min, bpm), possible indicator of emotional response (Palestrini et al., 1998), was recorded as averages over 5 s intervals. The data file created on the emitter was downloaded onto a computer for analysis.

Throughout the period of fearfulness and judgment bias tests, various behavioural measurements (see Table 1 for a description of the behavioural measures) on the tested animal were recorded with cameras (Sony Corp., Tokyo, Japan) overlooking the test pens and connected to a video recorder (Sony SVT-96LP, Sony Corp., Tokyo, Japan). Subsequent analysis of video tapes was carried out using The Observer v. 5.0 software (Noldus, Wageningen, The Netherlands).

Blood samples (5 mL, anticoagulant: EDTA) were collected twice from the jugular vein to determine (i) basal level of plasma cortisol in the morning (between 08:00 h and 10:00 h) during the habituation period for the

**Table 1**  
Description of observed activities during fearfulness tests.

Activity	Description	Context
Crossed zones (n°)	Number of zone crossings of (see Fig. 1)	Isolation test
Time in zone 1–3 (s)	Time spent in each zone (see Fig. 1)	Suddenness test
Jump (n°)	Number of jumps against the wall	
Vigilance (s)	Time spent without locomotion, head in an upright position, ears immobile or moving back and forward	
Vocalisations <sup>a</sup> (n°)	Number of bleats with mouth closed or opened	
Looking at the trough (s)	Time spent with head oriented towards the trough (more than 20 cm)	
Contact with the trough (s)	Time spent with head oriented towards or in contact with the trough (less than 20 cm)	
Feeding (s)	Taking food into the mouth, chewing or investigating food, nose in the trough	
Urination/defecation (n°)	Excreting urine or faeces	
Startle responses (s)	Number of reactions which include a general contraction of several muscles of the body	Suddenness test
Approach the bucket (s)	Latency between lamb entry (when the guillotine door was closed) and approach within a 30 cm radius of the bucket	Judgment bias

<sup>a</sup> Noted manually.

reactivity tests, and (ii) level of plasma cortisol per individual 20 min after the end of the tests. Plasma cortisol is known to be an acute-stress hormone (Mormède et al., 2007).

## 2.6. Assays

Blood samples were immediately centrifuged at  $3000 \times g$  for 10 min and plasma samples were stored at  $-20^\circ\text{C}$  until determination of cortisol concentrations. Plasma cortisol levels were determined by a radioimmunoassay method (Boissy and Bouissou, 1994) using an antibody produced by Cognié and Poulin (INRA, Tours, France). The detection limit was 0.02 ng/mL and the within- and between-assay CV values were 6.5% and 13% for low controls (4 ng/mL) and 11% and 13% for high controls (32 ng/mL).

## 2.7. Statistical analysis

The SAS software (version sas9x, SAS/STAT Inst., Cary, NC, USA) was used to analyse data. Behaviour and cortisol data from the fearfulness tests (isolation and suddenness tests), and cortisol data from the judgment bias test met the requirements for parametric tests (i.e. normality) in either an untransformed or a transformed state. These data were analysed using ANOVAs for mixed models with treatment and home pen as fixed effects. *Post hoc* comparisons were performed with least square means differences (LSD) using Tukey-Kramer adjustment.

Data from the judgment bias test (latencies for the subjects to approach the different bucket locations) were non-normally distributed and so could not be analysed with traditional parametric statistics. A randomisation test (resampling statistical technique also called permutation test) was used with 10,000 replications and statistic  $T$  calculated as  $|\text{mean}_{\text{treated}} - \text{mean}_{\text{control}}|$  (method described by Adams and Anthony, 1996; Manly, 2007).

The significance limit was set at  $P=0.05$ .

## 3. Results

### 3.1. Experiment 1

#### 3.1.1. Isolation test (Table 2)

During separation from group members a significant effect of the treatment was observed on animals' vigilance. Treated animals were less vigilant than control animals ( $P=0.015$ ). Other behavioural measures (locomotion, looking at and contact with the trough, feeding and vocalisation) did not differ between groups ( $P>0.1$ ). Likewise, cardiac activity did not differ between treated and control groups ( $175.0 \pm 10.3$  vs.  $153.0 \pm 5.2$  bpm;  $F=2.5$ ;  $P=0.1339$ ). Also, the treated group had lower cortisol levels ( $2.91 \pm 0.79$  ng/mL) than the control group ( $6.72 \pm 1.48$  ng/mL) after the isolation test ( $F=5.34$ ;  $P=0.0329$ ).

#### 3.1.2. Suddenness test

Before the appearance of the sudden panel, the behaviours of treated and control groups did not differ ( $F<2.40$ ;  $P>0.98$ ). Behaviours observed after the sudden panel are shown in Table 3. Lambs from the diazepam-treated group made more contact with the trough ( $P=0.039$ ) and had a strong tendency to eat more than lambs from the control group ( $P=0.052$ ). They also tended to spend more time in zone 3 (zone of the trough,  $P=0.060$ ). Cardiac activity did not differ between treated and control groups either before the sudden panel ( $148.3 \pm 10.6$  vs.  $160.6 \pm 6.7$  bpm;  $F=1.18$ ;  $P=0.30$ ) or after the sudden panel ( $156.5 \pm 10.9$  vs.  $150.3 \pm 7.2$  bpm;  $F=0.16$ ;  $P=0.70$ ). Likewise, plasma cortisol levels did not differ between treated and control groups ( $14.6 \pm 7.99$  vs.  $9.3 \pm 2.42$  ng/mL;  $F=0.003$ ;  $P=0.955$ ).

### 3.2. Experiment 2

#### 3.2.1. Latency for lambs to approach the different bucket locations

The results presented in Fig. 4 show latencies to approach the different bucket locations during the two

**Table 2**

Main behaviours observed in treated (injection of diazepam) and control (injection of saline) animals during the isolation test. Means  $\pm$  standard errors are presented and statistically compared between treated and control animals.

Activity	Treated group (n=11)	Control group (n=10)	F	P-value
Zone1 (s)	29.1 $\pm$ 19.5	26.7 $\pm$ 29.6	0.000	0.995
Zone2 (s)	10.1 $\pm$ 4.60	11.6 $\pm$ 10.1	0.598	0.451
Zone3 (s)	61.4 $\pm$ 26.4	52.6 $\pm$ 30.7	0.033	0.859
Looking at the trough (s)	12.1 $\pm$ 4.88	10.3 $\pm$ 4.46	0.162	0.693
Vigilance (s)	3.75 $\pm$ 4.17	11.92 $\pm$ 8.27	7.369	0.015
Contact with the trough (s)	24.64 $\pm$ 17.07	18.59 $\pm$ 23.47	0.352	0.561
Feeding (s)	22.89 $\pm$ 10.93	15.96 $\pm$ 6.63	2.550	0.129
Vocalization (number)	9.1 $\pm$ 2.4	6.9 $\pm$ 2.2	0.024	0.878

sessions. A significant difference between positive and negative bucket locations was observed for both treated ( $T > 16.3$ ,  $P < 0.001$ ; 10 min and 3 h after injection) and control ( $T > 17.6$ ,  $P < 0.001$ ; 10 min and 3 h after injection) animals during the two sessions. There was no significant effect of treatment on latencies to approach the different bucket locations: 10 min after injection (positive:  $T = 2.6$ ,  $P = 0.56$ ; L+:  $T = 1.0$ ,  $P = 0.86$ ; L:  $T = 2.2$ ,  $P = 0.79$ ; L-:  $T = 2.2$ ,  $P = 0.46$  and negative:  $T = 3.9$ ,  $P = 0.20$ ) and 3 h after injection (positive:  $T = 3.2$ ,  $P = 0.21$ ; L+:  $T = 9.3$ ,  $P = 0.065$ ; L:  $T = 5.0$ ,  $P = 0.37$ ; L-:  $T = 0$ ,  $P = 1$  and negative:  $T = 0$ ,  $P = 1$ ). Control lambs increased their latency to approach the L+ bucket (Session 1:  $9.47 \pm 3.40$  vs. Session 2:  $16.68 \pm 3.72$  s;  $T = 7.3$ ,  $P = 0.04$ ). Treated lambs maintained the same latency to approach the L+ bucket between the two sessions (Session 1:  $8.46 \pm 2.88$  vs. Session 2:  $7.43 \pm 2.69$  s;  $T = 1.0$ ,  $P = 0.98$ ). For the other bucket locations no difference was observed between the two groups.

Differences in latencies to approach the buckets between the two sessions are shown in Fig. 5. At the second session (3 h after injection) the control lambs had increased latency to approach the L+ bucket compared with treated lambs ( $T = 8.2$ ,  $P = 0.001$ ).

### 3.2.2. Cortisol levels

Plasma cortisol levels did not differ between treated and control groups during either Session 1 ( $11.2 \pm 3.5$  vs.  $12.0 \pm 2.6$  ng/mL,  $F = 0.042$ ;  $P = 0.841$ ) or Session 2 ( $8.3 \pm 1.8$  vs.  $14.6 \pm 3.2$  ng/mL,  $F = 3.03$ ;  $P = 0.105$ ).

## 4. Discussion

This study sought to determine whether treatment with diazepam, known to reduce fearfulness, could alter the perception of the environment in lambs.

Diazepam was expected to reduce the behavioural and physiological responses to a challenging situation in lambs. During the isolation test, treated animals were less vigilant than controls. Alertness postures are considered to be a passive fear response (Boissy et al., 2005). After the sudden event, treated animals showed a strong tendency towards spending more time eating. This effect could relate to a diazepam-induced increase in feeding motivation: the effects of benzodiazepine on food motivation are well characterised, for example, different doses of diazepam given intramuscularly (0.25–2.0 mg/kg) increased both food taking and food seeking in baboons (Foltin, 2001). Also, administration of diazepam (0.2, 0.4 and 0.8 mg/kg) dose-dependently induced feeding in sated gray wolves (Kreeger et al., 1991). However, here we observed that before the sudden event there was no significant difference in feeding behaviours between control and treated lambs. Similarly in the judgment bias test, latencies to approach the positive bucket were not different between the two groups. The differences in time spent eating, time near the trough and therefore near the sudden panel may thus be explained by lessened fearfulness to suddenness in lambs treated with diazepam (Forkman et al., 2007). Treated lambs had lower cortisol levels at the end of the isolation test. This effect is consistent with studies in humans reporting that diazepam generally influences the hypothalamic–pituitary–adrenal axis activity by reducing basal ACTH and cortisol release only in individuals experiencing some degree of stress (Roybyrne et al., 1988). This effect of benzodiazepine was not observed after the suddenness test in our study, possibly owing to ceiling effects; in the control group, the level of cortisol was much higher than in the isolation test, and it may be that the diazepam was able to counteract the cortisol increase only when the glucocorticoid level was not too high.

**Table 3**

Main behaviours observed in treated (injection of diazepam) and control (injection of saline) animals during the suddenness test. Means  $\pm$  standard errors are presented and statistically compared between treated and control animals.

Activity	Treated group (n=9)	Control group (n=11)	F	P-value
Zone1 (s)	9.08 $\pm$ 6.81	13.9 $\pm$ 8.78	1.251	0.287
Zone2 (s)	3.24 $\pm$ 3.37	4.65 $\pm$ 3.93	0.480	0.503
Zone3 (s)	18.2 $\pm$ 8.69	9.11 $\pm$ 7.10	4.381	0.060
Looking at the trough (s)	5.61 $\pm$ 2.52	7.54 $\pm$ 5.70	0.663	0.433
Vigilance (s)	3.34 $\pm$ 4.48	4.30 $\pm$ 6.38	0.114	0.742
Contact with the trough (duration/frequency)	1.41 $\pm$ 1.65	0.04 $\pm$ 0.10	5.469	0.039
Contact with trough (s)	2.99 $\pm$ 4.66	0.04 $\pm$ 0.10	3.001	0.111
Feeding (s)	9.36 $\pm$ 5.14	3.32 $\pm$ 4.80	4.741	0.052
Vocalisation (number)	2.6 $\pm$ 1.21	4.3 $\pm$ 1.31	0.886	0.359

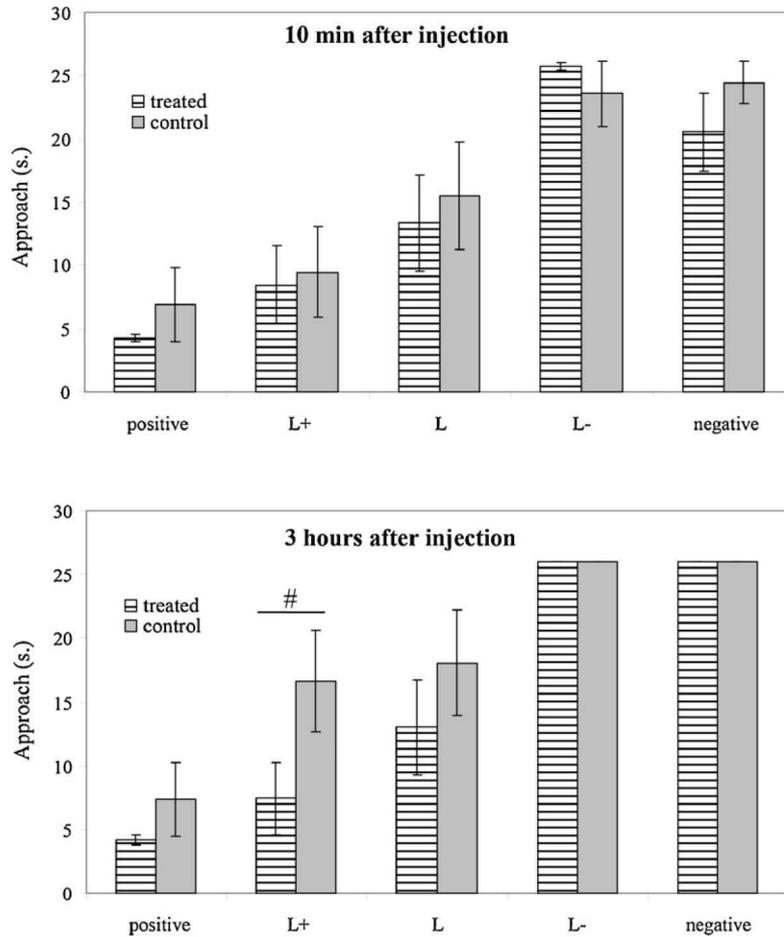


Fig. 4. Latencies to approach the bucket for treated (0.10 mg/kg diazepam;  $n=8$ ) and control animals (saline;  $n=8$ ) respectively 10 min and 3 h after the injection. The judgment bias test involved presenting the feed bucket in three ambiguous locations (L+, L and L-) in addition to the two learnt locations (positive and negative), one at a time. The three ambiguous locations were presented in the order L+/L-/L 10 min after injections, L+/L-/L- 3 h after injections. Means of latencies ( $\pm$ standard error) are presented and statistically compared between treated and control animals using a randomisation test (10,000 replications, # $P<0.1$ ).

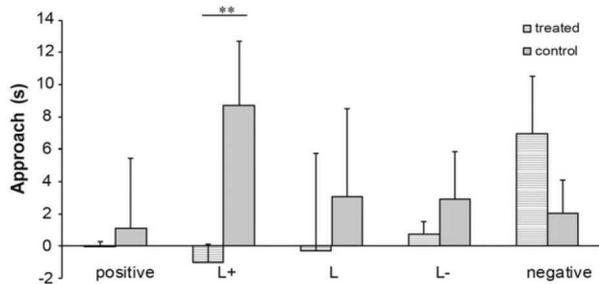


Fig. 5. Differences in latencies (of approach to the bucket) between the second and first session of the judgment bias test. Animals were tested twice in the test pen: 10 min (first session) and 3 h (second session) after the injections of diazepam (treated animals) or saline (control animals). The judgment bias test involved presenting the feed bucket in three ambiguous locations (L+, L and L-) in addition to the two learnt locations (positive and negative), one at a time. Means of differences of latencies ( $\pm$ standard error) are presented and statistically compared between treated ( $n=8$ ) and control ( $n=8$ ) animals using a randomisation test (10,000 replications, \*\* $P<0.01$ ).

To validate anxiolytic-like effects of diazepam on sheep, significant differences were found but only in a few measures. However many studies showed that benzodiazepines could reduce fear by changing a few parameters in other species, for example by reducing the percentage of white in the eye of dairy cows (Sandem et al., 2006), by reducing anxious and aggressive behaviours in dogs (Ibáñez and Anzola, 2009) and by decreasing aversive vocalisations in rats (Hamed et al., 2009). During judgment bias testing, lambs were tested twice with a 3 h interval between the two sessions. Clearly, if the effects of diazepam had worn off 3 h after injection, then this interval would have compromised the experiment to compare lambs' behaviour between the two sessions. However, as the half-life of diazepam is more than 20 h (Riss et al., 2008), we could confidently expect its effects on lambs' fearfulness to be the same during both sessions.

As expected from previous studies (Burman et al., 2009; Doyle et al., 2009), trained lambs discriminated accurately between positive and negative reference locations during the judgment bias test, and this ability was shown not to be

influenced by treatment. By contrast, the lambs' responses to one of the ambiguous locations (bucket L+) were influenced by treatment to some extent. Control lambs were slower during Session 2 than during Session 1 to approach bucket L+, while treated lambs did not change their motivation to rapidly approach this bucket.

A judgment bias could explain responses to the ambiguous location. Judgment assessment is a cognitive measure of affective state (Doyle et al., 2010b) and an indicator of short-term changes in anxiety (Burman et al., 2009; Doyle et al., 2009) for animals. Unlike control lambs, during the two sessions treated lambs approached the ambiguous location (L+) with the same latency. Possible explanations for this result include that the treated lambs having a more positive interpretation of the judgment task (i.e. an optimistic-like judgment), or they become more indifferent to the rewarding values of various bucket positions than the control lambs, or control lambs learnt that ambiguous locations were unreinforced, whereas treated lambs did not. If changes in information processing can be reliable indicators of affective state, as suggested by human psychology research (Amir et al., 2005) and more recently by several studies in animals (Paul et al., 2005; Mendl et al., 2009), then our results may suggest that after diazepam injection, treated lambs were in a more positive affective state than control lambs.

Other explanations can also account for the effect of treatment on responses to ambiguous locations: different mnemonic capacities, different feeding motivation, and different pattern separation. Regarding the putative effect on mnemonic capacities, Clark et al. (1979) showed that a single 10 mg intravenous injection of diazepam produced anterograde amnesia for the 14–24 min period immediately after injection. In our study, we can hypothesize that in the second session control lambs remembered that the L+ bucket was not positively reinforced and so increased their latency to approach it, while treated lambs forgot that the L+ bucket was empty. However Tronche et al. (2010) reported that diazepam (0.5 mg) administered to stressed middle-aged mice is able to restore a contextual serial memory performance. Also, latencies to approach the L and L– buckets of treated and control groups were not different between the two sessions. Treated lambs also discriminated accurately between positive and negative learnt locations, and this ability was not influenced by treatment. Hence a difference in mnemonic capacities between the groups did not seem to be the main cause of the influence of treatment.

A second explanation could be an effect of diazepam on feeding motivation. However, this is unlikely; as discussed previously, in fearfulness tests there was no effect on feeding motivation, and latency to approach the positive bucket was not different between control and treated groups.

A reduction of pattern separation after diazepam treatment could also explain the behavioral effect. Bakker et al. (2008) described pattern separation as the process of transforming similar representations or memories into highly dissimilar representations. During our experiment, all the buckets looked the same (the three ambiguous buckets and the two reference buckets). The only difference was their location in the test pen (cf. Fig. 2). Diazepam could

modify pattern separation of treated animals that were unable to differentiate between positive and L+ bucket locations. However, both treated and control lambs were able to distinguish between other buckets, for example L and L– bucket locations.

The effect of diazepam on the responses to ambiguous location therefore may be explained by a bias of the cognitive process involving judgment. To further validate our hypothesis, additional experiments are required, first using new behavioural tests assessing affective state more directly than classical fear-related tests, and then using other cognitive bias tests (e.g. attention and learning tests) (Burman et al., 2011) and also more specific anxiolytic drugs.

## 5. Conclusion

In our study we found some evidence to confirm a tendency for anxiolytic-like effects of diazepam on sheep with treated lambs being less fearful than control lambs. During judgment bias testing, treated lambs seemed to display an optimistic-like judgment toward a particular ambiguous event compared with control lambs. Reduction of fear may induce a less negative affective state, reflected by a more positive interpretation of the judgment task, but this requires further investigation, with additional studies comparing the efficacy of the cognitive bias approach to other measures of affective state.

## Acknowledgements

This experiment could not have taken place without the assistance of D. Chassaignes for animal care and help in data collection. Authors are also very grateful to H. Chandèze, C. Ravel, E. Delval and S. Andanson for their help in data collection and analysis. They would like to acknowledge Nicolas Rossignol for his statistical advice. This study was supported by the French National Research Agency (grant n° ANR-09-BLAN-0339-01) and the Région d'Auvergne.

## References

- Adams, D.C., Anthony, C.D., 1996. Using randomization techniques to analyse behavioural data. *Anim. Behav.* 51, 733–738.
- Amir, N., Beard, C., Bower, E., 2005. Interpretation Bias and Social Anxiety. *Cognitive Ther. Res.* 29, 433–443.
- Austin, M.P., Mitchell, P., Goodwin, G.M., 2001. Cognitive deficits in depression – possible implications for functional neuropathology. *Br. J. Psychiatry* 178, 200–206.
- Bakker, A., Kirwan, C.B., Miller, M., Stark, C.E.L., 2008. Pattern separation in the human hippocampal CA3 and dentate gyrus. *Science* 319, 1640–1642.
- Boissy, A., 1998. Fear and fearfulness in determining behavior. In: Grandin, T. (Ed.), *Genetics and the behavior of domestic animals*. Academic Press, San Diego, pp. 67–111.
- Boissy, A., Bouissou, M.F., 1994. Effects of androgen treatment on behavioural and physiological responses of heifers to fear-eliciting situation. *Horm. Behav.* 28, 66–83.
- Boissy, A., Bouix, J., Orgeur, P., Poindron, P., Bibe, B., Le Neindre, P., 2005. Genetic analysis of emotional reactivity in sheep: effects of the genotypes of the lambs and of their dams. *Genet. Sel. Evol.* 37, 381–401.
- Boissy, A., Manteuffel, G., Jensen, M.B., Moe, R.O., Spruijt, B., Keeling, L.J., Winckler, C., Forkman, B., Dimitrov, I., Langbein, J., Bakken, M., Veissier, I., Aubert, A., 2007. Assessment of positive emotions in animals to improve their welfare. *Physiol. Behav.* 92, 375–397.

- Burman, O., McGowan, R., Mendl, M., Norling, Y., Paul, E., Rehn, T., Keeling, L., 2011. Using judgement bias to measure positive affective state in dogs. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 132, 160–168.
- Burman, O.H.P., Parker, R., Paul, E.S., Mendl, M., 2008. A spatial judgement task to determine background emotional state in laboratory rats, *Rattus norvegicus*. *Anim. Behav.* 76, 801–809.
- Burman, O.H.P., Parker, R.M.A., Paul, E.S., Mendl, M.T., 2009. Anxiety-induced cognitive bias in non-human animals. *Physiol. Behav.* 98, 345–350.
- Clark, E.O., Glanzer, M., Turndorf, H., 1979. Pattern of memory loss resulting from intravenously administered Diazepam. *Arch. Neurol.* 36, 296–300.
- Clore, G.L., Huntsinger, J.R., 2007. How emotions inform judgment and regulate thought. *Trends Cogn. Sci.* 11, 393–399.
- Clore, G.L., Palmer, J., 2009. Affective guidance of intelligent agents: how emotion controls cognition. *Cogn. Syst. Res.* 10, 21–30.
- Dai, Q., Feng, Z., 2011. Deficient interference inhibition for negative stimuli in depression: an event-related potential study. *Clin. Neurophysiol.* 122, 52–61.
- Desire, L., Boissy, A., Veissier, I., 2002. Emotions in farm animals: a new approach to animal welfare in applied ethology. *Behav. Process.* 60, 165–180.
- Doyle, R.E., Fisher, A.D., Hinch, G.N., Boissy, A., Lee, C., 2009. Release from restraint generates a positive judgement bias in sheep. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 122, 28–34.
- Doyle, R.E., Hinch, G.N., Fisher, A.D., Boissy, A., Henshall, J.M., Lee, C., 2010a. Administration of serotonin inhibitor p-Chlorophenylalanine induces pessimistic-like judgement bias in sheep. *Psychoneuroendocrinology* 36, 279–288.
- Doyle, R.E., Vidal, S., Hinch, G.N., Fisher, A.D., Boissy, A., Lee, C., 2010b. The effect of repeated testing on judgement biases in sheep. *Behav. Process.* 83, 349–352.
- Eizenman, M., Yu, L.H., Grupp, L., Eizenman, E., Ellenbogen, M., Gemar, M., Levitan, R.D., 2003. A naturalistic visual scanning approach to assess selective attention in major depressive disorder. *Psychiat. Res.* 118, 117–128.
- Foltin, R.W., 2001. Effects of amphetamine, dexfenfluramine, diazepam, and other pharmacological and dietary manipulations on food “seeking” and “taking” behavior in non-human primates. *Psychopharmacology* 158, 28–38.
- Forkman, B., Boissy, A., Meunier-Salauen, M.C., Canali, E., Jones, R.B., 2007. A critical review of fear tests used on cattle, pigs, sheep, poultry and horses. *Physiol. Behav.* 92, 340–374.
- Hamed, A., Jaroszowski, T., Maciejak, P., Szyndler, J., Lehner, M., Kamecka, I., Olczak, M., Kuzinska, U., Taracha, E., Plaznik, A., 2009. The effects of buspirone and diazepam on aversive context- and social isolation-induced ultrasonic vocalisation. *Physiol. Behav.* 98, 474–480.
- Harding, E.J., Paul, E.S., Mendl, M., 2004. Animal behavior – cognitive bias and affective state. *Nature* 427, 312–312.
- Ibáñez, M., Anzola, B., 2009. Use of fluoxetine, diazepam, and behavior modification as therapy for treatment of anxiety-related disorders in dogs. *J. Vet. Behav.* 4, 223–229.
- Jones, B., Boissy, A., 2010. Fear and other emotions. In: Appleby, M.C., Mench, J.A., Olsson, I.A.S., Hughes, B.O. (Eds.), *Animal Welfare*, 2nd edition. CAB International, Cambridge, pp. 78–97.
- Kreeger, T.J., Levine, A.S., Seal, U.S., Callahan, M., Beckel, M., 1991. Diazepam-induced feeding in captive graywolves (*Canis-Lupus*). *Pharmacol. Biochem. Behav.* 39, 559–561.
- Lanteaume, L., Bartolomei, F., Bastien-Toniazzo, M., 2009. How do cognition, emotion, and epileptogenesis meet? A study of emotional cognitive bias in temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Behav.* 15, 218–224.
- Lee, T.M.C., Ng, E.H.H., Tang, S.W., Chan, C.C.H., 2008. Effects of sad mood on facial emotion recognition in Chinese people. *Psychiat. Res.* 159, 37–43.
- Leppänen, J.M., Milders, M., Bell, J.S., Terriere, E., Hietanen, J.K., 2004. Depression biases the recognition of emotionally neutral faces. *Psychiat. Res.* 128, 123–133.
- Manly, B.F.J., 2007. Randomization, Bootstrap and Monte Carlo Methods in Biology. Chapman & Hall, New York.
- Matheson, S.M., Asher, L., Bateson, M., 2008. Larger, enriched cages are associated with ‘optimistic’ response biases in captive European starlings (*Sturnus vulgaris*). *Appl. Anim. Behav. Sci.* 109, 374–383.
- Mendl, M., Burman, O.H.P., Parker, R.M.A., Paul, E.S., 2009. Cognitive bias as an indicator of animal emotion and welfare: emerging evidence and underlying mechanisms. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 118, 161–181.
- Mormède, P., Andanson, S., Aupérin, B., Beerda, B., Guémené, D., Malmkvist, J., Manteca, X., Manteuffel, G., Prunet, P., van Reenen, C.G., Richard, S., Veissier, I., 2007. Exploration of the hypothalamic–pituitary–adrenal function as a tool to evaluate animal welfare. *Physiol. Behav.* 92, 317–339.
- Palestrini, C., Ferrante, V., Mattiello, S., Canali, E., Carenzi, C., 1998. Relationship between behaviour and heart rate as an indicator of stress in domestic sheep under different housing systems. *Small Ruminant Res.* 27, 177–181.
- Paul, E.S., Harding, E.J., Mendl, M., 2005. Measuring emotional processes in animals: the utility of a cognitive approach. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 29, 469–491.
- Riss, J., Cloyd, J., Gates, J., Collins, S., 2008. Benzodiazepines in epilepsy: pharmacology and pharmacokinetics. *Acta Neurol. Scand.* 118, 69–86.
- Roybyrne, P.P., Risch, S.C., Uhde, T.W., 1988. Neuro-endocrine effects of Diazepam in normal subjects following brief painful stress. *J. Clin. Psychopharmacol.* 8, 331–335.
- Sandem, A.I., Janczak, A.M., Salte, R., Braastad, B.O., 2006. The use of diazepam as a pharmacological validation of eye white as an indicator of emotional state in dairy cows. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 96, 177–183.
- Scherer, K.R., 1999. On the sequential nature of appraisal processes: indirect evidence from a recognition task. *Cogn. Emot.* 13, 763–793.
- Shettleworth, S.J., 2001. Animal cognition and animal behaviour. *Anim. Behav.* 61, 277–286.
- Tronche, C., Beracochea, D., Liscia, P., Coutan, M., Pierard, C., 2010. P.1.c.019 Effects of diazepam on contextual serial memory and hippocampal corticosterone in stressed middle-aged mice. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 20, S245–S246.
- Wood, G.A., Harding, R., 1989. The effects of pentobarbitone, diazepam and alcohol on oral breathing in neonatal and mature sheep. *Respir. Physiol.* 75, 89–104.



**L'exposition répétée à des évènements positifs chez des agnelles stressées chroniquement favorise leur perception d'évènements positifs mais exacerbe leur réactivité aux évènements anxiogènes.**

Alexandra Destrez, Véronique Deiss, Christine Leterrier, Ludovic Calandreau, et Alain Boissy, 2012

*Psychoneuroendocrinology*, en préparation.

**1. Objectif**

Chez les animaux, une expérience émotionnelle plus ou moins longue modifie les capacités d'adaptation des animaux, que ce soit leurs réactions immédiates ou leurs performances d'apprentissage. Par exemple, un stress chronique biaise les processus de jugement des animaux en situation ambiguë et/ou altère leurs performances d'apprentissage. A l'inverse, quelques exemples chez diverses espèces d'animaux rapportent qu'un enrichissement de l'environnement peut induire une perception optimiste. Néanmoins, peu d'auteurs se sont intéressés aux « effets thérapeutiques » d'une expérience émotionnelle positive sur les effets délétères consécutifs à stress chronique préalable. Dans cette expérimentation, nous avons pour but d'examiner si une exposition répétée à des évènements positifs pouvait limiter les réactions de peur et le pessimisme chez des moutons stressés chroniquement.

**2. Méthodes**

Quinze agnelles ont été soumises à un traitement de stress chronique pendant 6 semaines (groupe SC). Ce traitement validé par ailleurs correspondait à une exposition quotidienne à des évènements aversifs divers pouvant avoir lieu en élevage. Les animaux étaient exposés à ces évènements de manière imprévisible intervenant aussi bien de jour que de nuit et incontrôlable.

Quinze autres agnelles (groupe SCP) étaient soumises au même traitement de stress chronique pendant la même durée. Au bout de 3 semaines de traitement, des évènements positifs étaient surajoutés dans l'environnement de ces agnelles : la présence dans le parc d'élevage d'une brosse pour se gratter ou d'objets à explorer, des contacts tactiles positifs avec l'homme et l'anticipation de la distribution de nourriture grâce à l'utilisation d'un signal lumineux déclenché trente minutes avant le moment de la distribution.

Avant le début de la période de traitement, toutes les agnelles avaient été entraînées à approcher (position positive) versus à éviter (position négative) un seau d'aliment selon sa

position dans un dispositif spécifique de test. A la fin du traitement, les agnelles étaient individuellement exposées à des tests standardisés :

- (i) le test d'approche/évitement du seau, sachant qu'en plus des deux positions apprises (positive et négative), le seau pouvait être placé dans trois positions ambiguës placées entre les deux positions apprises (une plus proche de la position positive, une au centre, une plus proche de la position négative). Il s'agissait d'appréhender ici un éventuel biais de jugement au travers du type de réactions vis-à-vis du seau dans les positions ambiguës.
- (ii) des tests de réactivité : une exposition individuelle en situation de test à la nouveauté puis à la soudaineté, et une exposition en groupe à un homme immobile dans le parc d'élevage.

### **3. Résultats**

Lors du test de jugement, le groupe SCP approchaient plus vite le seau que le groupe SC lorsqu'il était placé en position intermédiaire la plus proche de l'emplacement récompensé (positif). Les agnelles du groupe SCP étaient plus réactives lors des tests de nouveauté et de soudaineté, et s'approchaient plus de l'homme que les agnelles du groupe SC.

### **4. Discussion**

Les agnelles stressées chroniquement qui ont en plus été exposées de manière répétée à des événements positifs surajoutés, se comportent de manière plus optimistes et tolèrent plus l'homme que les agnelles également stressées mais non enrichies. Par contre, elles se caractérisent aussi par une réactivité à la nouveauté et à la soudaineté exacerbée. Cette exposition répétée à des événements positifs semble donc pouvoir limiter certains effets cognitifs délétères du stress chronique. D'autres études sont nécessaires pour affiner le processus d'enrichissement et valider cette procédure comme véritable méthode comportementale susceptible de limiter le développement d'un état affectif négatif voire d'instaurer un état affectif positif susceptible d'améliorer le bien-être des animaux en conditions d'élevage.

→ Limitation de certains effets délétères induits par un stress chronique (jugement négatif des situations ambiguës positives et perception négative de l'homme) par une exposition répétée à des événements positifs.

**Repeated exposure to positive events enhances optimistic-like judgment and fearfulness  
in chronically stressed sheep**

Alexandra Destrez<sup>1</sup>, Véronique Deiss<sup>1</sup>, Christine Leterrier<sup>2</sup>, Ludovic Calandreau<sup>2</sup>, Alain Boissy<sup>1</sup>

<sup>1</sup> INRA, UMR 1213 Herbivores, F-63122 Saint-Genès Champanelle, France

<sup>2</sup> INRA, UMR 85 PRC, F-37380 Nouzilly, France

\* To whom correspondence should be addressed: alexandra.destrez@hotmail.fr

Tel: +33 473 62 44 50

Fax: +33 473 62 41 18

## 16 **Summary**

17 Chronic stress in farm animals can induce detrimental effects in emotional sensitivity and  
18 cognitive function, for example, by altering fearfulness and eliciting pessimistic-like  
19 judgment. Based on a few experiments carried out on laboratory animals, we suggest that  
20 exposing chronically stressed sheep to an enriched environment could alleviate the  
21 detrimental stress-induced effects on fearfulness and judgment. Fifteen lambs (Chronically  
22 Stressed lambs, CS) were submitted for 7 weeks to a treatment known to induce chronic stress  
23 (i.e. unpredictable exposure to various uncontrollable and aversive events every day and/or  
24 night). Fifteen other lambs (lambs exposed to Negative and Positive events, NP) were also  
25 submitted to the same stressful treatment and, for the last 4 weeks of the stressful treatment,  
26 exposed daily to various positive events, i.e. wool brush, positive contact with humans and  
27 anticipation of food by a light announcing daily food distribution. Before the treatment, all  
28 lambs were individually trained to spatially differentiate between positive and negative  
29 reinforced bucket locations with a go/no-go approach response. At the end of the treatment,  
30 each lamb was exposed to a judgment test using the same go/no-go procedure by offering it  
31 three ambiguous and unreinforced bucket locations plus the two learnt locations. In addition,  
32 lambs were exposed to three standard tests of fearfulness (exposure to novelty, suddenness  
33 and human).

34 NP lambs displayed a more positive judgement bias: they approached the bucket placed at the  
35 ambiguous location that was closest to the positive one faster than CS lambs ( $P < 0.05$ ). NP  
36 lambs were also more reactive to novelty and suddenness and approached the human more  
37 than their counterparts. Thus, repeated exposure to positive events in chronically stressed  
38 animals enhances optimistic-like judgment but also increases emotional reactivity. Further  
39 studies are necessary before promoting such a positive treatment as a method to alleviate  
40 negative effects of chronic stress.

41

42 **1. Introduction**

43

44 In everyday life, humans and animals may be repeatedly and unpredictably exposed to  
45 potentially aversive acute events, such as social separation and mixing, transport and changes  
46 of environment or food. This long-lasting exposure to aversive events may induce a chronic  
47 stress state which can result in various detrimental effects in emotional sensitivity and  
48 cognitive functions, as has been widely studied in laboratory animals (for review Willner,  
49 1997). For instance, in rats, a 10-day exposure to aversive events (restraint, wet bedding, cold  
50 exposure, turning off the lights, forced swimming, isolation and food and water deprivation)  
51 increases fearfulness (Cruz *et al.*, 2012). Fearfulness is defined as a component of  
52 temperament characterised by the inherent and/or acquired propensity of an individual to be  
53 easily frightened in a variety of alarming situations (Boissy, 1998). Chronic stress can also  
54 significantly alter brain structures such as the hippocampus (Magarinos and McEwen, 1995;  
55 McKittrick *et al.*, 2000) and result in cognitive deficiencies such as learning deficits (for  
56 review Conrad, 2010). For example, chronically stressed mice display reversal learning  
57 deficits (Knapman *et al.* 2010). Recent studies in laboratory animals report that chronic stress  
58 can also alter the cognitive component of affective states, inducing judgement biases such as  
59 pessimistic-like judgment (Burman *et al.*, 2009; Harding *et al.*, 2004). Chronic stress can also  
60 alter relational behaviour such as sexual (Retana-Márquez *et al.*, 2003) and maternal  
61 behaviour (Pardon *et al.*, 2000).

62 Detrimental effects of chronic stress on emotions and cognitive functions have also been  
63 reported in farm animals. For instance, chronic stress alters fearfulness in pigs, cattle and  
64 sheep (respectively: Broom, 1987; Boissy *et al.*, 2001; Destrez *et al.*, 2012b). Chronic stress  
65 also alters cognitive functions, particularly the cognitive component of affective states. For  
66 instance in sheep, chronic stress induces judgement biases, such as pessimistic-like judgment

67 of the environment (Doyle et al., 2011; Doyle et al., 2010; Destrez et al., 2012a). In addition,  
68 various modifications in social behaviours under chronic stress are reported, such as in pigs  
69 (De Jonge *et al.*, 1996). For example, gilts which are chronically stressed by an inconsistent  
70 treatment (stroking the pig 1 on 5 times and forcing the pig away 4 on 5 times whenever it  
71 approached the experimenter) are more fearful of humans than control gilts (Hemsworth *et*  
72 *al.*, 1987).

73

74 In contrast to the negative effects of chronic stress, a long-lasting experience of enrichment  
75 produces positive effects on cognitive functions (for review, van Praag *et al.*, 2000). For  
76 example, recent studies report optimistic-like judgments under enriched environment in  
77 mammals (dogs: Burman *et al.*, 2011; rats: Burman *et al.*, 2008) and in birds (Matheson *et al.*,  
78 2008). Likewise, rearing animals in enriched environments can improve discrimination and  
79 reversal learning capacities in dogs (Milgram et al., 2004) and long-term memory in a maze  
80 test in pigs (de Jong et al., 2000). What is more interesting but little studied is, as recent  
81 studies on laboratory animals suggest, that various stress-induced negative effects can be  
82 alleviated after a long-lasting experience of enrichment. For example, chronically stressed  
83 animals exposed to an environmental enrichment reduce their fear-related reactions in a  
84 defensive withdrawal test (Qian *et al.*, 2008), display an optimistic judgment bias towards  
85 ambiguous stimuli (Brydges *et al.*, 2010) and express spatial learning and memory  
86 performances normally impaired by chronic stress (Chen et al., 2010; Wright and Conrad,  
87 2008). However, no such alleviation of stress-induced effects by enrichment has yet been  
88 found in farm animals, despite the fact that they can be frequently exposed to stressful events.

89

90 In this study, we investigate in sheep whether a repeated exposure to positive events could  
91 alleviate detrimental chronic stress-induced effects on fearfulness and the cognitive

92 component of affective state. Positive events were based on the principle of cognitive  
93 enrichment (Boissy *et al.*, 2007) such as positive animal/human relations (Tallet *et al.*, 2005),  
94 anticipation of positive events (e.g. signalled food delivery) (Imfeld-Mueller *et al.*, 2011),  
95 exploration of several objects added to the familiar environment (Burman *et al.*, 2008) and  
96 natural behaviour (Mooring *et al.*, 2006). To assess the effects of long-lasting exposure to  
97 positive events in chronically stressed sheep, behavioural tests validated for sheep to assess  
98 fearfulness (Désiré *et al.*, 2004) and judgement (Doyle *et al.*, 2011) were used.

99

## 100 **2. Materials and methods**

101 The experiment was carried out in accordance with the European Communities Council  
102 Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) and was approved by a local ethics committee  
103 (CE1-11 CEMEA Auvergne, France).

104

### 105 **2.1. Animal details**

106 Thirty Romane (Romanov x Berrichon-du-Cher) female lambs of 4 months of age were  
107 housed in six indoor pens, each housing five lambs. Animals were fed a daily ration of  
108 concentrate in the morning (0830 h) and hay and straw in the afternoon (1600 h). The floor of  
109 the pen was bedded with straw and the room received artificial lighting from 0730 h to 1930  
110 h. Lambs received half of their concentrate prior to each behavioural test to avoid lack of  
111 appetite. The other half of the concentrate was provided 30 min after test completion (between  
112 1030 h and 1600 h). Timing of experimental design and behavioural tests is described in  
113 Figure 1.

114

### 115 **2.2. Experimental design**

116 Fifteen lambs (Chronically Stressed lambs, CS) were submitted in groups, over 7 weeks, to a  
117 treatment that had been validated to induce chronic stress, i.e. unpredictable exposure to  
118 various uncontrollable and aversive events, every day and/or night (Destrez et al., 2012b).  
119 These events, regularly encountered in farming systems, were classified into 3 classes known  
120 to be biologically significant for sheep: predator, conspecific and human cues (Table 1).  
121 Fifteen other lambs (lambs exposed to Negative and Positive events, NP) were submitted in  
122 groups to the same stressful treatment and exposed daily for the 4 latter weeks of the  
123 treatment to various positive events, i.e. familiar objects (balls, plastic tubes and tires)  
124 introduced into the home environment and randomly changed, wool brushing, positive tactile  
125 contacts with humans and anticipation of food delivery (Table 2, Figure 2).  
126 In order to help animals to discriminate human beings *via* the colour of their clothing (Rushen  
127 et al., 1999b), for all animals, experimenters wore white clothes during aversive events, green  
128 clothes during food delivery and grey-red-striped clothes during tests. For only NP lambs,  
129 experimenters wore green clothes during positive events. .

130

### 131 **2.3. Fearfulness tests**

132 The testing area close to the home pens (an average of 20 metres away) consisted of a pre-test  
133 pen (waiting pen, 1.5 m<sup>2</sup>) and a test arena (4.5 m<sup>2</sup>) made of wooden walls (1.5 m high). A  
134 sliding door allowed passage from one pen to another. The test arena contained a bucket at the  
135 opposite side of the entrance containing food pellets (25g of concentrate and barley).

136 After the first 6 weeks of treatment, the lambs were submitted to a habituation procedure  
137 lasting one week. For two days, animals of the same home pen were allowed to freely explore  
138 the test arena in pairs for 180 s with concentrate and barley offered *ad libitum* in the bucket.  
139 During the next five days, each lamb was led individually to the test arena once a day and  
140 stayed there for 75 s. Animals that ate food from the bucket during the last two days of

141 habituation were exposed to two successive standard fear-eliciting tests: novelty and  
142 suddenness tests (Désiré et al., 2004). Each animal was tested in each test situation and its  
143 behaviours were recorded (Table 3).

144

#### 145 **2.3.1 Novelty test**

146 The lamb entered the test arena where a novel white-and-orange traffic cone (height 50 cm)  
147 had been placed 20 cm in front of the food-filled bucket. The test lasted 75 s.

148

#### 149 **2.3.2 Suddenness test**

150 A blue-and-white plastic panel was held at 1 m above the bucket behind a wooden board  
151 ('hidden up' position). An automatic device operated a sudden vertical movement of the panel  
152 (at a speed about 2 m/s) from the 'hidden up' position to a 'visible down' position just behind  
153 the bucket. This automatic device was triggered 5 seconds after the lamb began to eat from  
154 the bucket. The test lasted 75 s.

155

#### 156 **2.3.3 Human test**

157 Two days after having been tested in novelty and suddenness tests, all animals were exposed  
158 by group to a motionless human in their home pen. For each home pen, a familiar human in  
159 green clothes entered quietly in the home pen and sat at the opposite side of the pen to the  
160 entrance. Two zones (Z) were established: Z1, 1 m around the observer and Z2, the rest of the  
161 pen. A direct 30-second scan-sampling method was used to evaluate the number of times each  
162 lamb was in Z1 for 10 min.

163

#### 164 **2.4 Judgment test**

165 In order to assess the cognitive component of the affective state, each lamb was exposed to a  
166 judgment test. A facility (4.5 x 3 m) with solid wooden walls (1.5 m high) was used as test  
167 arena (Figure 3). The lambs entered and went out via the guillotine door of the start box.  
168 Wooden panels in the front corners of the test pen could be raised to expose the lamb to the  
169 negative stimulus (an automatic blower).

170

#### 171 *Habituation and training procedure*

172 One month before treatment, all animals followed a habituation and a training procedure.  
173 Over the first 3 days, all 30 lambs were daily habituated to the facility by entering in groups  
174 of 3 and receiving a food reward. Then, during the 3 following weeks, the lambs were trained  
175 to complete an operant task, which required them to spatially differentiate between two  
176 different locations in the testing facility. This spatial differentiation task was adapted from  
177 methodology used by Burman et al. (2008) and Doyle et al. (2009). The lambs were randomly  
178 assigned either the left or the right corner of the facility for positive training. Positive training  
179 sessions involved the feed bucket being placed in the allocated corner and allowing the lamb  
180 to approach and eat from the bucket (25g of concentrate and barley). This was done over a  
181 daily session of five consecutive entries, each entry lasting 25 seconds. After two weeks,  
182 negative training (5 days) was initiated and involved splitting the five consecutive entries into  
183 negative or positive events. The first entry was always a positive event and the second entry  
184 always a negative event to teach these rules to the animals. The following three entries were  
185 done in a random order. 'Negative event' involved the bucket being placed in the alternate  
186 corner to the positive location. If the lamb approached within a 30 cm radius of the bucket,  
187 the side panel lifted to reveal the blower. The negative bucket contained unreachable barley  
188 (blocked by a shelf) to be sure that the choice of lambs resulted from learning the paradigm  
189 and not from an olfactory cue. As soon as the lamb retreated from the 30 cm radius the panel

190 was lowered and the blower stopped. Upon each entry the lamb had 25 seconds to approach  
191 the bucket before this was deemed a 'no-go' response. For the lambs to be classified as  
192 trained they had to approach all positive buckets (a 'go' response) and not approach any  
193 negative buckets (a 'no-go' response) for two consecutive training sessions.

194 Of the 30 animals, 26 were successfully trained (14 CS and 12 NP) before the start of the  
195 stressful treatment. Afterwards, throughout the treatment period, trials were repeated once  
196 weekly as a reminder (one session of 5 entries).

197

#### 198 *Experimental procedure: judgment testing*

199 After the 7 weeks of treatment, each of the 26 trained lambs was exposed to the judgement  
200 test in the same test arena. Judgment assessment involved presenting the bucket in three  
201 ambiguous locations between the two learnt locations one at a time. The three ambiguous  
202 locations were i) a partially positive location (L+, 0.5 m from the positive corner of the  
203 facility), ii) a central location (L, 1 m from both corners of the facility), and iii) a partially  
204 negative location (L-, 0.5 m from the negative corner of the facility). The bucket in the three  
205 ambiguous locations was empty. Firstly positive and secondly negative bucket positions were  
206 presented to refresh the training. Then, the three ambiguous locations were presented in this  
207 order: L+/L-/L. If the lamb did not approach within a 30 cm radius of the bucket within 25  
208 seconds this was deemed a no-go response and the animal was released from the test facility.  
209 Number of animals with a go-response for each bucket's location, latency of approach for  
210 each bucket's location and number of vocalizations were recorded.

211

#### 212 **2.5 Physiological parameters**

213 In addition to the behavioural analysis, the cardiac reactivity and cortisol response of lambs in  
214 novelty, suddenness and judgment tests were studied. Cardiac activity was recorded for

215 novelty and suddenness tests (for the 75-second period of the test) and for the judgment test  
216 (for 15 seconds just before entering the test arena). Blood samples (5 mL, anticoagulant:  
217 EDTA) were collected from the jugular 20 minutes after the end of each tests to assay  
218 cortisol.

219

## 220 **2.6 Equipment and assays**

221 During all of the 4 tests, animal behaviour was recorded using cameras (Sony, Tokyo, Japan)  
222 overlooking the test pens and connected to a video recorder (Sony SVT-96LP, Sony Corp.,  
223 Tokyo Japan). The video tapes were later analysed on “The Observer” software (Noldus,  
224 Wageningen, The Netherlands) using several behavioural patterns.

225 Cardiac activity was assessed by using a Polar Vantage NV system (Polar, Anglet, France),  
226 consisting of two electrodes, an emitter and a watch-like receiver fixed to an elastic belt  
227 strapped around the animal’s thorax. Heart rate (beats per minute, bpm) was recorded as  
228 averages over 1 second intervals. The data file created on the emitter was uploaded to a  
229 computer for analysis. Three days before the first test, lambs underwent a habituation  
230 procedure. They were caught in their home pen and an elastic belt was strapped around the  
231 thorax for one-hour.

232 Immediately after collection blood samples were centrifuged at 3000 g for 10 min and plasma  
233 samples were stored at -20°C until determination of cortisol concentrations. Plasma cortisol  
234 levels were determined by means of radioimmunoassay (Boissy and Bouissou, 1994) using an  
235 antibody produced by Cognié and Poulin (INRA, Tours, France). The detection limit was 0.02  
236 ng/ml and the within- and between- assay CV were 6.5 and 13% for low controls (4 ng/ml)  
237 and 11 and 13% for high controls (32 ng/ml).

238

## 239 **2.7 Statistical analysis**

240 SAS software (version sas9x, SAS<sup>TM</sup> Inst., Cary, NC USA) was used to analyse data.  
241 Behaviours in fear tests, vocalizations in presence of the negative bucket during judgment  
242 test, cardiac activity and cortisol levels data met the requirements for parametric tests.  
243 Treatment effect was analysed by ANOVA.  
244 Latencies for the subjects to approach the different bucket locations in the judgment test were  
245 non-normally distributed and so could not be analysed with parametric statistics. A  
246 randomisation test (resampling statistical technique, also called a permutation test) was used  
247 with 10 000 replications (method described by Adams and Anthony, 1996; Manly, 2007).  
248 Number of animals with a go-response for each bucket location during the judgment test was  
249 analysed using Chi<sup>2</sup> tests.  
250 Values are expressed as means  $\pm$  S.E. and the significance limit was set at  $P = 0.05$  for all  
251 analyses.

252

### 253 **3. Results**

254

#### 255 **3.1. Fearfulness tests**

256

##### 257 **3.1.1. Novelty test**

258 Behaviours and physiological parameters are presented in Table 4. Negative and positive  
259 events-exposed lambs (NP) spent less time in the feeding zone ( $F=7.9$ ,  $P=0.009$ ), fed for a  
260 shorter amount of time ( $F=8.7$ ,  $P=0.006$ ), were more vigilant ( $F=8.9$ ,  $P=0.006$ ) and vocalized  
261 more ( $F=8.3$ ,  $P=0.007$ ) than their chronically stressed counterparts (CS). NP and CS lambs  
262 spent the same time looking at and having contact with the object ( $F<0.9$ ,  $P>0.4$ ). Heart rate  
263 and plasma cortisol level were not significantly different between the two groups ( $F<0.8$ ,  
264  $P>0.4$ ).

265

### 266 3.1.2. Suddenness test

267 Behaviours and physiological parameters are presented in Table 5. NP lambs spent  
268 significantly less time in the feeding zone ( $F=5.4$ ,  $P=0.03$ ), ate for a shorter amount of time  
269 ( $F=5.0$ ,  $P=0.03$ ) and vocalized more ( $F=11.0$ ,  $P=0.002$ ) than CS animals. NP and CS animals  
270 spent the same amount of time being vigilant ( $F=2.0$ ,  $P=0.2$ ) and had the same degree of  
271 startle response (Mean for the two groups:  $0.2 \pm 0.1$ ,  $F=2.2$ ,  $P=0.1$ ). Heart rate and plasma  
272 cortisol were not significantly different between the two groups ( $F<0.2$ ,  $P>0.7$ ).

273

### 274 3.1.3. Human test

275 NP lambs spent significantly more time near the familiar human in green clothes than CS  
276 lambs ( $F= 10.2$ ,  $P= 0.003$ ), respectively  $15.0 \pm 1.4$  vs.  $7.7 \pm 1.5$  times in Z1 during 10 min.

277

### 278 3.2 Judgment test

279 During judgment testing, 100% of animals displayed a go response to the positive bucket,  
280 96% to the L+ bucket, 54% to the L bucket, 23% to the L- bucket and 15% to the negative  
281 bucket. There was no treatment-dependent significant difference for the number of animals  
282 with a go-response for all bucket locations ( $K_{hi^2}< 3.6$ ,  $P>0.06$ ).

283 Latencies to approach for each location of bucket are presented in Figure 4. NP lambs took  
284 less time to approach L+ bucket than did CS lambs ( $P=0.033$ ). There was no significant  
285 difference between the two treatments for the other bucket locations: positive ( $P= 0.12$ ), L ( $P=$   
286  $0.68$ ), L- ( $P= 0.91$ ) and negative ( $P= 0.52$ ) location.

287 There was no significant difference between the two treatments for the number of  
288 vocalizations made in whilst the bucket was in the negative location ( $1.7 \pm 0.5$  for CS vs.  $1.2$

289  $\pm 0.4$  for NP,  $F= 0.6$ ,  $P= 0.4$ ) and for plasma cortisol levels 20 min after the test ( $6.4 \pm 1.0$   
290 ng/ml for CS group vs.  $5.9 \pm 0.9$  ng/ml for NP group,  $F= 0.09$ ,  $P= 0.8$ ).

291 Heart rate of NP lambs was higher than CS lambs during the 15-second period just before the  
292 beginning of the test ( $129.2^a \pm 6.1$  for CS group vs.  $156.4^b \pm 5.6$  for NP group,  $F= 9.7$ ,  $P=$   
293  $0.005$ ).

294

#### 295 **4. Discussion**

296

297 In our study, repeated exposure of stressed sheep to positive events enhanced their optimistic-  
298 like judgment without alleviating the negative judgement bias that is known to be induced by  
299 a long-lasting stressful experience (Doyle *et al.*, 2011; Destrez *et al.*, 2012a). At the same  
300 time, repeated exposure to positive events increased the emotional reactivity of sheep to  
301 suddenness and novelty as is already known to be enhanced by stressful experiences (Destrez  
302 *et al.*, 2012b). Finally, this positive treatment in stressed sheep increased their tendency to  
303 approach humans, in contrast with their counterparts that had only been exposed to the long-  
304 lasting stressful experience.

305

306 In the judgment test, NP sheep took less time to approach the L+ ambiguous bucket than CS  
307 sheep. Various studies demonstrate that repeated negative emotional experiences affect the  
308 way that animals judge their environment, making them less aware of positive cues and more  
309 sensitive to negative ones, and few others suggest that following positive experiences animals  
310 are less aware of negative and more sensitive towards positive cues (Bateson and Matheson,  
311 2007; Brilot *et al.*, 2010; Doyle *et al.*, 2009; Paul *et al.*, 2005). For instance, Brydges *et al.*  
312 (2010) showed that environmental enrichment can induce an optimistic cognitive bias of  
313 ambiguous stimuli in rats previously housed in standard caging. Furthermore, in human

314 psychology, studies suggest that patients in a very negative emotional state could develop  
315 anhedonia (i.e. decreased perception of positive stimuli) and/or negative alliesthesia  
316 (enhanced perception of negative stimuli) (Atanasova *et al.*,2010). According to our results,  
317 NP lambs demonstrated a more optimistic-like judgment to ambiguous stimuli than CS sheep.  
318 Therefore, we may suppose that NP lambs developed positive alliesthesia. These findings  
319 support recent studies in various animal species, which suggest that testing judgement bias is  
320 a relevant method for determining the cognitive component of affective state in animals.

321

322 NP sheep had a higher heart rate during the 15 second period just before judgment test, just  
323 before entrance into the arena with the bucket in the positive position. In the start box, sheep  
324 could see the bucket's location and they may have anticipated the expected reward. The major  
325 characteristic of anticipatory behaviour lies in increased activity, principally an increase in the  
326 occurrence of exploratory behavioural patterns (Spruijt *et al.* 2001) and it was shown in rats  
327 that chronic stress leads to a decrease of anticipatory behaviour (Von Frijtag *et al.* 2000).  
328 These authors have shown that after a severe stressor, a social defeat followed by individual  
329 housing, rats' anticipation of a sucrose solution diminished. In our study, we did not observed  
330 behaviour in the start box but cardiac activity may at least partly reflect behavioural activity.  
331 The lower heart rate in CS sheep could thus be explained by a decrease of anticipatory  
332 behaviour. Repeated exposure to positive events may have prevented this decrease.

333

334 In the human test, NP sheep spent significantly more time near the familiar human in green  
335 clothes than CS sheep. Animals' perception of humans is strongly influenced by their  
336 previous experiences with humans (Hemsworth *et al.*, 1998; Rushen *et al.*, 1999a). For  
337 example, sheep with negative perceptions of humans due to aversive handling (swift  
338 movements and shouting) did not approach a stationary human, whereas sheep with positive

339 perception of human due to gentle handling (soft talking and calm behaviour) did (Hild *et al.*,  
340 2011). Numerous studies show that farm animals (Sheep: Davis *et al.*, 1998; Cattle:  
341 Rybarczyk *et al.*, 2003; Pigs: Tanida and Nagano, 1998) are able to discriminate humans  
342 using various sensory modalities such as visual cues (e.g. colour of clothing). In our study,  
343 experimenters wore white clothes during aversive events imposed upon CS and NP sheep and  
344 green clothes during positive events for NP sheep. NP sheep may have been able to  
345 discriminate the familiar human wearing green clothes, perceived as a positive event, from the  
346 familiar human wearing white clothes, perceived as an aversive event. Conversely, CS sheep  
347 tended to generalize negative experiences with the familiar human wearing white clothes to  
348 the familiar human in green clothes in the test (for review: Rushen *et al.*, 1999b). The  
349 presence of a human may have been perceived by CS sheep as an unavoidable aversive event.  
350 As was shown in calves (De Passillé *et al.*, 1996), sheep treated in a negative way by a human  
351 develop a general fear of people that can be overcome by repeated positive handling. It may  
352 be that in CS sheep, frequency of gentle handling (i.e. feeding) was not sufficient to overcome  
353 their general fear of people. This generalization process may relate to a pessimistic-like  
354 judgment bias of human presence; human presence may be perceived as an ambiguous  
355 situation because humans could be aversive or gentle. In NP sheep, exposure to positive  
356 events seems to promote an optimistic-like judgment that may have counteracted this negative  
357 generalization.

358

359 In contrast, NP sheep were more reactive to novelty and suddenness than CS sheep. Chronic  
360 stress can induce apathetic states in humans and laboratory rodents (Anisman and Matheson,  
361 2005; Willner, 1997), but in our study CS sheep did not express apathy, since they spent more  
362 time feeding than NP sheep. This result was discrepant with previous studies which showed  
363 that repeated and unpredictable exposure to uncontrollable aversive events induce either an

364 increase of emotional reactivity (Destrez *et al.* 2012b) or have no effect (Doyle *et al.* 2011) in  
365 the same fearfulness tests. It is possible that these emotional reactivity tests do not have the  
366 potential to identify affective state changes.

367

368 To conclude, long-lasting exposure of stressed sheep to positive events reduced their negative  
369 reactions to a familiar human and enhanced their optimistic-like judgment. Further  
370 investigations are required to improve the efficiency of such a positive treatment, which can  
371 then be promoted as a behavioural method to alleviate negative effects of long-lasting stress  
372 experience. In addition, these findings add to the growing body of evidence that judgement  
373 bias can provide information about affective state in animals and so can be a valuable measure  
374 of welfare.

375

#### 376 **Acknowledgements**

377

378 The authors would like to thank D. Chassaignes and B. Viallard of the experimental farm for  
379 animal care and their assistance with the experiment. The authors are also indebted to S.  
380 Andanson, C. Ravel, E. Delval and H. Chandèze for their invaluable help in data collection  
381 and analysis. This study was supported by the French National Research Agency (grant ANR-  
382 09-BLAN-0339-01) and the Région Auvergne.

383

#### 384 **References**

385

- 386 Adams, D.C., Anthony, C.D., 1996. Using randomization techniques to analyse behavioural  
387 data. *Anim. Behav.* 51, 733-738.  
388 Anisman, H., Matheson, K., 2005. Stress, depression, and anhedonia: Caveats concerning  
389 animal models. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 29, 525-546.  
390 Atanasova, B., El-Hage, W., Chabanet, C., Gaillard, P., Belzung, C., Camus, V. (2010).  
391 Olfactory anhedonia and negative olfactory alliesthesia in depressed patients. *Psychiatry*  
392 *Research*. 176, 190-196.

393 Bateson, M., Matheson, S.M., 2007. Performance on a categorisation task suggests that  
394 removal of environmental enrichment induces 'pessimism' in captive European starlings  
395 (*Sturnus vulgaris*). *Anim. Welf.* 16, 33-36.

396 Boissy, A., 1998. Fear and fearfulness in determining behavior, Grandin, T. ed. Grandin, T.,  
397 San Diego.

398 Boissy, A., Bouissou, M.F., 1994. Effects of androgen treatment on behavioral and  
399 physiological-responses of heifers to fear-eliciting situation *Horm. Behav.* 28, 66-83.

400 Boissy, A., Manteuffel, G., Jensen, M.B., Moe, R.O., Spruijt, B., Keeling, L.J., Winckler, C.,  
401 Forkman, B., Dimitrov, I., Langbein, J., Bakken, M., Veissier, I., Aubert, A., 2007.  
402 Assessment of positive emotions in animals to improve their welfare. *Physiology &  
403 Behavior* 92, 375-397.

404 Boissy, A., Veissier, I., Roussel, S., 2001. Behavioural reactivity affected by chronic stress:  
405 An experimental approach in calves submitted to environmental instability. *Animal  
406 Welfare* 10, S175-S185.

407 Brilot, B.O., Asher, L., Bateson, M., 2010. Stereotyping starlings are more 'pessimistic'.  
408 *Anim. Cogn.* 13, 721-731.

409 Broom, D.M., 1987. Applications of neurobiological studies to farm animal welfare, in:  
410 Wiepkema, P.R. (Ed.), *Biology of Stress in Farm Animals: an Integrative Approach*.  
411 Kluwer Academic Publishers, pp. 101-110.

412 Brydges, N.M., Leach, M., Nicol, K., Wright, R., Bateson, M., 2010. Environmental  
413 enrichment induces optimistic cognitive bias in rats. *Anim. Behav.* In Press, Corrected  
414 Proof.

415 Burman, O., McGowan, R., Mendl, M., Norling, Y., Paul, E., Rehn, T., Keeling, L., 2011.  
416 Using judgement bias to measure positive affective state in dogs. *Appl. Anim. Behav. Sci.*  
417 132, 160-168.

418 Burman, O.H.P., Parker, R., Paul, E.S., Mendl, M., 2008. A spatial judgement task to  
419 determine background emotional state in laboratory rats, *Rattus norvegicus*. *Anim. Behav.*  
420 76, 801-809.

421 Burman, O.H.P., Parker, R.M.A., Paul, E.S., Mendl, M.T., 2009. Anxiety-induced cognitive  
422 bias in non-human animals. *Physiol. Behav.* 98, 345-350.

423 Chen, Y.M., Mao, Y., Zhou, D.M., Hu, X.T., Wang, J.H., Ma, Y.Y., 2010. Environmental  
424 enrichment and chronic restraint stress in ICR mice: Effects on prepulse inhibition of  
425 startle and Y-maze spatial recognition memory. *Behavioural Brain Research* 212, 49-55.

426 Conrad, C.D., 2010. A critical review of chronic stress effects on spatial learning and  
427 memory. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 34, 742-755.

428 Cruz, F.C., Marin, M.T., Leao, R.M., Planeta, C.S., 2012. Behavioral and neuroendocrine  
429 effects of the exposure to chronic restraint or variable stress in early adolescent rats.  
430 *International Journal of Developmental Neuroscience* 30, 19-23.

431 Davis, H., Norris, C., Taylor, A., 1998. Wether ewe know me or not: the discrimination of  
432 individual humans by sheep. *Behav. Process.* 43, 27-32.

433 de Jong, I.C., Prelle, I.T., van de Burgwal, J.A., Lambooi, E., Korte, S.M., Blokhuis, H.J.,  
434 Koolhaas, J.M., 2000. Effects of environmental enrichment on behavioral responses to  
435 novelty, learning, and memory, and the circadian rhythm in cortisol in growing pigs.  
436 *Physiol. Behav.* 68, 571-578.

437 De Jonge, F.H., Bokkers, E.A.M., Schouten, W.G.P., Helmond, F.A., 1996. Rearing piglets in  
438 a poor environment: Developmental aspects of social stress in pigs. *Physiology &  
439 Behavior* 60, 389-396.

440 De Passillé, A. M., J. Rushen, J. Ladewig, and C. Petherick. 1996. Dairy calves'  
441 discrimination of people based on previous handling. *J. Anim. Sci.* 74: 969-974.

442 Désiré, L., Veissier, I., Despres, G., Boissy, A., 2004. On the way to assess emotions in  
443 animals: Do lambs (*Ovis aries*) evaluate an event through its suddenness, novelty, or  
444 unpredictability? *J. Comp. Psychol.* 118, 363-374.

445 Destrez, A., Deiss, V., Letierrier, C., Boivin, X., Boissy, A., (2012b, in press). Long-term  
446 exposure to unpredictable and uncontrollable aversive events alters fearfulness in sheep.  
447 *Animal*.

448 Destrez, A., Deiss, V., Levy, F., Calandreau, L., Chaillou, E., Lee, C., Boissy, A. (2012a,  
449 submitted). Effects of chronic stress on cognitive functions in sheep

450 Doyle, R.E., Fisher, A.D., Hinch, G.N., Boissy, A., Lee, C., 2009. Release from restraint  
451 generates a positive judgement bias in sheep. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 122, 28-34.

452 Doyle, R.E., Lee, C., Deiss, V., Fisher, A.D., Hinch, G.N., Boissy, A., 2011. Measuring  
453 judgement bias and emotional reactivity in sheep following long-term exposure to  
454 unpredictable and aversive events. *Physiol. Behav.* 102, 503-510.

455 Doyle, R.E., Vidal, S., Hinch, G.N., Fisher, A.D., Boissy, A., Lee, C., 2010. The effect of  
456 repeated testing on judgement biases in sheep. *Behav. Process.* 83, 349-352.

457 Harding, E.J., Paul, E.S., Mendl, M., 2004. Animal behavior - Cognitive bias and affective  
458 state. *Nature* 427, 312-312.

459 Hemsworth, P.H., Barnett, J.L., Hansen, C., 1987. The influence of inconsistent handling by  
460 humans on the behaviour, growth and corticosteroids of young pigs. *Appl. Anim. Behav.*  
461 *Sci.* 17, 245-252.

462 Hemsworth, P.H., Coleman, G.J., International, B.I.C., 1998. Human-livestock interactions:  
463 the stockperson and the productivity and welfare of intensively farmed animals.

464 Herrnstein, R.J., 1990. Levels of stimulus control: A functional approach. *Cognition* 37, 133-  
465 166.

466 Hild, S., Coulon, M., Schroeder, A., Andersen, I.L., Zanella, A.J., 2011. Gentle vs. aversive  
467 handling of pregnant ewes: I. Maternal cortisol and behavior. *Physiol. Behav.* 104, 384-  
468 391.

469 Imfeld-Mueller, S., Van Wezemael, L., Stauffacher, M., Gygax, L., Hillmann, E., 2011. Do  
470 pigs distinguish between situations of different emotional valences during anticipation?  
471 *Appl. Anim. Behav. Sci.* In Press, Corrected Proof.

472 Knapman, A., Heinzmann, J.M., Holsboer, F., Landgraf, R., Touma, C., 2010. Modeling  
473 psychotic and cognitive symptoms of affective disorders: Disrupted latent inhibition and  
474 reversal learning deficits in highly stress reactive mice. *Neurobiology of Learning and*  
475 *Memory* In Press, Corrected Proof.

476 Magarinos, A.M., McEwen, B.S., 1995. Stress-induced atrophy of apical dendrites of  
477 hippocampal CA3c neurons: comparison of stressors. *Neuroscience* 69, 83-88.

478 Manly, B.F.J., 2007. Randomization, Bootstrap and Monte Carlo Methods in Biology.  
479 Chapman & Hall, New York.

480 Matheson, S.M., Asher, L., Bateson, M., 2008. Larger, enriched cages are associated with  
481 'optimistic' response biases in captive European starlings (*Sturnus vulgaris*). *Appl. Anim.*  
482 *Behav. Sci.* 109, 374-383.

483 McKittrick, C.R., Magarinos, A.M., Blanchard, D.C., Blanchard, R.J., McEwen, B.S., Sakai,  
484 R.R., 2000. Chronic social stress reduces dendritic arbors in CA3 of hippocampus and  
485 decreases binding to serotonin transporter sites. *Synapse* 36, 85-94.

486 Milgram, N.W., Head, E., Zicker, S.C., Ikeda-Douglas, C., Murphey, H., Muggenberg, B.A.,  
487 Siwak, C.T., Dwight Tapp, P., Lowry, S.R., Cotman, C.W., 2004. Long-term treatment  
488 with antioxidants and a program of behavioral enrichment reduces age-dependent  
489 impairment in discrimination and reversal learning in beagle dogs. *Experimental*  
490 *Gerontology* 39, 753-765.

491 Mooring, M.S., Hart, B.L., Fitzpatrick, T.A., Reisig, D.D., Nishihira, T.T., Fraser, I.C.,  
492 Benjamin, J.E., 2006. Grooming in desert bighorn sheep (*Ovis canadensis mexicana*) and  
493 the ghost of parasites past. *Behav. Ecol.* 17, 364-371.

494 Pardon, M.-C., Gérardin, P., Joubert, C., Pérez-Díaz, F., Cohen-Salmon, C., 2000. Influence  
495 of prepartum chronic ultramild stress on maternal pup care behavior in mice. *Biological*  
496 *Psychiatry* 47, 858-863.

497 Paul, E.S., Harding, E.J., Mendl, M., 2005. Measuring emotional processes in animals: the  
498 utility of a cognitive approach. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 29, 469-491.

499 Qian, J., Zhou, D., Pan, F., Uu, C.X., Wang, Y.W., 2008. Effect of environmental enrichment  
500 on fearful behavior and gastrin-releasing peptide receptor expression in the amygdala of  
501 prenatal stressed rats. *J. Neurosci. Res.* 86, 3011-3017.

502 Retana-Márquez, S., Bonilla-Jaime, H., Vázquez-Palacios, G., Martínez-García, R.,  
503 Velázquez-Moctezuma, J., 2003. Changes in masculine sexual behavior, corticosterone and  
504 testosterone in response to acute and chronic stress in male rats. *Horm. Behav.* 44, 327-  
505 337.

506 Rushen, J., De Passille, A.M.B., Munksgaard, L., 1999a. Fear of people by cows and effects  
507 on milk yield, behavior, and heart rate at milking. *Journal of Dairy Science* 82, 720-727.

508 Rushen, J., Taylor, A.A., de Passille, A.M., 1999b. Domestic animals' fear of humans and its  
509 effect on their welfare. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 65, 285-303.

510 Rybarczyk, P., Rushen, J., de Passillé, A.M., 2003. Recognition of people by dairy calves  
511 using colour of clothing. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 81, 307-319.

512 Spruijt, B.M.; van den Bos, R.; Pijlman, F.T.A. (2001). . *Appl. Anim. Behav. Sci.* 72, 145-  
513 171.

514 Tallet, C., Veissier, I., Boivin, X., 2005. Human contact and feeding as rewards for the lamb's  
515 affinity to their stockperson. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 94, 59-73.

516 Tanida, H., Nagano, Y., 1998. The ability of miniature pigs to discriminate between a stranger  
517 and their familiar handler. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 56, 149-159.

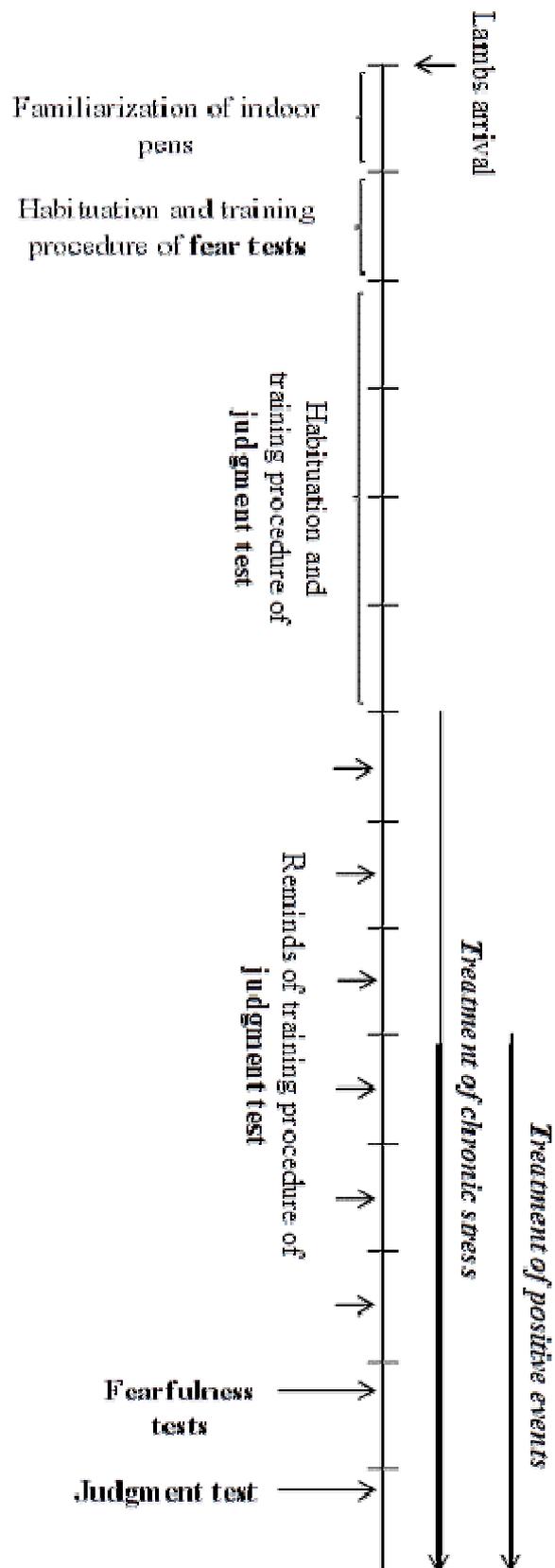
518 Van Praag, H., Kempermann, G., Gage, F.H., 2000. Neural consequences of environmental  
519 enrichment. *Nat. Rev. Neurosci.* 1, 191-198.

520 Von Frijtag, J.C.; Reijmers, L.G.J.E.; Van der Harst, J.E.; Leus, I.E.; Van den Bos, R.;  
521 Spruijt, B.M. (2000). Defeat followed by individual housing results in long-term impaired  
522 reward- and cognition-related behaviours in rats. *Behav Brain Res.* 117, 137-146.

523 Willner, P., 1997. Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of  
524 depression: a 10-year review and evaluation. *Psychopharmacology* 134, 319-329.

525 Wright, R.L., Conrad, C.D., 2008. Enriched environment prevents chronic stress-induced  
526 spatial learning and memory deficits. *Behav Brain Res.* 187, 41-47.

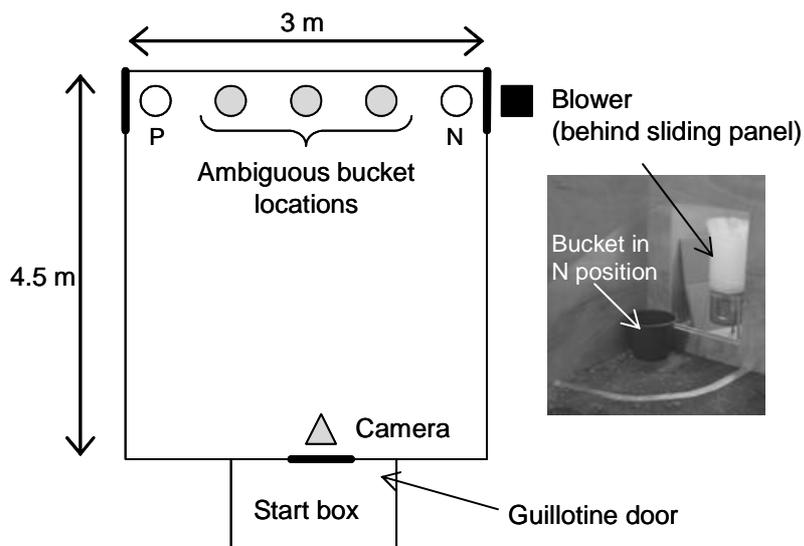
527  
528



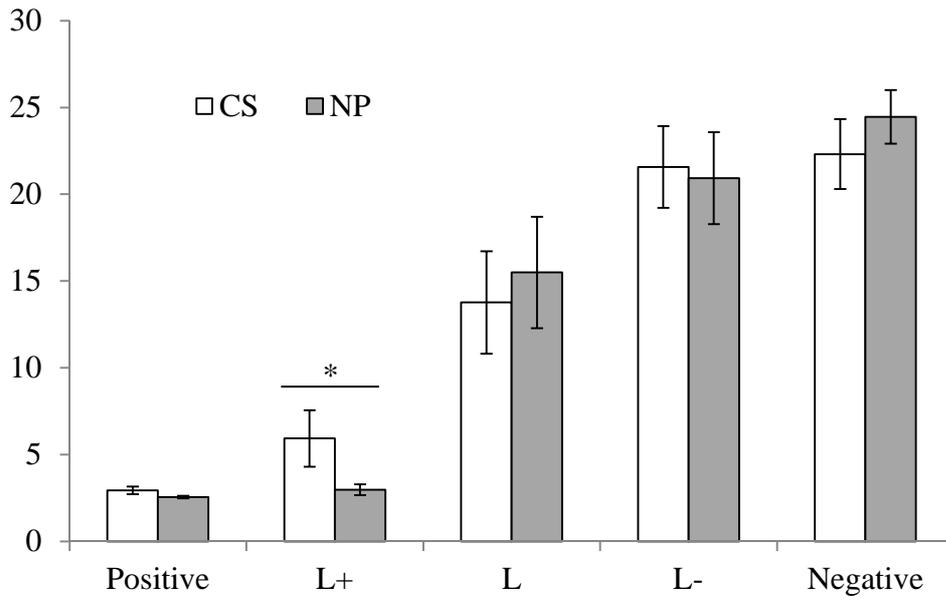
**Figure 1.** Timing of experimental design and behavioural tests



**Figure 2.** Two examples of positive events used during enrichment: novel object (a.) and wool-brush (b.)



**Figure 3.** The judgment bias testing facility. For a lamb trained for the left corner to be positive (P) and the right corner to be negative (N) the three ambiguous locations are partially positive (L+), central (L) and partially negative (L-) from left to right.



**Figure 4.** Latencies of approach each location of bucket: the two learnt locations: positive and negative, the three ambiguous locations: partially positive (L+), central (L) and partially negative (L-) for the CS (chronically stressed) and NP (Negative and Positive events-exposed) groups (Randomization test: \*P<0.05).

**Table 1.** Aversive events used during the 6 weeks treatment of chronic stressful experience for chronic-stressed group (n=15) and negative and positive events-exposed group (n=15)

Events used during 6 weeks	Frequency over the 6 weeks	Duration for each home pen i.e. 5 lambs
<i>Predator signals</i>		
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sheep dog handling <i>Lambs were moved in groups of four using a sheep dog, from their pens and along the corridors of the building</i></li> </ul>	3	30 min
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aversive contact with a dog <i>A very big barking Beauceron dog (resembling a wolf) entered in or walked around the lambs' home pen</i></li> </ul>	7	30 min
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Howl of dogs and wolves <i>At fixed hours howls resounded during the night</i></li> </ul>	11	4 sessions of 15 min
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Odours of dog's dejections <i>Boxes of dog faeces were placed in home pen</i></li> </ul>	7	24 h
<i>Congeners signals</i>		
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Odours of blood taken in slaughterhouse <i>Boxes of sheep blood taken in slaughterhouse were placed in home pen</i></li> </ul>	7	24 h
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Odours of urine taken in slaughterhouse <i>Boxes of sheep urine taken in slaughterhouse were placed in home pen</i></li> </ul>	7	24 h
<i>Human signals</i>		
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Individual restraint <i>Shackles were fixed on the lambs' forelegs and head in home pen</i></li> </ul>	4	1 h
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Shearing <i>Woollen fleece of lamb was cut off.</i></li> </ul>	2	1 h
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Presence of a noisy man <i>Loud metallic noise was made by a man with a bar</i></li> </ul>	4	15 min
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Disturbance of the food distribution <i>Late or unreachable food was given</i></li> </ul>	12	15 min to 1 h
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Wet bedding <i>Lambs stayed in a pen with wet bedding straw</i></li> </ul>	8	4 h
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Light during the night <i>At fixed hours light turned off by a programmer during the night</i></li> </ul>	8	4 sessions of 30 min
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Crossing of a footbath <i>Lambs crossed a footbath with or without a shepherd dog</i></li> </ul>	8	30 min
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Transport in cattle truck <i>Lambs were transported in a truck</i></li> </ul>	3	1 h



**Table 4.** Behaviours and physiological parameters (means  $\pm$  S.E.) of chronically stressed animals (CS, n=15) and negative and positive events-exposed animals (NP, n=15) during novelty test after six weeks of treatment (anova, a,b;  $p < 0.05$ ).

Activity	CS	NP	F	p-value
Time spent in feeding zone (s)	55.7 $\pm$ 6.9 <sup>a</sup>	27.64 $\pm$ 7.2 <sup>b</sup>	7.9	0.009
Vigilance (s)	9.6 $\pm$ 3.2 <sup>a</sup>	24.8 $\pm$ 4.0 <sup>b</sup>	8.9	0.006
Number of vocalizations	0.7 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	4.9 $\pm$ 1.4 <sup>b</sup>	8.3	0.007
Feeding (s)	44.0 $\pm$ 6.3 <sup>a</sup>	17.7 $\pm$ 6.2 <sup>b</sup>	8.7	0.006
Looking at the object (s)	6.5 $\pm$ 1.5	8.3 $\pm$ 1.2	0.8	0.4
Contact with the object (s)	1.6 $\pm$ 0.6	2.3 $\pm$ 0.5	0.9	0.4
Heart rate (bpm)	112.7 $\pm$ 6.0	122.1 $\pm$ 8.1	0.8	0.4
Plasma cortisol level (ng/ml)	7.0 $\pm$ 1.4	7.8 $\pm$ 1.0	0.2	0.6

**Table 5.** Behaviours and physiological parameters (means  $\pm$  S.E.) of chronic-stressed (CS, n=15) and negative and positive events-exposed (NP, n=15) animals during suddenness test after six weeks of treatment (anova, a,b;  $p < 0.05$ ).

Activity	CS	NP	F	p-value
Time spent in feeding zone (s)	54.1 $\pm$ 7.4 <sup>a</sup>	28.3 $\pm$ 8.2 <sup>b</sup>	5.4	0.03
Vigilance (s)	17.1 $\pm$ 4.5	25.9 $\pm$ 4.3	2.0	0.2
Number of vocalizations	0.6 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	5.8 $\pm$ 1.5 <sup>b</sup>	11.0	0.002
Feeding (s)	40.0 $\pm$ 7.0 <sup>a</sup>	19.1 $\pm$ 6.3 <sup>b</sup>	5.0	0.03
Heart rate (bpm)	130.0 $\pm$ 5.2	126.9 $\pm$ 6.0	0.2	0.7
Plasma cortisol (ng/ml)	6.3 $\pm$ 0.6	6.0 $\pm$ 0.7	0.05	0.8



---

## DISCUSSION GÉNÉRALE

---



Il est communément admis que le bien-être est à la fois un état physique et mental. La prise en compte à la fois des émotions des animaux et de leurs états affectifs est donc indispensable pour appréhender leur bien-être. Cependant, que ce soit chez l'homme ou les animaux, la prise en compte des émotions et à plus long terme des états affectifs est difficile car ils ne sont pas directement accessibles et ne peuvent être qu'inférés à partir des mesures comportementales et physiologiques.

Le cadre théorique proposé en 2002 par Désiré et al. permet désormais une analyse objective des émotions ressenties par les animaux. Ces auteurs se sont inspirés de certaines théories de l'évaluation développées en psychologie cognitive pour décrypter les émotions chez l'homme (Scherer, 1999). Ces théories postulent que la composante subjective (le ressenti émotionnel proprement dit) peut être appréhendée, en plus des deux composantes expressives des émotions (somato-motrice et physiologique), par une composante « cognitive » définissant les processus d'évaluation de la situation par l'individu lui-même, qui concernent à la fois l'évaluation, l'attention, l'apprentissage et la mémoire. Ainsi, comme chez l'homme, l'évaluation que l'animal fait de la situation à laquelle il est confronté, est à l'origine de son ressenti émotionnel.

En outre, si les émotions dépendent de processus cognitifs d'évaluation, ces mêmes processus cognitifs sont influencés par les émotions elles-mêmes. Ces influences des émotions sur les processus cognitifs est appelé biais cognitif (Paul *et al.*, 2005). L'analyse de la persistance des biais cognitifs dus à l'accumulation d'expériences émotionnelles permettrait donc de mieux comprendre la mise en place d'états affectifs de bien-être ou de mal-être.

Mes travaux de thèse ont pour objectif d'explorer comment l'accumulation d'émotions peut modifier de manière durable les processus d'évaluation de l'animal, et plus globalement ses fonctions cognitives, et par voie de conséquence instaurer chez ce dernier un état affectif chronique de bien-être ou de stress.

La discussion générale est organisée en quatre parties. Dans la première partie, nous rappellerons les principaux résultats de chacun des chapitres de cette thèse. Ensuite, nous discuterons dans la deuxième partie de la pertinence des mesures comportementales et/ou physiologiques comme indicatrices d'états affectifs persistants. La troisième partie sera consacrée à l'importance des différences interindividuelles dans nos résultats malgré les précautions expérimentales prises pour les minimiser. Enfin, dans la quatrième partie, nous esquisserons les perspectives à la fois de recherche et d'aménagement dans la conduite des animaux qu'ouvre notre travail.

**1. Est-ce que l'accumulation d'émotions, qui modifie de manière durable le traitement cognitif de l'animal, serait à l'origine de la mise en place d'états affectifs persistants ?**

Nos résultats montrent nettement que l'exposition imprévisible à des événements aversifs et incontrôlables modifie la perception d'événements anxiogènes et ambigus.

Contrairement à nos attentes, les effets sur la réactivité à la nouveauté et à la soudaineté sont contradictoires entre les deux expériences bien que la procédure d'application du traitement stressant ait été identique dans les deux séries d'expériences. Une hyperréactivité est mise en évidence lors de la première expérience (article 1) alors qu'une hypo-réactivité est rapportée lors de la seconde expérience (article 5). Cette différence pourrait être expliquée au moins en partie par le changement de procédure pour constituer les lots expérimentaux et l'impact de la variabilité interindividuelle dans la réactivité émotionnelle (voir la partie 3). Contrairement à la première expérience dans laquelle les agnelles ont été réparties aléatoirement dans les traitements, les lots expérimentaux mis en place dans la seconde expérience ont été constitués en équilibrant suivant les réactions précoces des agnelles à la nouveauté, à l'isolement social et à l'homme. La réactivité précoce est un facteur explicatif des réactions de stress exprimées par les individus adultes (ovins : Deiss et al., 2009; porcs : Terlouw et al., 2012). S'il existe bien une interaction entre la réactivité précoce et les effets du traitement négatif, un biais a pu alors être introduit dans la première expérience du fait que cette réactivité précoce n'a pas été prise en compte lors de la constitution des lots. Même si les tests de réactivité à la nouveauté et à la soudaineté réalisés juste avant le début du traitement ne montrent pas de différence significative entre les lots, la forte variabilité interindividuelle pourrait avoir masqué cet effet. Le phénomène de « contagion sociale » pourrait également avoir contribué à l'obtention des résultats contradictoires entre nos deux expériences. On peut supposer que d'une série d'expériences à l'autre la présence d'un ou de plusieurs congénères, ayant une réactivité émotionnelle particulièrement élevée ou au contraire peu exacerbée puisse avoir eu un effet stressant ou apaisant sur le groupe et par là même influencer la perception du traitement appliqué. Il a en effet été montré dans de nombreuses espèces l'existence de transferts d'émotions entre les membres d'un groupe (revue de Spinka, 2012).

Nous avons trouvé également que l'exposition imprévisible à des événements aversifs et incontrôlables augmente la réactivité à l'homme des agnelles et les résultats sont cohérents d'une expérience à l'autre (articles 1 et 5). Cette cohérence peut s'expliquer par le fait que dans notre traitement l'homme est omniprésent. Il intervient plus ou moins indirectement dans

l'introduction de quasiment tous les agents stressants (conduite avec un chien, transport, pédiluve, bétailière ....). Le biais de jugement négatif (article 2) pourrait expliquer la généralisation faite par les agnelles vis-à-vis de l'homme (article 3). Ces agnelles perçoivent l'homme négativement c'est-à-dire comme un agent stressant quelles que soient les caractéristiques de l'homme.

Dans l'exploration des effets de l'expérience stressante, nous nous sommes également intéressés aux processus d'évaluation qui nécessitent un traitement cognitif plus élaboré que les processus simples impliqués dans l'évaluation des caractéristiques de soudaineté ou de nouveauté de la situation (voir le rappel du cadre conceptuel développé par Scherer 1999 et adapté ici sur l'animal depuis Désiré et al. 2002). Les processus d'évaluation qui nécessitent un traitement cognitif plus élaboré ont été mis en évidence dans les tests de jugement et de mémorisation.

Chez les agnelles, l'expérience stressante a induit un jugement négatif des situations ambiguës les plus négatives (article 2). L'exposition imprévisible à des événements aversifs et incontrôlables semble avoir à la fois potentialisé chez les agnelles la perception négative de leur environnement, c'est-à-dire une accentuation de l'alliesthésie négative, et atténué la perception des informations positives, autrement dit une accentuation de l'anhédonie (Atanasova et al., 2010). L'alliesthésie désigne les variations des sensations subjectives d'un individu, concernant une stimulation de nature agréable ou désagréable, à la suite d'une stimulation externe. Le terme est introduit par Cabanac pour expliquer que la façon dont l'individu va percevoir le caractère agréable d'un stimulus dépend de son état interne. Rabe et Cabanac (1974) utilisent l'exemple du sucre : celui-ci est très apprécié et provoque beaucoup de plaisir si l'homme qui l'ingère a faim, c'est-à-dire, si son corps est en déficit de glucose et donc, en déséquilibre. Le sucre provoque une sensation de plaisir bien moindre voire inexistante, par contre, si l'homme qui l'ingère est rassasié ou plus généralement, si le taux de glucose dans son organisme est normal (homéostasie). L'anhédonie est une perte de la capacité à ressentir des émotions positives. Chez l'homme, le phénomène d'anhédonie est fréquemment observé pendant un état affectif négatif de dépression mais ne peut pas être un indicateur de cet état à lui seul (Silverstone, 1991).

L'exposition à l'expérience stressante induit un biais également dans les processus de mémorisation, les agnelles soumises au traitement se caractérisent par une moins bonne rétention dans le test d'apprentissage (article 2). Il aurait été intéressant chez ces animaux qui

présentent un biais de jugement négatif, d'évaluer leur capacité d'apprentissage et de mémorisation avec des renforcements de valence différente. Selon la tendance à percevoir plus ou moins positivement/négativement les événements environnants, le choix des agents renforçateurs (récompense vs. punition) pourrait être déterminant dans l'expression des performances mesurées en test d'apprentissage et de rétention.

Quant à l'exposition des agnelles stressées par le traitement négatif à des événements positifs surajoutés, l'analyse de nos résultats révèle des effets intéressants qui demandent à être confirmés par des travaux ultérieurs.

Ce traitement positif surajouté réduit l'appréhension de l'homme (familier) observée chez les animaux stressés chroniquement (voir article 4). L'homme a ici une position ambiguë, il est à la fois agent d'enrichissement car il nourrit les animaux et agent contraignant car il est associé à la plupart des événements négatifs déployés dans le traitement stressant. Cette ambiguïté aurait pu être un facteur de stress important d'autant que nous avons montré que le traitement de stress induisait un biais négatif de jugement. Il aurait été intéressant d'évaluer les réponses de ces animaux à la présence d'hommes familiers habillés en blanc (homme à valence supposée négative) et en vert (homme à valence supposée positive), ainsi qu'un homme non familier (voir l'expérience réalisée dans l'article 3 sur les animaux stressés chroniquement).

L'exposition d'agnelles stressées à des événements positifs surajoutés induit également des modifications dans le jugement de situations ambiguës. Plus précisément, nos résultats (article 5) révèlent une potentialisation dans la perception des événements à valence positive sans pour autant avoir modifié le biais négatif induit par le traitement stressant. Ce traitement comportemental surajouté aurait agi en réduisant l'anhédonie consécutive à l'expérience stressante sans pour autant modifier l'alliesthésie négative mise en évidence chez les agnelles stressées. L'exposition à des événements positifs surajoutés semble donc une approche comportementale pertinente pour tenter de contrecarrer en partie les effets délétères sur la représentation cognitive induits par une expérience stressante répétée.

Pour concevoir des pratiques d'élevage innovantes qui amélioreraient véritablement la qualité de vie des animaux, les événements « positifs » utilisés dans une expérience d'enrichissement doivent être réellement positifs du point de vue de l'animal. Des études de psychologie et de neurosciences chez les animaux permettent de fournir un cadre d'étude pragmatique basé sur les fonctions cognitives (comme l'anticipation positive, le contraste ou la contrôlabilité des événements) pour rechercher un enrichissement appréhendé du point de vue de l'animal et donc améliorer réellement son bien-être (revue Boissy et al., 2007).

L'accumulation d'émotions négatives peut augmenter la réactivité émotionnelle de l'animal lors de tests de peur (nouveau et homme) et biaiser ses fonctions cognitives plus avancées de catégorisation/généralisation, de jugement et de mémoire. Ces modifications semblent pouvoir expliquer la mise en place d'un état affectif négatif persistant, appelé communément stress chronique.

A l'inverse, une répétition d'émotions positives semble pouvoir contrebalancer certains effets délétères du stress chronique, tels que l'amélioration de la perception et la mémorisation d'événements positifs.

Cependant, d'autres études sont nécessaires pour améliorer et valider une exposition à des événements positifs répétés comme possible thérapie comportementale à la suite d'une expérience stressante voire comme pratique innovante en élevage pour instaurer un état affectif positif plus en adéquation avec le concept de bien-être (et non plus uniquement de moindre mal-être).

## **2. Quelles mesures comportementales et/ou physiologiques peuvent être indicatrices d'un état affectif persistant de bien-être ou de stress ?**

Chez les animaux, en l'absence de rapport verbal, seules les réponses physiologiques et comportementales à des stimulations données sont disponibles pour appréhender les émotions. De sorte que, dans une situation dont les caractéristiques sont connues par rapport à l'animal (nouveau, agrément, correspondance aux attentes, contrôlabilité, signification aux normes), l'émotion que va ressentir cet animal peut être déduite (joie, dégoût, anxiété, peur, colère...) (Veissier et al., 2009). Des tests émotionnels des caractéristiques de l'évaluation d'une situation ont alors permis de caractériser précisément les modifications comportementales et physiologiques des ovins (Désiré *et al.*, 2004). Néanmoins la plupart du temps, les indicateurs comportementaux et physiologiques validés pour évaluer une émotion donnée sont inopérants pour explorer les états de bien-être ou le stress chronique. Il est donc nécessaire de développer et de valider des mesures physiologiques et comportementales d'états affectifs plus persistants.

## 2.1 Les mesures physiologiques d'un état affectif persistant

Dwyer and Bornett (2004) proposent des outils d'évaluation de l'état de stress chronique chez le mouton et leur utilisation possible en conditions d'élevage. Dans cette étude, un stress chronique est défini lorsque l'animal est incapable de répondre correctement à un évènement négatif persistant ou lorsque plusieurs évènements négatifs sont présents simultanément. Ils proposent d'utiliser comme indicateurs de l'état de stress chronique : les réponses neuroendocriniennes comme les réponses de l'axe hypothalamo-pituitaire-adrénocortical (HPA) ou du système sympatho-adréno-medullaire (SAM), les réponses d'hormones sexuelles (comme la sécrétion de LH), la croissance (du poids de l'animal ou de sa laine) ou les réponses immunitaires (comme les taux de neutrophiles ou de lymphocytes, la résistance aux parasites).

Les variables physiologiques qui ont été utilisées au cours de cette thèse sont la concentration de cortisol plasmatique (axe HPA), l'activité cardiaque (système SAM) et la numération formule sanguine (réponses immunitaires). Nous avons émis les hypothèses suivantes :

- l'activité cardiaque et le niveau de cortisol plasmatique, à la suite d'un évènement induisant une émotion négative comme une situation de nouveauté ou de soudaineté, augmenteraient plus chez les animaux stressés chroniquement que chez les animaux contrôles (Dwyer and Bornett, 2004).
- le nombre de globules blancs ou leucocytes serait inférieur chez les animaux stressés chroniquement que chez les animaux contrôles comme ce qui est observé chez l'homme (Leonard and Song, 1996; Bellingrath et al., 2010).

Lors de nos expérimentations, la plupart des mesures physiologiques utilisées comme marqueurs de stress chronique ne diffèrent pas entre groupes d'agnelles (par exemple groupe stressé chroniquement vs. groupe contrôle) ou ne sont pas en accord avec la littérature.

### 2.1.1 L'axe corticotrope

À la suite d'un stress aigu, l'axe HPA ou axe corticotrope est activé. Les zones du cerveau, l'hippocampe et l'amygdale, sont activés et envoient des informations nerveuses vers l'hypothalamus qui synthétise le CRH (corticotropin-releasing factor), peptide qui va être libéré dans le sang. Le CRH stimule alors l'hypophyse qui va agir *via* des récepteurs spécifiques sur les cellules endocrines fabriquant l'ACTH (adrenocorticotropin hormone). Celle-ci va être à son tour libérée dans le sang pour atteindre une glande endocrine située au-dessus du rein, la surrénale, dont la partie corticale synthétise les corticoïdes, tels que le cortisol.

Lors d'un stress aigu (ou évènement négatif ponctuel), une élévation transitoire du niveau de cortisol plasmatique est observée chez les animaux de ferme en général (revue de Korte, 2001). Lors d'un stress chronique, les variations de ces paramètres ne sont pas si constantes (Rushen, 1991). En effet, les niveaux de base de cortisol plasmatique augmentent chez des porcs stressés chroniquement (Janssens et al., 1995) alors que ces niveaux ne varient pas dans d'autres études sur le stress chronique chez des bovins (Veissier et al., 2001) ou des ovins (Doyle et al., 2011). Une diminution de ces niveaux de base de cortisol plasmatique a pu être également mise en évidence chez des animaux stressés chroniquement (porcs : de Jong et al., 2000; oiseaux : Cyr and Romero, 2007). De plus, les réponses de l'axe HPA des animaux en état de stress chronique ne semblent pas être constantes lors d'une exposition à un stress aigu. Il s'agirait d'une altération des systèmes de contrôle lors de la réponse au stress aigu. Ainsi, Jensen et al. (1996) montrent que la réponse de l'axe HPA à un stress aigu d'un animal dans un état de stress chronique dépend du « stade » de l'état émotionnel. Au début de l'exposition à un stress aigu la réponse de l'axe HPA est augmentée puis un phénomène d'habituation générale est observé. Ces auteurs concluent que ni les niveaux de base de cortisol ni la réponse surrénale à l'ACTH ne peuvent être à eux seuls des indicateurs fiables d'un état émotionnel persistant.

Pour confirmer cette hypothèse, des études sur le stress chronique montrent que les réactions physiologiques de sécrétion de cortisol à la suite d'un stress aigu dépendent du moment de la journée (hormone à rythme circadien et sécrétion pulsatile), du type de stress aigu (stress physique ou psychologique) et principalement de la possibilité de l'animal à développer une stratégie d'adaptation (« coping strategy »). Par exemple, une expérience d'instabilité sociale, connue pour induire un état affectif négatif chez un animal induit une plus grande sensibilité des glandes surrénales à la suite d'une injection d'ACTH c'est-à-dire une stratégie plutôt de réactivité (Dantzer et al., 1983; Veissier et al., 2001), alors que l'attache prolongée de l'animal induit une plus faible sensibilité des glandes surrénales, c'est-à-dire une stratégie plutôt d'apathie (Broom, 1987; Ladewig and Smidt, 1989). Chez les ovins, Doyle et al. (2011) montrent que l'induction d'un état de stress chronique ne modifie ni le niveau de cortisol plasmatique basal (obtenu en faisant la moyenne des résultats des dosages de 4 prélèvements réalisés le matin à 20 minutes d'intervalle) ni la sensibilité des glandes surrénales à la suite d'une injection d'ACTH. De même, Calandreau et al. (2011a) montrent l'absence d'effet du traitement sur les niveaux de corticostérone plasmatique avant et après un stress aigu (une contention) entre des caillles stressées chroniquement et des caillles témoins.

Lors de nos expérimentations, les animaux stressés chroniquement avaient tendance à avoir des niveaux de cortisol plus bas en réponse à des événements négatifs : la soudaineté, le confinement et les situations ambiguës du test de jugement. Ce résultat était donc contraire à notre hypothèse de départ et reste difficile à expliquer. Des prises de sang régulières sur 24 heures, pour déterminer le niveau de cortisol basal de chacun des groupes, auraient pu nous aider à comprendre l'effet du traitement sur l'axe HPA. Comme Doyle et al. (2011), nous n'avons pas observé de différence entre le groupe stressé chroniquement et le groupe contrôle dans leurs réponses surrenaliennes à l'ACTH.

Suite à nos expérimentations, il est donc difficile de conclure sur l'effet du stress chronique sur les niveaux de cortisol plasmatique que ce soit les niveaux de base ou les niveaux après un stress aigu. De plus, les effets sur ce paramètre dans la littérature ne semblent pas constants suivant les espèces, les moyens d'induire un état affectif négatif ou les stress aigus utilisés. Le cortisol plasmatique ne semble pas être une mesure pertinente pour explorer les états affectifs chez l'animal. Il serait alors intéressant d'explorer d'autres indicateurs potentiels d'un état de stress chronique telle que la DHEA (déhydroépiandrosterone), stéroïde libéré par les surrénales. En effet, chez l'homme, il a été montré que des variations du rapport cortisol/DHEA étaient corrélées à des modifications d'humeur et de perceptions de situation de stress (Cruess et al., 1999).

### 2.1.2 Le système sympatho-adréno-médullaire

À la suite d'un stress aigu, le système sympatho-adréno-médullaire est également activé. Ce système est déclenché par l'hypothalamus et le système nerveux sympathique, qui vont activer l'aire médullaire des glandes surrénales. Cette partie médullaire sécrète alors des hormones, appelées les catécholamines, telles que l'adrénaline ou la noradrénaline. Les catécholamines induisent des modifications physiologiques de l'organisme comme l'augmentation de la fréquence cardiaque, de la pression artérielle et du taux de glucose dans le sang.

Les catécholamines peuvent être dosées dans le sang ou les urines des animaux. Cependant, lors de nos expérimentations, nous avons choisi d'utiliser des techniques directes et non invasives qui ont été mises au point pour mesurer l'activation du système neurovégétatif chez les animaux (Despres et al., 2003; Valance et al., 2007; von Borell et al., 2007) comme la mesure de la fréquence cardiaque par télémétrie. En effet, lors d'un stress aigu (ou événement négatif ponctuel), une élévation transitoire de la fréquence cardiaque est observée chez les

animaux de ferme (revue de von Borell et al., 2007). Par exemple, un évènement soudain induit une augmentation de l'activité cardiaque chez le mouton (Désiré et al., 2006).

Chez l'homme, le lien entre état émotionnel persistant et activité cardiaque est très étudié. En effet, un état émotionnel très négatif peut entraîner des dysfonctions cardiovasculaires voire des arrêts cardiaques dus à l'augmentation de l'activité cardiaque ou tachycardie (Carnevali et al., 2012). Un des mécanismes de ces dysfonctions cardiovasculaires pourrait être une altération de la balance sympathovagale cardiaque due à une activation importante du système nerveux sympathique et/ou une réduction du frein vagal (Rechlin et al., 1994; Kemp et al., 2010). Chez des rats sévèrement et chroniquement stressés (isolés socialement pendant 4 semaines à la suite d'une « défaite sociale » c'est-à-dire une agression par un congénère dominant), des altérations cardiaques ont été observées comme des altérations transitoires du rythme circadien de l'activité cardiaque, un déficit d'habituation de la réponse cardiaque autonome à un stress aigu et une hypertrophie modérée du ventricule droit du cœur (Carnevali et al., 2012). Similairement, des agnelles issues de brebis ayant subi un stress prénatal (les 5 dernières semaines de gestation) présentent une réduction du frein vagal c'est-à-dire une augmentation de l'activité cardiaque lors d'un stress aigu par rapport aux agnelles contrôles (Coulon et al., 2011).

Lors de nos expérimentations, les agnelles stressées chroniquement avaient une activité cardiaque plus faible que les agnelles contrôles pendant le test à l'objet nouveau ou lorsqu'elles étaient dans leur loge sans activité humaine (ce qui pourrait correspondre à une mesure de l'activité cardiaque de base). D'après la littérature, observer une activité cardiaque de base plus faible chez des animaux stressés chroniquement est un résultat surprenant. Cependant, une interprétation de l'activité cardiaque de base observée dans notre expérimentation est très difficile. En effet, l'activité cardiaque est connue pour être influencée par l'activité locomotrice et lors de notre expérimentation l'activité locomotrice n'a pas été observée. Nous pourrions alors supposer que les agnelles contrôles dans leur loge sans activité humaine étaient plus actives que les agnelles stressées chroniquement. Par contre, si aucune différence d'activité locomotrice n'avait été montrée entre les agnelles dans leur loge sans activité humaine, comme c'est le cas durant le test à l'objet nouveau, nous pourrions supposer que les agnelles stressées chroniquement grâce aux évènements aversifs subis sur une longue période auraient « entraîné leur cœur ». Ce phénomène de diminution de la fréquence cardiaque peut être observé par exemple chez des sportifs grâce à leur entraînement quotidien.

De façon similaire, Doyle et al. (2011) montrent que des agnelles stressées chroniquement ont une fréquence cardiaque plus faible lors d'un test de non correspondances aux attentes (stress aigu) que des agnelles contrôles. Ces auteurs interprètent cette différence comme une habitude potentielle des agnelles stressées chroniquement aux stress aigus du fait de leur traitement négatif (une exposition quotidienne à des événements négatifs nouveaux et soudains). Néanmoins, dans nos expérimentations en particulier lors du test de jugement, les agnelles stressées chroniquement avaient tendance à avoir une activité cardiaque plus élevée avant le début du test. Aucune différence significative n'avait été observée lors du test à la soudaineté.

L'activité cardiaque ne peut donc pas être une mesure pertinente de l'état de stress chronique des ovins du fait de problèmes méthodologiques. Cependant, cette mesure cardiaque (non invasive) semble être intéressante comme indicateur d'état affectif persistant chez l'animal. D'autres études, faisant appel notamment à des paramètres de la variabilité de la fréquence cardiaque, sont donc nécessaires pour valider cette mesure. La variabilité de la fréquence cardiaque correspond aux oscillations de la période cardiaque sous l'influence de l'activité respiratoire. La validité de cette mesure comme indicateur de la balance sympatho-vagale a été vérifiée chez l'ovin (Despres et al., 2003).

### 2.1.3 Le système immunitaire

Les émotions positives ou négatives peuvent avoir un impact sur le système immunitaire des animaux et de l'homme, ainsi, Boissy et al. (2007b) suggèrent que la réaction immunitaire pourrait être un indicateur d'état affectif persistant. En effet, un état affectif très négatif peut être déterminé en partie par l'état de santé de l'individu. Par exemple, chez les personnes stressées chroniquement voire dépressives, les réponses immunitaires peuvent être modifiées : le nombre de globules blancs (leucocytes) de ces personnes peut être inférieur à celui de personnes non stressées (Leonard and Song, 1996; Bellingrath et al., 2010). Un état affectif négatif peut donc entraîner une défaillance du système immunitaire. De la même façon, un état de stress chronique chez le rat entraîne une diminution du nombre des leucocytes et en particulier des lymphocytes (Zager et al., 2007).

Dans notre expérimentation, le nombre de leucocytes et en particulier le nombre de granulocytes était significativement plus faible chez les agnelles stressées chroniquement que chez les agnelles témoins.

Pour aller plus loin, d'autres expérimentations pourraient être conduites pour explorer l'effet de l'état affectif persistant sur la santé chez l'animal. Par exemple, en collaboration avec L. Guilloteau (INRA de Nouzilly), nous avons évalué la réponse immunitaire après une vaccination (Ovilis® Chlamydia, vaccin vivant utilisé couramment en élevage) sur deux groupes d'animaux, le groupe d'animaux stressés chroniquement et le groupe d'animaux témoins. Ces données (température, formule sanguine, réponse inflammatoire, production d'anticorps) sont en cours d'analyse. De plus, des essais avec une caméra thermique (FLIR, ThermaCAM) ont été réalisés afin d'évaluer de manière non invasive la température interne des animaux au niveau de leurs yeux.

#### 2.1.4 De nouvelles approches de marqueurs physiologiques

La psychobiologie du stress a grandement évolué ces dernières années et les méthodes d'évaluation et d'analyse du stress chronique chez l'homme ou les animaux modèles (rongeurs) se sont affinées. Certaines méthodes pourraient être développées chez les espèces de ferme afin d'améliorer notre compréhension des facteurs de bien-être ou de stress.

Par exemple, des études s'intéressent aux variations des facteurs d'inflammation comme la protéine C activée ou l'interleukine 6 en fonction de l'état affectif de l'individu (Weinstein et al., 2010). Suite à une émotion négative, des patientes avec des douleurs ont montré des réponses inflammatoires (quantité d'interleukines 6) augmentées (Darnall et al., 2010). Brummett et al. (2010) suggèrent même qu'un état affectif négatif de dépression pourrait être lié aux facteurs d'inflammation mais que ce lien complexe dépendrait entre autres du sexe et du tempérament du patient.

Les approches génomiques pourraient également être intéressantes afin de comprendre la mise en place d'état affectif persistant. Chez l'homme, une approche nouvelle (combinant transcriptomique et bioinformatique) a été mise en place et consiste en une étude globale de l'activation des gènes cibles des hormones du stress et des facteurs de l'inflammation exprimés dans les cellules sanguines (Cole et al., 2011). Cette analyse permet de définir une signature biologique du stress chronique subi par les individus qui est stable car l'activation des gènes n'est pas fluctuante comme les hormones et qui est globale car tous les gènes exprimés dans ces cellules sont analysés en même temps. De plus, cette analyse est peu invasive puisqu'elle ne nécessite qu'une prise de sang.

Par ailleurs, l'explosion de la génomique a donné naissance à des approches qui sont encore peu exploitées pour l'étude de la biologie du stress comme la phylogénétique et la méta-

analyse des données de génomique fonctionnelle. Le séquençage de nombreuses espèces d'animaux d'élevage et le développement d'outils bioinformatiques et statistiques permettraient d'appliquer les progrès de la biologie du stress et de la génomique aux études des réponses de stress dans le contexte agronomique. L'évaluation du stress par des études transcriptomiques et bioinformatiques pourrait conduire à des résultats plus précis, plus fiables et complémentaires des évaluations classiques basées sur la mesure dans le sang ou la salive, d'hormones ou de facteurs d'inflammation qui fluctuent facilement. Une première approche vient d'être engagée sur le cheval (Moisan, Foury et Lansade, communication personnelle). Cette approche vient de mettre en évidence des différences importantes dans l'activation de gènes des hormones de stress entre des chevaux vivants dans un milieu enrichi et d'autres chevaux élevés dans un milieu standard. Cette nouvelle approche apparaît très prometteuse pour fournir des marqueurs biologiques de stress chronique qui font actuellement défaut.

Actuellement, les marqueurs biologiques de stress chronique font défaut. Les réponses physiologiques de stress aigu, comme le niveau de cortisol plasmatique, la mesure de l'activité cardiaque ou la numération de la formule sanguine, prises indépendamment ne sont pas des indicateurs fiables d'état affectif persistant. Pour évaluer un état affectif persistant comme le bien-être, Manteca (1998) propose de prendre en compte un ensemble de variables physiologiques mais aussi de variables comportementales.

La mise en place de nouvelles méthodes de méta-analyses, associant à la fois les données de génomique, des marqueurs biologiques de stress nouveaux et plus classiques, devrait être efficace pour caractériser les états affectifs.

## **2.2 Les mesures comportementales d'un état affectif persistant**

Pour évaluer un état affectif, des méthodes d'analyse fine des comportements ont été développées, comme l'identification de la posture de la tête ou des oreilles de l'animal (Désiré et al., 2006; Reefmann et al., 2009a; Reefmann et al., 2009b) mais aussi la compréhension de ses capacités à anticiper, à évaluer et à prendre des décisions (Pardon et al., 2000; Harding et al., 2004).

Dans nos expérimentations, pour évaluer l'état affectif de l'animal nous avons utilisé des tests classiques de réactivité émotionnelle (nouveau, soudaineté et présence de l'homme), et des tests de jugement et d'apprentissage/mémoire. Les tests de réactivité émotionnelle utilisés

correspondent à des processus cognitifs d'évaluation de la situation quasiment rudimentaires et automatiques (Scherer, 1999) qui demandent un traitement minimum. A l'inverse, les tests de jugement et d'apprentissage sont des tests qui exigent une mobilisation des processus cognitifs plus élaborés pour évaluer la situation basés sur l'anticipation, la référence à l'expérience passée et la comparaison (Herrnstein, 1990).

### 2.2.1 Les tests de réactivité émotionnelle

Dans notre équipe de recherche, il a été montré que des processus élémentaires cognitifs sont pertinents pour l'animal (Boissy, 2005). Pour cela, une étude systématique des réactions comportementales et physiologiques, notamment la fréquence cardiaque, a été réalisée chez des agneaux en conditions expérimentales. Ainsi par exemple, les agneaux évaluent les caractéristiques intrinsèques de l'événement comme son caractère soudain et familier (Désiré et al., 2006). Ces caractéristiques de « soudaineté » et de « familiarité » sont relativement faciles à mettre en place et à contrôler dans un dispositif scientifique. Elles permettent de caractériser une modulation de la réactivité émotionnelle de l'animal consécutive à une expérience négative durable et pourraient donc être utilisées pour évaluer un état affectif. Ainsi, Boissy et al. (2001) montrent que la réactivité émotionnelle de génisses exposées à un traitement de stress chronique (des réallotements hebdomadaires) pendant 14 semaines était exacerbée lors de tests de soudaineté et de non familiarité. A l'inverse, Broom (1987) montre que des truies à l'attache c'est-à-dire dans un état de stress chronique ont une réactivité émotionnelle diminuée lors d'un test de soudaineté. Dans un cas, la réactivité émotionnelle augmente s'apparentant à de l'hyperréactivité et dans l'autre cas, elle diminue s'apparentant à de l'apathie (Broom, 1987; Ladewig and Smidt, 1989). Une apathie se développerait lorsque l'animal n'a plus aucun contrôle sur les événements négatifs, alors qu'une hyperréactivité résulterait du fait que l'animal soit parvenu à les contrôler (Dantzer, 1989). Par exemple, un rat qui est capable de contrôler son environnement par un comportement appris, apparaît par la suite moins perturbé par de nouvelles contraintes qu'un animal ne pouvant maîtriser son environnement car imprévisible ou incontrôlable (Dantzer, 1989).

Dans nos expérimentations, le traitement de stress chronique (une exposition imprévisible pendant 6 semaines à des événements incontrôlables et aversifs) augmente la réactivité des animaux à la non-familiarité (objet nouveau). Ce résultat est contradictoire aux quelques travaux entrepris par ailleurs : Doyle et al. (2011) sur ovins et Calandreau et al (2011a) sur cailles japonaises montrent qu'un stress chronique ne modifie pas la réactivité à la non

familiarité. Par contre, nous rapportons que le même traitement de stress chronique n'a aucun effet sur la réactivité à la soudaineté. L'absence de différence lors du test de soudaineté serait éventuellement due à un effet seuil. En effet, l'évènement soudain utilisé dans nos expérimentations, de par entre autre sa proximité vis-à-vis de l'animal, aurait un effet anxiogène trop marqué et tous les animaux y répondraient de la même façon quel que soit leur état affectif. De la même façon, Doyle et al. (2011) ne montrent pas de différences comportementales entre des ovins soumis à une exposition de 4 semaines à des évènements imprévisibles et aversifs et des animaux contrôles lors de tests de soudaineté. Cette hypothèse est également suggérée par Boissy et al. (2001) pour des veaux stressés chroniquement qui réagissaient de la même façon que des veaux contrôles lors d'un test de soudaineté (une ouverture soudaine d'un parapluie). A cet effet seuil, le fait que la perception de la soudaineté repose sur un processus quasi-automatique pourrait également expliquer l'absence d'effet du traitement stressant. D'après les théories de l'évaluation développées en psychologie cognitive pour évaluer les émotions (Scherer, 1999), l'évaluation d'un évènement soudain ou familier est le processus d'évaluation le plus automatique. On peut alors supposer que lors des tests de réactivité émotionnelle que nous avons utilisés (non familiarité et soudaineté), les animaux expriment des réponses plutôt de type réflexe. L'automatisme de la réponse comportementale rend alors difficile la discrimination des animaux suivant leur état affectif.

Par contre, ces hypothèses explicatives ne semblent plus valables pour analyser les résultats obtenus avec l'ajout du traitement enrichi dans notre dernière expérience (Article 5). Les ovins stressés recevant en plus un traitement positif (accumulations d'émotions positives) se caractérisent par une réactivité exacerbée non seulement à la non-familiarité mais également à la soudaineté par rapport aux ovins uniquement stressés. Par conséquent, les tests classiques de réactivité émotionnelle qui demandent un minimum de mobilisation des processus cognitifs par l'animal ne semblent pas les plus adaptés pour rechercher d'éventuelle modulation dans les processus d'évaluation à la base d'un vécu émotionnel donné.

### 2.2.2 Les tests de jugement, d'attention et d'apprentissage

La mise en évidence de biais systématiques dans la manière dont l'animal anticipe puis évalue son environnement pourrait permettre de les utiliser à la fois comme indicateurs et comme facteurs explicatifs du développement d'un état affectif persistant. Par exemple, chez les animaux de laboratoire, une expérience émotionnelle peut moduler durablement leurs capacités d'évaluation. Des rats (Harding et al., 2004) ou des souris (Pardon et al., 2000)

soumis de manière répétée à des événements imprévisibles, connus pour induire un état de stress chronique, présentent une altération de leurs capacités à juger et à prendre des décisions. L'analyse des biais cognitifs, dans des tests de jugement (Harding et al., 2004) ou d'apprentissage (Sandi and Pinelo-Nava, 2007) par exemple, sous l'effet d'émotions répétées permettrait de mieux comprendre la mise en place d'états affectifs persistants comme le stress chronique ou le bien-être. Ainsi, ces biais pourraient être des mesures non invasives utiles pour évaluer les états affectifs persistants chez les animaux (Paul et al., 2005; Boissy et al., 2007b; Mendl et al., 2009; Sandi and Richter-Levin, 2009).

Sandi and Pinelo-Nava (2007) suggèrent que l'état de stress chronique modifie différemment les processus cognitifs d'apprentissage et de mémoire chez l'animal : le stress chronique tend à faciliter les apprentissages de base comme le conditionnement de Pavlov mais peut avoir un effet délétère sur les processus d'apprentissage plus complexes comme les apprentissages instrumentaux spatiaux. Dans notre expérimentation, nous avons pu confirmer cette hypothèse : les animaux stressés chroniquement ne présentent pas de différence par rapport aux contrôles lors de la phase d'acquisition du test d'apprentissage c'est-à-dire lors d'une phase d'apprentissage de base requérant peu de processus cognitifs (une discrimination simple, Herrnstein 1990). Par contre, les animaux stressés chroniquement présentent un déficit d'apprentissage par rapport aux contrôles lors de la phase de rappel du test qui correspond à une phase complexe d'apprentissage requérant que les ovins se souviennent de la discrimination (Zayan and Vauclair, 1998).

Doyle et al. (2011) montrent également que des moutons exposés durant plusieurs semaines à des événements aversifs interprètent de manière négative les événements plus ou moins ambigus, traduisant l'instauration d'un état pessimiste. Dans nos expérimentations, nous avons pu confirmer ce résultat : un état de stress chronique peut induire un biais négatif de jugement chez l'ovin révélant un état pessimiste. De plus, les résultats du test de jugement semblent concordants : les ovins stressés chroniquement ont un jugement plus pessimiste que les témoins (Article 2) mais aussi que les ovins bénéficiant d'un enrichissement en plus de leur expérience de stress (Article 5).

Plus précisément, les ovins stressés chroniquement présentent un biais négatif de jugement sur les positions de seau négatives et ambiguës proches de la position négative (versant plutôt négatif) par rapport aux témoins, révélant une alliesthésie négative. L'augmentation des émotions négatives chez l'animal par un traitement de stress chronique aurait un effet qui

favoriserait plutôt le traitement négatif des informations ambiguës et donc les tendances pessimistes voire éventuellement l'anhédonie. Si les ovins stressés recevant en plus un traitement positif (ovins enrichis) ne sont pas différents sur l'approche des positions négatives du seau que les ovins stressés, ils approchent plus facilement du seau en position intermédiaire proche de celle récompensée. De la même façon, les ovins sous Diazépam, un des principaux anxiolytiques utilisés en psychopharmacologie, diffèrent spécifiquement des témoins sur la position ambiguë proche de la position positive. Ainsi, l'exposition répétée à des événements à valence positive aurait un effet thérapeutique qui favoriserait plutôt la perception positive d'informations ambiguës révélant une réduction de l'anhédonie induite par une expérience stressante préalable, voire éventuellement une tendance optimiste.

Nous pourrions alors émettre l'hypothèse d'une dichotomie de processus d'évaluation mise en évidence dans le test du biais utilisé dans cette thèse avec les seaux plutôt « négatifs » (position négative et position ambiguë proche de la position négative) qui permettraient d'évaluer le pessimisme chez l'animal et les seaux plutôt « positifs » (position positive et position ambiguë proche de la position positive) qui permettraient d'évaluer l'optimisme.

Les quelques expériences conduites essentiellement chez les rongeurs peuvent confirmer nos résultats : l'induction répétée d'expériences émotionnelles positives permet également de compenser les effets néfastes d'une expérience stressante chez le rat (van der Harst et al., 2005). Dans notre expérimentation, nous avons utilisé comme induction d'émotions positives chez l'animal, des interactions sociales d'affinité avec l'homme ou encore l'anticipation d'une récompense alimentaire (Boissy et al., 2007b). L'anticipation d'événements positifs est un comportement préparatoire qui se traduit par une activité tournée vers le but, reflétant une excitation durant cette phase appétitive avant l'accès à la récompense (Spruijt et al., 2001). Il semble donc possible d'enrichir à moindre coût le milieu d'élevage par des événements et des pratiques qui génèrent des émotions positives chez l'animal. Le développement de ces pratiques d'enrichissement vise non seulement à réduire l'inconfort des animaux (diminution du stress chronique), mais surtout à améliorer leur qualité de vie (augmentation du bien-être).

Pour évaluer un état affectif persistant, les mesures de réactivité émotionnelle demandant une moindre mobilisation des processus cognitifs semblent moins fiables que les mesures de jugement ou d'apprentissage complexe demandant une mobilisation des processus cognitifs plus importante (Herrnstein 1990).

La confirmation de biais systématiques dans la manière dont l'animal évalue son environnement permet donc d'envisager d'utiliser ces biais cognitifs comme autant d'indicateurs comportementaux et donc non invasifs d'un état d'inconfort. D'autres études sont néanmoins nécessaires pour comparer l'efficacité de l'approche du biais cognitif à d'autres mesures d'état affectif.

### **3. Vers une prise en compte de la variabilité interindividuelle dans les études sur la construction d'états affectifs**

Lors de nos tests d'évaluation du comportement, c'est-à-dire les tests de nouveauté, soudaineté, de jugement ou d'apprentissage, certains animaux (environ 30% de l'effectif total) ne sont pas parvenus au critère indispensable consistant à accepter de s'alimenter en isolement dans les dispositifs de test. Sur ces quatre tests de comportement, ce sont en grande partie les mêmes animaux qui n'ont jamais atteint ce critère, et ce malgré le fait que le dispositif variait d'un test à l'autre, hormis les conditions d'isolement. Les ovins étant des animaux très grégaires, le fait d'être séparés de leurs congénères dans le dispositif de test constitue en soi une contrainte si forte pour certains animaux qu'ils seraient incapables de se familiariser malgré la répétition des essais. Cette hypothèse basée sur les différences interindividuelles dans le degré de dépendance au groupe est renforcée par le nombre important de vocalisations émises par ces mêmes animaux. A partir d'une analyse de la variabilité génétique des comportements sociaux, Boissy et al. (2005) rapportent des coefficients d'héritabilité très élevés pour les mesures d'attraction au groupe et de détresse en l'absence du groupe chez les ovins et des corrélations génétiques importantes entre toutes ces mesures. Dans la deuxième expérience, la réactivité notamment à la séparation sociale a été évaluée avant de constituer les lots expérimentaux. Aussi, sommes nous en mesure d'établir des profils réactionnels et de les mettre en relation avec les performances des agnelles dans chacun des tests comportementaux réalisés pour la plupart dans les conditions d'isolement.

Au delà du biais induit par une variabilité dans l'attachement au groupe, des prédispositions génétiques existent également pour d'autres caractères réactionnels que nous proposons de discuter dans cette partie. En outre, une discussion sur le concept de tempérament et sur l'influence des expériences vécues par l'animal sur les performances en tests complètera cette partie.

### **3.1 Des prédispositions génétiques à réagir plus ou moins aux événements environnementaux**

Un grand nombre de recherches chez l'homme et l'animal ont démontré l'existence d'une composante génétique dans de nombreux caractères comportementaux (Cesarini et al., 2008; Fowler et al., 2009). Ainsi des caractères tels que la peur et l'anxiété, mais aussi l'aptitude à la dominance, l'agressivité et le comportement sexuel apparaissent comme particulièrement sensibles à la sélection génétique en plus des caractères sociaux ((Hansen, 1996; Jones, 1996; Mignon-Grasteau et al., 2005; Jensen et al., 2008).

Chez l'homme, les prédispositions à être plus ou moins sensibles à un évènement traumatisant (un stress aigu) et à développer des désordres post-traumatiques suite à celui-ci sont très étudiées. Les recherches scientifiques ont d'ailleurs identifié des niveaux individuels de vulnérabilité au développement de désordres post-traumatiques (revue de Norris et al., 2002). Par exemple, Farach et al. (2008) ont montré chez des personnes ayant survécu aux attentats du 11 septembre 2001 qu'un désordre initial de l'anxiété pouvait prédire des désordres post-traumatiques un an après le traumatisme comme une déficience fonctionnelle, une perte des repères psychosociaux, des troubles de l'humeur et des symptômes d'anxiété.

Chez les animaux, la tendance à être plus ou moins émotif a aussi été mise en évidence voire utilisée en expérimentation ou en élevage. En effet, le processus de sélection consiste en la production intentionnelle de certaines lignées afin d'accentuer leurs traits génétiques caractéristiques. Il permet ainsi d'obtenir des modèles d'étude présentant des valeurs extrêmes pour ces traits de comportements. Les études réalisées sur ces modèles biologiques visent à déterminer les facteurs qui influencent l'expression de ces comportements, afin de les contrôler et de traiter des réactions comportementales signes d'un mal-être ou d'améliorer le bien-être des animaux en élevage. Par exemple, chez les oiseaux d'élevage, ce type de sélection a été mis en œuvre pour obtenir des modèles permettant d'étudier les mécanismes impliqués dans l'expression de trois comportements fréquemment rencontrés dans les

élevages: les comportements de peur, le comportement de picage et les comportements induits par un état de stress social qui peuvent être une source d'atteintes au bien-être des animaux. La comparaison d'oiseaux aux phénotypes extrêmes permet de déterminer si l'ajustement de leurs réactions comportementales faciliterait leurs capacités d'adaptation au milieu d'élevage, et de mieux comprendre les mécanismes sous-tendant ces comportements. Une sélection génétique sur les comportements de peur basée sur la durée d'immobilité tonique (Mills and Faure, 1991) ou la corticostéronémie en situation de contention mécanique (Satterlee and Johnson, 1988) chez la caille japonaise a permis d'obtenir des animaux moins réactifs à diverses perturbations tels que la nouveauté (environnement, aliment, objet), la manipulation par l'Homme et l'isolement (Richard et al., 2008).

### **3.2 Le concept de tempérament**

Le tempérament est généralement défini comme un ensemble de différences individuelles comportementales qui sont relativement constantes à travers toutes sortes de situations et à travers le temps (Lansade et al., 2008b). Jusqu'il y a une trentaine d'années, la notion de tempérament était exclusivement réservée aux humains. Pourtant, le continuum évolutif entre l'homme et les autres animaux suggérait que certaines dimensions de la personnalité pouvaient être communes à une large variété d'espèces. La possibilité de caractériser le tempérament de l'individu afin de pouvoir prédire ses réactions ultérieures trouve un intérêt tout particulier chez l'animal domestique. De nombreuses études ont par exemple été menées chez le porc pour sélectionner les individus les plus adaptés aux contraintes d'élevage intensif (Erhard and Mendl, 1999; Erhard et al., 1999) ou chez le chien pour sélectionner les individus les plus aptes à devenir de bons « chiens guide d'aveugles » (Duffy and Serpell, 2012). Les recherches sur le tempérament du cheval se sont également développées car le tempérament de cet animal est devenu un facteur primordial pour une utilisation adaptée des chevaux, quelle que soit la discipline pratiquée. Par exemple, pour l'équitation de loisir, les chevaux doivent être calmes et peu réactifs afin de ne pas manifester de réactions de peur exagérées (écarts, emballements) pouvant conduire à des accidents. Hors, jusqu'à présent, il n'existait pas de tests objectifs pour sélectionner les chevaux en fonction de leur tempérament. Pour répondre à la demande des professionnels du monde du cheval, une vaste étude scientifique s'est mise en place visant à créer des tests permettant de prédire le tempérament des chevaux (par exemple, (Visser et al., 2002). Grâce à ces tests, les chercheurs ont ainsi montré que le tempérament des chevaux peut être prédit de façon fiable dès l'âge de huit mois (2004; Lansade et al., 2005; Lansade et al., 2008a).

### 3.3 Une tendance à développer plus ou moins un état affectif donné

Dans leur revue, (Heim and Binder, 2012) mettent en évidence l'importance des interactions entre gène et environnement sur les effets d'un stress aigu dans l'enfance. Quel que soit l'environnement, une multitude de gènes peuvent induire un risque d'état affectif négatif persistant suite à un stress aigu survenu dans l'enfance. A l'inverse, ces mêmes gènes semblent pouvoir augmenter les effets bénéfiques d'un environnement positif de l'enfance sur l'état affectif persistant de l'adulte. Les troubles de l'état affectif peuvent donc se mettre en place à cause d'une combinaison de facteurs de stress d'origine génétique et environnementale. Par exemple, Frokjaer (2009) suggèrent qu'un faible taux de liaison de la sérotonine dans le cortex préfrontal dorsolatéral (une réduction de 35% par rapport à des individus dits « normaux ») représente un marqueur génétique des troubles de l'état affectif. Les personnes présentant ce faible taux de liaison sont donc plus enclines à développer un état affectif négatif persistant comme la dépression.

Des études similaires sont désormais développées sur différentes espèces animales. Ainsi, Calandreau et al. (2011b) montrent que deux lignées de cailles japonaises (lignée réactive : longue durée de l'immobilité tonique vs. lignée peu réactive : faible durée de l'immobilité tonique en situation de peur) réagissent différemment à un état de stress chronique. Les cailles stressées chroniquement ont une réactivité émotionnelle exacerbée dans un test de nouveauté et un niveau de cortisol plus bas que des cailles témoins. Ces effets sont principalement observés chez les cailles stressées chroniquement de la lignée réactive.

Dans nos expérimentations, les différences interindividuelles trouvées lors des tests de comportement s'apparentant entre autres au tempérament des individus ont pu avoir un effet sur la variabilité observée dans le développement plus ou moins marqué d'un état affectif persistant à la suite de l'exposition répétée à des événements à valence émotionnelle. La susceptibilité à percevoir plus ou moins négativement/positivement les événements extérieurs constitue donc un facteur qu'il est désormais indispensable de prendre en compte dans les travaux sur le développement des états affectifs de bien-être ou de mal-être. Nous pourrions par exemple supposer que les individus caractérisés par une surestimation (par anticipation et/ou évaluation) des événements à valence positive seraient moins enclins à développer un stress chronique.

#### **4. Perspectives**

Les travaux développés au cours de cette thèse (Chapitre 2) montrent qu'une accumulation d'émotions négatives peut biaiser les processus d'évaluation de l'environnement chez l'ovin en accentuant le jugement négatif, autrement dit en renforçant la perception des informations négatives, processus appelé alliesthésie négative. Par voie de conséquence sur la potentialisation des émotions négatives ressenties en retour, ce biais d'évaluation s'auto-entretient et contribuerait ainsi à perdurer une représentation pessimiste de l'environnement sans pour autant que les contraintes extérieures originelles persistent. La question du bien-être animal, état affectif durable par définition, prend alors tout son sens, au delà de simples réactions émotionnelles fugaces. En outre, l'approche visant à surajouter une expérience positive à la suite d'une expérience négative (Chapitre 3) constitue une ouverture sur les stratégies d'amélioration des conditions d'entretien des animaux en intégrant la valence positive de l'environnement dans la notion de bien-être et non plus uniquement en cherchant à minimiser la valence négative (Boissy et al., 2007b). Outre leur intérêt pour promouvoir des pratiques d'élevage moins contraignantes voire assurant une meilleure qualité de vie, ces biais dans la manière dont l'animal anticipe puis évalue son environnement peuvent être envisagés de manière plus systématique comme indicateurs non invasifs d'un état affectif et plus sensibles que les tests classiques de réactivité émotionnelle. Ces derniers impliquent effectivement peu la composante cognitive des états affectifs puisqu'ils concernent principalement la caractéristique « nouveauté » telle que définie par Scherer (1999) et qui nécessite un traitement minimal de l'information.

Alors que les ovins sont des animaux grégaires, nous avons utilisé la plupart du temps des tests individuels et un pourcentage non négligeable d'animaux trop perturbés par l'isolement a du être écarté des analyses. Des efforts méthodologiques seront donc nécessaires pour développer des tests fiables d'évaluation en groupe et ainsi mieux prendre en compte l'ensemble des caractéristiques psychologiques susceptibles de contribuer au développement d'états affectifs prolongés. De plus, il sera nécessaire d'explorer la notion de persistance des effets délétères étant donné que dans notre approche nous avons pris le parti d'entretenir l'expérience stressante par des « rappels » (une exposition des animaux à trois événements aversifs déjà utilisés dans le traitement négatif par semaine) à l'issue des semaines de traitement négatif. Ce principe de « rappel » est néanmoins généralement utilisé pour tester les effets persistants d'un stress chronique : l'animal est exposé à un élément ayant été utilisé lors

de la phase de traitement négatif, juste avant son passage dans le test comportemental (Sandi and Pinelo-Nava, 2007; Sandi and Richter-Levin, 2009).

La première perspective à ce travail est d'étudier les répercussions d'un stress chronique sur l'intégration de l'animal dans son groupe et plus particulièrement sur ses relations avec ses partenaires sociaux (relations avec les congénères ou le partenaire sexuel, ou encore avec l'homme dans une perspective d'attachement et non plus seulement de réactivité). En effet, les animaux de ferme sont pour la plupart des animaux grégaires avec des liens relationnels forts. Ces animaux utilisent d'ailleurs des signaux sensoriels variés pour reconnaître leurs partenaires sociaux ou sexuels, leur progéniture ou encore leur éleveur (Keeling and Gonyou, 2001). Les liens sociaux dépendent des fonctions cognitives de l'animal qui doit être capable de discriminer et reconnaître ses congénères ainsi que de mémoriser leurs caractéristiques (Kendrick et al., 1996; Kendrick et al., 1997). En plus de la cognition, les émotions sont connues pour être intimement liées à la vie sociale de l'animal de ferme. Des altérations persistantes des fonctions cognitives et/ou de la sensibilité émotionnelle induites par un état de stress chronique peuvent avoir des conséquences négatives sur les relations sociales. Ainsi, un état affectif négatif pourrait influencer l'intégration sociale et donc amplifier le phénomène de stress dû au stress social. Par exemple chez de nombreuses espèces de mammifères, le stress chronique réduit l'activité sexuelle des mâles et induit une suppression de l'ovulation chez les femelles (revue de Blanchard et al., 2001). Par exemple, chez les brebis, une expérience stressante à l'âge adulte altère le comportement sexuel avec une suppression du comportement normal d'œstrus et la baisse de la fertilité (Dobson et al., 2012). Néanmoins, l'impact du stress chronique subi dans le jeune âge sur les comportements de reproduction chez les animaux de ferme est peu documenté alors que de multiples événements anxiogènes peuvent survenir dans la phase juvénile. Certaines variables comme la proceptivité (attraction pour le mâle), la réceptivité (immobilisation favorisant la copulation) ou le comportement maternel des femelles ayant subi un stress chronique dans le jeune âge pourraient alors être autant de pistes de recherches pour des indicateurs d'état affectif persistant utilisables en élevage. Cette perspective est actuellement développée dans le projet ANR dont fait partie mon travail de thèse (Projet ANR EmoFarm<sup>3</sup> coordonné par Boissy et al., 2009).

---

<sup>3</sup> Emofarm. *Cognitive and social alterations induced by repeated unpredictable stress in farm animals*. Projet ANR Blanc 2010-2013. Coordinateur: A. Boissy, 64 pp.

Dans une autre perspective, notre approche nécessite de poursuivre l'exploration pour assurer un niveau de généralisation. Les conclusions tirées ne concernent que l'espèce (ovine), la race (Romane), le sexe (femelle) et l'âge (sub adultes de 5 mois environ) de nos animaux étudiés. La nécessité de faire varier ces quatre facteurs afin de généraliser les conclusions offre des perspectives multiples à ce travail. Par exemple, les mêmes tests comportementaux de jugement/anticipation et d'apprentissage complexe pourraient être utilisés sur des juvéniles pour mieux appréhender les effets délétères d'un stress prénatal (Hild et al., 2011). Dans un nouveau projet, la même procédure d'induction de stress chronique développée dans ce travail de thèse va être reproduite mais sur la femelle gestante (Projet ANR Psysheep mis en place par Coulon et al., 2012). L'hypothèse de ce projet est que les conséquences d'un stress chronique prénatal sur le développement psychobiologique du jeune seraient plus durables que sur l'animal adulte étant donnée la phase de maturation et la plasticité développementale du fœtus (Maccari et al., 1997; revue de Braastad, 1998). En particulier, lors de sa maturation, le cerveau du fœtus est vulnérable aux excès d'hormones en particulier les glucocorticoïdes (le cortisol par exemple). Le stress prénatal peut donc entraîner des modifications au niveau du cerveau du fœtus comme la diminution du développement neuronal impliquant la détérioration des fonctions d'apprentissage et de mémoire.

L'étude de l'effet d'un état affectif sur un biais éventuel de la latéralité serait aussi un développement intéressant à conduire. Chez les vertébrés, les deux hémisphères du cerveau sont spécialisés pour traiter des informations de différentes façons et contrôler différents comportements. L'hémisphère gauche contrôle les comportements établis dans les situations non-stressantes, tandis que l'hémisphère droit répond aux stress aigus et contrôle les phénomènes comportementaux d'urgence et de fuite (revue de Rogers, 2010). Une des hypothèses de Rogers (2010) est que les animaux stressés utilisent de façon prédominante l'hémisphère droit. Par conséquent, un biais dans l'utilisation prédominante de l'hémisphère droit (latéralisation gauche) pourrait expliquer les différences comportementales des animaux possédant un biais cognitif négatif (respectivement un biais cognitif positif). Par exemple chez certaines espèces de primates, le membre préféré (droit ou gauche) pour attraper de la nourriture lorsque l'animal est dans un état affectif positif, reflète la dominance d'un hémisphère du cerveau et pourrait être une mesure accessible indiquant la susceptibilité au stress et la tendance à un biais cognitif positif ou négatif (Rogers, 2009).

Cette mesure de latéralisation pourrait être également une mesure facilement accessible des biais cognitifs voire une mesure de l'état affectif de l'animal d'élevage. Une première

approche sur les ovins est envisageable à partir des bases de données issues de cette thèse en travaillant sur les enregistrements vidéo réalisés lors des expérimentations (première patte avancée lors d'un mouvement, placement par rapport à l'auge...).

Enfin, dans ce travail de thèse, la valence négative d'un état affectif (l'état de stress chronique) a été plus abordée que la valence positive. Nous avons ainsi montré que les relations que l'animal entretient avec son environnement, peuvent être biaisées par une expérience émotionnelle prolongée. La perception pessimiste de l'animal, qui persiste malgré le fait que l'expérience négative ait cessé, contribue à exacerber son mal-être induit par les contraintes environnementales. Au contraire, un enrichissement du milieu semblerait favorable au développement d'une perception positive. Cependant, le versant positif est encore à développer (revue de Mellor, 2012). Par exemple, nous pourrions envisager d'étudier l'impact d'un état émotionnel persistant positif sur la santé de l'animal (son système immunitaire, voir l'étude préliminaire citée précédemment dans la section 2.1.3) car elle a des retombées économiques et sociales directes sur l'élevage. Une meilleure gestion du bien-être notamment précoce dans la vie de l'animal pourrait induire une meilleure gestion intégrée de la santé en élevage et ainsi contribuer à réduire l'utilisation des antibiotiques : les animaux dans un état de bien-être seraient moins vulnérables aux agents pathogènes (comme ce qui est montré chez l'homme).

Pour conclure, l'accumulation d'émotions négatives peut conduire l'animal à percevoir de manière pessimiste son environnement et ainsi à auto-entretenir un état affectif négatif. La confirmation de biais systématiques dans la manière dont l'animal évalue son environnement permet donc d'envisager d'utiliser ces biais cognitifs comme autant d'indicateurs comportementaux non invasifs et sensibles d'un état d'inconfort. D'autres études sont néanmoins nécessaires pour intégrer l'approche des biais cognitifs à d'autres mesures d'état affectif. Par exemple, la mise en place de nouvelles méthodes de méta-analyses, associant à la fois les données de génomique, de comportement, de tempérament, des marqueurs biologiques de stress nouveaux et plus classiques, devrait être efficace pour caractériser ces différents états affectifs. La réduction de l'anhédonie chez les animaux stressés après induction répétée d'émotions positives montre que des stratégies cognitivo-comportementales sont envisageables pour corriger un stress, voire offrir des conditions d'élevage qui assurent véritablement une qualité de vie aux animaux. Bien qu'analytiques, ces travaux permettent donc de contribuer à la conception de pratiques d'élevage innovantes respectueuses du bien-être animal.



---

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES  
CITÉES DANS L'INTRODUCTION ET LA DISCUSSION

---



- Adams, D., Oliver, C., 2011. The expression and assessment of emotions and internal states in individuals with severe or profound intellectual disabilities. *Clinical Psychology Review* 31, 293-306.
- Adams, D.C., Anthony, C.D., 1996. Using randomization techniques to analyse behavioural data. *Animal Behaviour* 51, 733-738.
- Angie, A.D., Connelly, S., Waples, E.P., Kligyte, V., 2011. The influence of discrete emotions on judgement and decision-making: A meta-analytic review. *Cognition & Emotion* 25, 1393-1422.
- Anisman, H., Matheson, K., 2005. Stress, depression, and anhedonia: Caveats concerning animal models. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 29, 525-546.
- Arnold, M.B., 1945. Physiological differentiation of emotional states. *Psychological Review* 52, 35-48.
- Arnould, C., Malosse, C., Signoret, J.P., Descoins, C., 1998. Which chemical constituents from dog feces are involved in its food repellent effect in sheep? *Journal of Chemical Ecology* 24, 559-576.
- Atanasova, B., El-Hage, W., Chabanet, C., Gaillard, P., Belzung, C., Camus, V., 2010. Olfactory anhedonia and negative olfactory alliesthesia in depressed patients. *Psychiatry Research* 176, 190-196.
- Aubert, A., 2001. Emotionality, cognition, and social status in house mice. *Advances in Ethology*, 36:117.
- Austin, M.P., Mitchell, P., Goodwin, G.M., 2001. Cognitive deficits in depression - Possible implications for functional neuropathology. *British Journal of Psychiatry* 178, 200-206.
- Baldock, N.M., Sibly, R.M., 1990. Effects of handling and transportation on the heart rate and behaviour of sheep. *Applied Animal Behaviour Science* 28, 15-39.
- Bateson, M., Desire, S., Gartside, S.E., Wright, G.A., 2011. Agitated Honeybees Exhibit Pessimistic Cognitive Biases. *Current Biology* 21, 1070-1073.
- Bateson, M., Matheson, S.M., 2007. Performance on a categorisation task suggests that removal of environmental enrichment induces 'pessimism' in captive European starlings (*Sturnus vulgaris*). *Animal Welfare* 16, 33-36.
- Bellingrath, S., Rohleder, N., Kudielka, B.M., 2010. Healthy working school teachers with high effort-reward-imbalance and overcommitment show increased pro-inflammatory immune activity and a dampened innate immune defence. *Brain, Behavior, and Immunity* 24, 1332-1339.
- Belzung, C., Griebel, G., 2001. Measuring normal and pathological anxiety-like behaviour in mice: a review. *Behavioural Brain Research* 125, 141-149.
- Blanchard, R.J., Hebert, M., Sakai, R.R., McKittrick, C., Henrie, A., Yudko, E., McEwen, B.S., Blanchard, D.C., 1998. Chronic social stress: Changes in behavioral and physiological indices of emotion. *Aggressive Behavior* 24, 307-321.
- Blanchard, R.J., McKittrick, C.R., Blanchard, D.C., 2001. Animal models of social stress: effects on behavior and brain neurochemical systems. *Physiology & Behavior* 73, 261-271.
- Boissy, A., 1998. Fear and fearfulness in determining behavior. Grandin, T., San Diego.
- Boissy, A., 2005. Emotions and cognition: an original approach to study the emotions in animal
- Boissy A., Arnould C., Chaillou E., Désiré L., Duvaux-Ponter C., Greiveldinger L., Leterrier C., Richard S., Roussel S., Saint-Dizier H., Meunier-Salaün M.C., Valance D., Veissier I.,

- 2007a. Emotions and cognition: A new approach to animal welfare. *Animal Welfare*, 16, 37-43..
- Boissy, A., Aubert, A., Desire, L., Greiveldinger, L., Delval, E., Veissier, I., 2011. Cognitive sciences to relate ear postures to emotions in sheep. *Animal Welfare* 20, 47-56.
- Boissy, A., Bouissou, M.F., 1994. Effects of androgen treatment on behavioral and physiological-responses of heifers to fear-eliciting situation *Hormones and Behavior* 28, 66-83.
- Boissy, A., Bouix, J., Orgeur, P., Poindron, P., Bibe, B., Le Neindre, P., 2005. Genetic analysis of emotional reactivity in sheep: effects of the genotypes of the lambs and of their dams. *Genetics Selection Evolution* 37, 381-401.
- Boissy, A., Manteuffel, G., Jensen, M.B., Moe, R.O., Spruijt, B., Keeling, L.J., Winckler, C., Forkman, B., Dimitrov, I., Langbein, J., Bakken, M., Veissier, I., Aubert, A., 2007b. Assessment of positive emotions in animals to improve their welfare. *Physiology & Behavior* 92, 375-397.
- Boissy, A., Veissier, I., Roussel, S., 2001. Behavioural reactivity affected by chronic stress: An experimental approach in calves submitted to environmental instability. *Animal Welfare* 10, S175-S185.
- Bollini, A.M., Walker, E.F., Hamann, S., Kestler, L., 2004. The influence of perceived control and locus of control on the cortisol and subjective responses to stress. *Biological psychology* 67, 245-260.
- Botreau, R., Veissier, I., Pery, P., 2009. Overall assessment of animal welfare: strategy adopted in Welfare Quality (R). *Animal Welfare* 18, 363-370.
- Bourguet, C., Deiss, V., Boissy, A., Andanson, S., Terlouw, E.M.C., 2011. Effects of feed deprivation on behavioral reactivity and physiological status in Holstein cattle. *Journal of Animal Science* 89, 3272-3285.
- Braastad, B.O., 1998. Effects of prenatal stress on behaviour of offspring of laboratory and farmed mammals. *Applied Animal Behaviour Science* 61, 159-180.
- Brilot, B.O., Asher, L., Bateson, M., 2010. Stereotyping starlings are more 'pessimistic'. *Animal Cognition* 13, 721-731.
- Broom, D.M., 1987. Applications of neurobiological studies to farm animal welfare, In: Wiepkema, P.R. (Ed.), *Biology of Stress in Farm Animals: an Integrative Approach*, Kluwer Academic Publishers, pp. 101-110.
- Brummett, B.H., Boyle, S.H., Ortel, T.L., Becker, R.C., Siegler, I.C., Williams, R.B., 2010. Associations of Depressive Symptoms, Trait Hostility, and Gender With C-Reactive Protein and Interleukin-6 Response After Emotion Recall. *Psychosomatic Medicine* 72, 333-339.
- Brydges, N.M., Leach, M., Nicol, K., Wright, R., Bateson, M., 2010. Environmental enrichment induces optimistic cognitive bias in rats. *Anim. Behav.* In Press, Corrected Proof.
- Burman, O.H.P., Parker, R., Paul, E.S., Mendl, M., 2008. A spatial judgement task to determine background emotional state in laboratory rats, *Rattus norvegicus*. *Animal Behaviour* 76, 801-809.
- Burman, O.H.P., Parker, R.M.A., Paul, E.S., Mendl, M.T., 2009. Anxiety-induced cognitive bias in non-human animals. *Physiology & Behavior* 98, 345-350.
- Calandreau, L., Bertin, A., Boissy, A., Arnould, C., Constantin, P., Desmedt, A., Guémené, D., Nowak, R., Leterrier, C., 2011a. Effect of one week of stress on emotional reactivity and learning and memory performances in Japanese quail. *Behavioural Brain Research* 217, 104-110.
- Calandreau, L., Favreau-Peigne, A., Bertin, A., Constantin, P., Arnould, C., Laurence, A., Lumineau, S., Houdelier, C., Richard-Yris, M.A., Boissy, A., Leterrier, C., 2011b. Higher

- inherent fearfulness potentiates the effects of chronic stress in the Japanese quail. *Behavioural Brain Research* 225, 505-510.
- Cannon, W.B., 1914. The emergency function of the adrenal medulla in pain and the major emotions. *American journal of Physiology* 33, 356-372.
- Carlstead, K., 1986. Predictability of feeding: its effect on agonistic behaviour and growth in grower pigs. *Applied Animal Behaviour Science* 16, 25-38.
- Carnevali, L., Mastorci, F., Graiani, G., Razzoli, M., Trombini, M., Pico-Alfonso, M.A., Arban, R., Grippo, A.J., Quaini, F., Sgoifo, A., 2012. Social defeat and isolation induce clear signs of a depression-like state, but modest cardiac alterations in wild-type rats. *Physiology & Behavior* 106, 142-150.
- Cesarini, D., Dawes, C.T., Fowler, J.H., Johannesson, M., Lichtenstein, P., Wallace, B., 2008. Heritability of cooperative behavior in the trust game. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* 105, 3721-3726.
- Clore, G.L., Huntsinger, J.R., 2007. How emotions inform judgment and regulate thought. *Trends in Cognitive Sciences* 11, 393-399.
- Clore, G.L., Palmer, J., 2009. Affective guidance of intelligent agents: How emotion controls cognition. *Cognitive Systems Research* 10, 21-30.
- Cole, S.W., Hawkley, L.C., Arevalo, J.M.G., Cacioppo, J.T., 2011. Transcript origin analysis identifies antigen-presenting cells as primary targets of socially regulated gene expression in leukocytes. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* 108, 3080-3085.
- Coles, M.E., Heimberg, R.G., 2002. Memory biases in the anxiety disorders: Current status. *Clinical Psychology Review* 22, 587-627.
- Commission, E. (Ed.), 2007. Eurobarometer: Attitudes of EU citizens towards Animal Welfare, Brussels.
- Coulon, M., Deputte, B.L., Heyman, Y., Delatouche, L., Richard, C., 2007. Visual discrimination by heifers (*Bos taurus*) of their own species. *Journal of Comparative Psychology* 121, 198-204.
- Coulon, M., Hild, S., Schroeer, A., Janczak, A.M., Zanella, A.J., 2011. Gentle vs. aversive handling of pregnant ewes: II. Physiology and behavior of the lambs. *Physiology & Behavior* 103, 575-584.
- Crespi, L.P., 1981. Citation classic - quantitative variation of incentive and performance in the white rat. *Current Contents/Social & Behavioral Sciences*, 18-18.
- Cruess, D.G., Antoni, M.H., Kumar, M., Ironson, G., McCabe, P., Fernandez, J.B., Fletcher, M., Schneider, N., 1999. Cognitive-behavioral stress management buffers decreases in dehydroepiandrosterone sulfate (DHEA-S) and increases in the cortisol/DHEA-S ratio and reduces mood disturbance and perceived stress among HIV-seropositive men. *Psychoneuroendocrinology* 24, 537-549.
- Cyr, N.E., Romero, L.M., 2007. Chronic stress in free-living European starlings reduces corticosterone concentrations and reproductive success. *General and Comparative Endocrinology* 151, 82-89.
- Dai, Q., Feng, Z., 2011. Deficient interference inhibition for negative stimuli in depression: An event-related potential study. *Clinical Neurophysiology* 122, 52-61.
- Dantzer, R., 1989. *L'illusion psychosomatique*. Editions Odile Jacob, Paris, France.
- Dantzer, R., 1994. *Les émotions*. Presses Universitaires de France, Paris.
- Dantzer, R., 2002a. Can farm animal welfare be understood without taking into account the issues of emotion and cognition? *Journal of Animal Science* 80, E1-E9.
- Dantzer, R., 2002b. Is it important to know about emotions in order to study emotions? *Behavioural Processes* 60, v-vii.
- Dantzer, R., Mormede, P., 1978. *Le stress en élevage intensif*. Masson, Paris, France.

- Dantzer, R., Mormede, P., 1983. Stress in farm animals - A need for reevaluation. *Journal of Animal Science* 57, 6-18.
- Dantzer, R., Mormede, P., Bluthe, R.M., Soissons, J., 1983. The effect of different housing conditions on behavioural and adrenocortical reactions in veal calves. *Reproduction Nutrition Development* 23, 501-508.
- Darnall, B.D., Aickin, M., Zwickey, H., 2010. Pilot Study of Inflammatory Responses Following a Negative Imaginal Focus in Persons With Chronic Pain: Analysis by Sex/Gender. *Gender Medicine* 7, 247-260.
- Dawkins, M.S., 1983. *La Souffrance Animale ou l'étude objective du bien-être animal*. Editions du Point Vétérinaire Maisons-Alfort.
- Dawkins, M.S., 1990. From an animal's point of view: Motivation, fitness, and animal welfare. *Behavioral and Brain Sciences* 13, 1-&.
- Dawkins, M.S., 2006. A user's guide to animal welfare science. *Trends in Ecology & Evolution* 21, 77-82.
- de Jong, I.C., Prelle, I.T., van de Burgwal, J.A., Lambooi, E., Korte, S.M., Blokhuis, H.J., Koolhaas, J.M., 2000. Effects of environmental enrichment on behavioral responses to novelty, learning, and memory, and the circadian rhythm in cortisol in growing pigs. *Physiology & Behavior* 68, 571-578.
- Deiss, V., Temple, D., Ligout, S., Racine, C., Bouix, J., Terlouw, C., Boissy, A., 2009. Can emotional reactivity predict stress responses at slaughter in sheep? *Applied Animal Behaviour Science* 119, 193-202.
- Denis, M., 1994. *Image et cognition*. Presses universitaires de France, Paris, France.
- Désiré, L., 2004. *Etude des processus cognitifs impliqués dans la différenciation des émotions chez l'agneau (*Ovis aries*)*, Ecole doctorale des sciences de la vie et de la santé, Thèse de l'Université Blaise Pascal de Clermont-ferrand, Clermont-Ferrand.
- Désiré, L., Boissy, A., Veissier, I., 2002. Emotions in farm animals: a new approach to animal welfare in applied ethology. *Behavioural Processes* 60, 165-180.
- Désiré, L., Veissier, I., Despres, G., Boissy, A., 2004. On the way to assess emotions in animals: Do lambs (*Ovis aries*) evaluate an event through its suddenness, novelty, or unpredictability? *Journal of Comparative Psychology* 118, 363-374.
- Désiré, L., Veissier, I., Despres, G., Delval, E., Toporenko, G., Boissy, A., 2006. Appraisal process in sheep (*Ovis aries*): Interactive effect of suddenness and unfamiliarity on cardiac and behavioral responses. *Journal of Comparative Psychology* 120, 280-287.
- Despres, G., Boissy, A., Desire, L., Neindre, P.I., Veissier, I., 2003. Validation of the measure of sympatho-vagal effect in lambs through autonomic blockades and heart rate variability indexes. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 2, 615-619.
- Destrez, A., Deiss, V., Leterrier, C., Boivin, X., Boissy, A., Submitted. Long-term exposure to unpredictable and uncontrollable aversive events alters fearfulness in sheep.
- Dimond, S., Lazarus, J., 1974. The problem of vigilance in animal life. *Brain, behavior and evolution* 9, 60-79.
- Dobson, H., Fergani, C., Routly, J.E., Smith, R.F., 2012. Effects of stress on reproduction in ewes. *Animal Reproduction Science* 130, 135-140.
- Douglas, C., Bateson, M., Walsh, C., Bédué, A., Edwards, S.A., 2012. Environmental enrichment induces optimistic cognitive biases in pigs. *Applied Animal Behaviour Science* 139, 65-73.
- Doyle, R.E., Fisher, A.D., Hinch, G.N., Boissy, A., Lee, C., 2009. Release from restraint generates a positive judgement bias in sheep. *Applied Animal Behaviour Science* 122, 28-34.

- Doyle, R.E., Lee, C., Deiss, V., Fisher, A.D., Hinch, G.N., Boissy, A., 2011. Measuring judgement bias and emotional reactivity in sheep following long-term exposure to unpredictable and aversive events. *Physiology & Behavior* 102, 503-510.
- Doyle, R.E., Vidal, S., Hinch, G.N., Fisher, A.D., Boissy, A., Lee, C., 2010. The effect of repeated testing on judgement biases in sheep. *Behavioural Processes* 83, 349-352.
- Duffy, D.L., Serpell, J.A., 2012. Predictive validity of a method for evaluating temperament in young guide and service dogs. *Applied Animal Behaviour Science* 138, 99-109.
- Duncan, G.E., Knapp, D.J., Breese, G.R., 1996. Neuroanatomical characterization of Fos induction in rat behavioral models of anxiety. *Brain Research* 713, 79-91.
- Duncan, I.J.H., 1993. Welfare is to do with what animals feel. *Journal of Agricultural & Environmental Ethics* 6, 8-14.
- Duncan, I.J.H., 2005. Science-based assessment of animal welfare: farm animals. *Revue Scientifique Et Technique-Office International Des Epizooties* 24, 483-492.
- Dwyer, C., Bi, C., 2009. The behaviour of sheep and goats.
- Dwyer, C.M., Bornett, H.L.I., 2004. Chronic stress in sheep: assessment tools and their use in different management conditions. *Animal Welfare* 13, 293-304.
- Eizenman, M., Yu, L.H., Grupp, L., Eizenman, E., Ellenbogen, M., Gemar, M., Levitan, R.D., 2003. A naturalistic visual scanning approach to assess selective attention in major depressive disorder. *Psychiatry Research* 118, 117-128.
- Ekman, P., 1992. An argument for basic emotions *Cognition & Emotion* 6, 169-200.
- Engelhard, I.M., van den Hout, M.A., McNally, R.J., 2008. Memory consistency for traumatic events in Dutch soldiers deployed to Iraq. *Memory* 16, 3-9.
- Erhard, H.W., Mendl, M., 1999. Tonic immobility and emergence time in pigs—more evidence for behavioural strategies. *Applied Animal Behaviour Science* 61, 227-237.
- Erhard, H.W., Mendl, M., Christiansen, S.B., 1999. Individual differences in tonic immobility may reflect behavioural strategies. *Applied Animal Behaviour Science* 64, 31-46.
- Farach, F.J., Mennin, D.S., Smith, R.L., Mandelbaum, M., 2008. The Impact of Pretrauma Analogue GAD and Posttraumatic Emotional Reactivity Following Exposure to the September 11 Terrorist Attacks: A Longitudinal Study. *Behavior Therapy* 39, 262-276.
- Ferreira, G., Keller, M., Saint-Dizier, H., Perrin, G., Lévy, F., 2004. Transfer between views of conspecific faces at different ages or in different orientations by sheep. *Behavioural Processes* 67, 491-499.
- Fessler, D.M.T., Pillsworth, E.G., Flamson, T.J., 2004. Angry men and disgusted women: An evolutionary approach to the influence of emotions on risk taking. *Organizational Behavior and Human Decision Processes* 95, 107-123.
- Forkman, B., Boissy, A., Meunier-Salauen, M.C., Canali, E., Jones, R.B., 2007. A critical review of fear tests used on cattle, pigs, sheep, poultry and horses. *Physiology & Behavior* 92, 340-374.
- Fowler, J.H., Dawes, C.T., Christakis, N., 2009. Model of genetic variation in human social networks. *Behavior Genetics* 39, 651-652.
- Fraser, D., Duncan, I.J.H., 1998. 'Pleasures', 'Pains' and Animal Welfare: Toward a Natural History of Affect. *Animal Welfare* 7, 383-396.
- Fraser, D., Ritchie, J.S.D., Fraser, A.F., 1975. Term stress in a veterinary context *British Veterinary Journal* 131, 653-662.
- Frokjaer, V.G., Vinberg, M., Erritzoe, D., Svarer, C., Baare, W., Budtz-Joergensen, E., Madsen, K., Madsen, J., Kessing, L.V., Knudsen, G.M., 2009. High familial risk for mood disorder is associated with low dorsolateral prefrontal cortex serotonin transporter binding. *Neuroimage* 46, 360-366.
- Greiveldinger, L., 2007. Processus d'évaluation et réponses émotionnelles chez les ovins: prévisibilité, contrôlabilité, correspondance aux attentes et contexte social, Ecole

- doctorale des sciences de la vie et de la santé, Thèse de l'Université Blaise Pascal de Clermont-ferrand, Clermont-ferrand.
- Greiveldinger, L., Veissier, I., Boissy, A., 2007. Emotional experience in sheep: Predictability of a sudden event lowers subsequent emotional responses. *Physiology & Behavior* 92, 675-683.
- Greiveldinger, L., Veissier, I., Boissy, A., 2009. Behavioural and physiological responses of lambs to controllable vs. uncontrollable aversive events. *Psychoneuroendocrinology* 34, 805-814.
- Greiveldinger, L., Veissier, I., Boissy, A., 2011. The ability of lambs to form expectations and the emotional consequences of a discrepancy from their expectations. *Psychoneuroendocrinology* 36, 806-815.
- Hansen, S.W., 1996. Selection for behavioural traits in farm mink. *Applied Animal Behaviour Science* 49, 137-148.
- Harding, E.J., Paul, E.S., Mendl, M., 2004. Animal behavior - Cognitive bias and affective state. *Nature* 427, 312-312.
- Hausberger, M., Gautier, E., Biquand, V., Lunel, C., Jego, P., 2009. Could Work Be a Source of Behavioural Disorders? A Study in Horses. *Plos One* 4.
- Heim, C., Binder, E.B., 2012. Current research trends in early life stress and depression: Review of human studies on sensitive periods, gene–environment interactions, and epigenetics. *Experimental Neurology* 233, 102-111.
- Helton, W.S., Matthews, G., Warm, J.S., 2009. Stress state mediation between environmental variables and performance: The case of noise and vigilance. *Acta Psychologica* 130, 204-213.
- Herrnstein, R.J., 1990. Levels of stimulus control: A functional approach. *Cognition* 37, 133-166.
- Hild, S., Coulon, M., Schroeer, A., Andersen, I.L., Zanella, A.J., 2011. Gentle vs. aversive handling of pregnant ewes: I. Maternal cortisol and behavior. *Physiology & Behavior* 104, 384-391.
- Hughes, B.O., 1976. Behaviour as an index of welfare 5th European Poultry Conference, Malta 5th-11th September 1976. Volume II., 1005-1018.
- Izard, C.E., 1992. Basic emotions, relations among emotions, and emotion cognition relations *Psychological Review* 99, 561-565.
- James, W., 1890. *The Principles of Psychology* In: Green, C.D. (Ed.), *Classics in the History of Psychology*, York University, Toronto.
- Janssens, C.J.J.G., Helmond, F.A., Weigant, V.M., 1995. The effect of chronic stress on plasma cortisol concentrations in cyclic female pigs depends on the time of day. *Domestic Animal Endocrinology* 12, 167-177.
- Jensen, K.H., Hansen, S.W., Pedersen, L.J., 1996. The effect of long-term stress on the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis and the role of the stressor. *Acta Agriculturae Scandinavica Section a-Animal Science*, 40-45.
- Jensen, P., Buitenhuis, B., Kjaer, J., Zanella, A., Mormann, P., Pizzari, T., 2008. Genetics and genomics of animal behaviour and welfare—Challenges and possibilities. *Applied Animal Behaviour Science* 113, 383.
- Johnson, H.D., Vanjonack, W.J., 1976. Effects of environmental and other stressors on blood hormone patterns in lactating animals. *Journal of Dairy Science* 59, 1603-1617.
- Jones, R.B., 1996. Fear and adaptability in poultry: Insights, implications and imperatives. *Worlds Poultry Science Journal* 52, 131-174.
- Keeling, L.J., Gonyou, H.W., 2001. Social behaviour in farm animals, *Social behaviour in farm animals*.

- Kemp, A.H., Quintana, D.S., Gray, M.A., Felmingham, K.L., Brown, K., Gatt, J.M., 2010. Impact of Depression and Antidepressant Treatment on Heart Rate Variability: A Review and Meta-Analysis. *Biological Psychiatry* 67, 1067-1074.
- Kendrick, K.M., Atkins, K., Hinton, M.R., Heavens, P., Keverne, B., 1996. Are faces special for sheep? Evidence from facial and object discrimination learning tests showing effects of inversion and social familiarity. *Behavioural Processes* 38, 19-35.
- Kendrick, K.M., da Costa, A.P., Leigh, A.E., Hinton, M.R., Peirce, J.W., 2001. Sheep don't forget a face. *Nature* 414, 165-166.
- Kendrick, K.M., Da Costa, A.P.C., Broad, K.D., Ohkura, S., Guevara, R., Lévy, F., Keverne, E.B., 1997. Neural Control of Maternal Behaviour and Olfactory Recognition of Offspring. *Brain Research Bulletin* 44, 383-395.
- Keogh, E., Dillon, C., Georgiou, G., Hunt, C., 2001. Selective attentional biases for physical threat in physical anxiety sensitivity. *Journal of Anxiety Disorders* 15, 299-315.
- Knapman, A., Heinzmann, J.M., Holsboer, F., Landgraf, R., Touma, C., 2010. Modeling psychotic and cognitive symptoms of affective disorders: Disrupted latent inhibition and reversal learning deficits in highly stress reactive mice. *Neurobiology of Learning and Memory* In Press, Corrected Proof.
- Korte, S.M., 2001. Corticosteroids in relation to fear, anxiety and psychopathology. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 25, 117-142.
- Kreutzer, M., Vauclair, J., 2004. La cognition animale au carrefour de l'éthologie et de la psychologie, In: Vauclair, J., Kreutzer, M. (Eds.), *L'Éthologie Cognitive*, MSH, Paris, pp. 1-19.
- Lacreuse, A., Gore, H.E., Chang, J., Kaplan, E.R., 2012. Short-term testosterone manipulations modulate visual recognition memory and some aspects of emotional reactivity in male rhesus monkeys. *Physiology & Behavior* 106, 229-237.
- Ladewig, J., 2000. *Chronic intermittent stress: a model for the study of long-term stressors*. B. I. Publishing CABI Publishing.
- Ladewig, J., Smidt, D., 1989. Behavior, episodic secretion of cortisol, and adrenocortical reactivity in bulls subjected to tethering. *Hormones and Behavior* 23, 344-360.
- Lang, P.J., Davis, M., Ohman, A., 2000. Fear and anxiety: animal models and human cognitive psychophysiology. *Journal of Affective Disorders* 61, 137-159.
- Langbein, J., Nürnberg, G., Puppe, B., Manteuffel, G., 2006. Self-Controlled Visual Discrimination Learning of Group-Housed Dwarf Goats (*Capra hircus*): Behavioral Strategies and Effects of Relocation on Learning and Memory. *Journal of Comparative Psychology* 120, 58-66.
- Lansade, L., Bertrand, M., Boivin, X., Bouissou, M.F., 2004. Effects of handling at weaning on manageability and reactivity of foals. *Applied Animal Behaviour Science* 87, 131-149.
- Lansade, L., Bertrand, M., Bouissou, M.F., 2005. Effects of neonatal handling on subsequent manageability, reactivity and learning ability of foals. *Applied Animal Behaviour Science* 92, 143-158.
- Lansade, L., Bouissou, M.F., Boivin, X., 2007. Temperament in preweanling horses: Development of reactions to humans and novelty, and startle responses. *Developmental Psychobiology* 49, 501-513.
- Lansade, L., Pichard, G., Leconte, M., 2008a. Sensory sensitivities: Components of a horse's temperament dimension. *Applied Animal Behaviour Science* 114, 534-553.
- Lansade, L., Bouissou, M.-F., Erhard, H.W., 2008b. Fearfulness in horses: A temperament trait stable across time and situations. *Applied Animal Behaviour Science* 115, 182.
- Lanz, P., McFarland, D., 1995. On representation, goals and cognition. *International Studies in the Philosophy of Science* 9, 121-133.

- Layton, B., Krikorian, R., 2002. Memory mechanisms in posttraumatic stress disorder. *Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences* 14, 254-261.
- Lazarus, R.S., 1991. Cognition and Motivation in Emotion. *American Psychologist* 46, 352-367.
- Le Neindre, P., Guatteo, R., Guémené, D., Guichet, J.-L., Latouche, K., Leterrier, C., Levionnois, O., Mormède, P., Prunier, A., Serrie, A., Servière, J., 2009. Douleurs animales : les identifier, les comprendre, les limiter chez les animaux d'élevage. Rapport d'expertise réalisé par l'INRA à la demande du Ministère de l'Alimentation, de l'Agriculture et de la Pêche et du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.
- Le Ny, J., 1985. A quels risques peut-on inférer des représentations? Presses universitaires de France, Paris, France.
- Lee, T.M.C., Ng, E.H.H., Tang, S.W., Chan, C.C.H., 2008. Effects of sad mood on facial emotion recognition in Chinese people. *Psychiatry Research* 159, 37-43.
- Leiner, L., Fendt, M., 2011. Behavioural fear and heart rate responses of horses after exposure to novel objects: Effects of habituation. *Applied Animal Behaviour Science* 131, 104-109.
- Leonard, B.E., Song, C., 1996. Stress and the immune system in the etiology of anxiety and depression. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 54, 299-303.
- Leppänen, J.M., Milders, M., Bell, J.S., Terriere, E., Hietanen, J.K., 2004. Depression biases the recognition of emotionally neutral faces. *Psychiatry Research* 128, 123-133.
- Maccari, S., Vallee, M., Mayo, V., LeMoal, M., 1997. Prenatal stress during pregnancy and metabolic consequences in the adult rat. *Archives De Pédiatrie* 4, S138-S140.
- Macleod, C., Mathews, A., Tata, P., 1986. Attentional bias in emotional disorders. *Journal of Abnormal Psychology* 95, 15-20.
- Mankad, A., 2012. Decentralised water systems: Emotional influences on resource decision making. *Environment International*.
- Manteca, X., 1998. Neurophysiology and assessment of welfare. *Meat Science* 49, S205-S218.
- Manteuffel, G., Puppe, B., Schön, P.C., 2004. Vocalization of farm animals as a measure of welfare. *Applied Animal Behaviour Science* 88, 163-182.
- Mason, J.W., 1971. A re-evaluation of the concept of 'non-specificity' in stress theory. *Journal of Psychiatric Research* 8, 323-333.
- Matheson, S.M., Asher, L., Bateson, M., 2008. Larger, enriched cages are associated with 'optimistic' response biases in captive European starlings (*Sturnus vulgaris*). *Applied Animal Behaviour Science* 109, 374-383.
- Mathews, A., Macleod, C., 1994. Cognitive approaches to emotion and emotional disorders. *Annual Review of Psychology* 45, 25-50.
- McFarland, D., 2004. Le comportement animal : Psychobiologie, éthologie et évolution. De Boeck Paris.
- Mellor, D.J., 2012. Animal emotions, behaviour and the promotion of positive welfare states. *New Zealand Veterinary Journal* 60, 1-8.
- Mendl, M., 1999. Performing under pressure: stress and cognitive function. *Applied Animal Behaviour Science* 65, 221-244.
- Mendl, M., Burman, O., Laughlin, K., Paul, E., 2001. Animal memory and animal welfare. *Animal Welfare* 10, S141-S159.
- Mendl, M., Burman, O.H.P., Parker, R.M.A., Paul, E.S., 2009. Cognitive bias as an indicator of animal emotion and welfare: Emerging evidence and underlying mechanisms. *Applied Animal Behaviour Science* 118, 161-181.

- Mignon-Grasteau, S., Boissy, A., Bouix, J., Faure, J.M., Fisher, A.D., Hinch, G.N., Jensen, P., Le Neindre, P., Mormede, P., Prunet, P., Vandeputte, M., Beaumont, C., 2005. Genetics of adaptation and domestication in livestock. *Livestock Production Science* 93, 3-14.
- Miller, A.H., 2010. Depression and immunity: A role for T cells? *Brain Behavior and Immunity* 24, 1-8.
- Mills, A.D., Faure, J.M., 1991. Divergent Selection For Duration Of Tonic Immobility And Social Reinstatement Behavior In Japanese-Quail (*Coturnix-Coturnix-Japonica*) Chicks. *Journal Of Comparative Psychology* 105, 25-38.
- Nephew, B.C., Kahn, S.A., Michael Romero, L., 2003. Heart rate and behavior are regulated independently of corticosterone following diverse acute stressors. *General and Comparative Endocrinology* 133, 173-180.
- Norris, F.H., Friedman, M.J., Watson, P.J., Byrne, C.M., Diaz, E., Kaniasty, K., 2002. 60,000 disaster victims speak: Part I. An empirical review of the empirical literature, 1981-2001. *Psychiatry-Interpersonal And Biological Processes* 65, 207-239.
- Nunez, J.F., Ferre, P., Garcia, E., Escorihuela, R.M., Fernandezteruel, A., Tobena, A., 1995. Postnatal handling reduces emotionality ratings and accelerates 2-way active-avoidance in female rats *Physiology & Behavior* 57, 831-835.
- Nygren, T.E., Isen, A.M., Taylor, P.J., Dulin, J., 1996. The Influence of Positive Affect on the Decision Rule in Risk Situations: Focus on Outcome (and Especially Avoidance of Loss) Rather Than Probability. *Organizational Behavior And Human Decision Processes* 66, 59-72.
- O'Brien, A., Terry, D.J., Jimmieson, N.L., 2008. Negative affectivity and responses to work stressors: An experimental study. *Anxiety Stress and Coping* 21, 55-83.
- Osgood, C.E., 1952. The nature and measurement of meaning. *Psychological Bulletin* 49, 197-237.
- Ossowski, U., Malinen, S., Helton, W.S., 2011. The effects of emotional stimuli on target detection: Indirect and direct resource costs. *Consciousness and Cognition* 20, 1649-1658.
- Packard, M.G., Goodman, J., 2012. Emotional arousal and multiple memory systems in the mammalian brain. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 6.
- Pardon, M.-C., Gérardin, P., Joubert, C., Pérez-Díaz, F., Cohen-Salmon, C., 2000. Influence of parturition chronic ultramild stress on maternal pup care behavior in mice. *Biological Psychiatry* 47, 858-863.
- Paul, E.S., Harding, E.J., Mendl, M., 2005. Measuring emotional processes in animals: the utility of a cognitive approach. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 29, 469-491.
- Peace, K.A., Porter, S., 2004. A longitudinal investigation of the reliability of memories for trauma and other emotional experiences. *Applied Cognitive Psychology* 18, 1143-1159.
- Pearce, J.M., 1997. *Animal learning and cognition*. Psychology Press, UK.
- Philippot, P., Baeyens, C., Douilliez, C., Francart, B., 2004. Cognitive regulation of emotion: Application to clinical disorders, In: Philippot, P., Feldman, R.S. (Eds.), *The regulation of emotion*, Laurence Erlbaum Associates, New York.
- Rabe, E., Cabanac, M., 1974. [Origin of olfacto-gustatory allesthesia: comparative effects of vegetable oil and intragastric glucose]. *Comptes rendus hebdomadaires des seances de l'Academie des sciences. Serie D: Sciences naturelles* 278, 765-768.
- Raussi, S., Boissy, A., Andanson, S., Kaihilahti, J., Pradel, P., Veissier, I., 2006. Repeated regrouping of pair-housed heifers around puberty affects their behavioural and HPA axis reactivities. *Animal Research* 55, 131-144.
- Rechlin, T., Weis, M., Spitzer, A., Kaschka, W.P., 1994. Are affective disorders associated with alterations of heart rate variability? *Journal of Affective Disorders* 32, 271-275.

- Reefmann, N., Bütikofer Kaszàs, F., Wechsler, B., Gyga, L., 2009a. Ear and tail postures as indicators of emotional valence in sheep. *Applied Animal Behaviour Science* 118, 199-207.
- Reefmann, N., Wechsler, B., Gyga, L., 2009b. Behavioural and physiological assessment of positive and negative emotion in sheep. *Animal Behaviour* 78, 651-659.
- Richard, S., Arnould, C., Guemene, D., Leterrier, C., Mignon-Grasteau, S., Faure, J.M., 2008. Emotional reactivity in the quail: an integrated approach to animal welfare. *Productions Animales* 21, 71-77.
- Rogers, L.J., 2009. Hand and paw preferences in relation to the lateralized brain. *Philosophical Transactions Of The Royal Society B-Biological Sciences* 364, 943-954.
- Rogers, L.J., 2010. Relevance of brain and behavioural lateralization to animal welfare. *Applied Animal Behaviour Science* 127, 1-11.
- Rushen, J., 1991. Problems associated with the interpretation of physiological data in the assessment of animal welfare. *Applied Animal Behaviour Science* 28, 381-386.
- Rushen, J., Taylor, A.A., de Passille, A.M., 1999. Domestic animals' fear of humans and its effect on their welfare. *Applied Animal Behaviour Science* 65, 285-303.
- Russell, J.A., 1979. Affective space is bipolar. *Journal of Personality and Social Psychology* 37, 345-356.
- Salmeto, A.L., Hymel, K.A., Carpenter, E.C., Brilot, B.O., Bateson, M., Sufka, K.J., 2011. Cognitive bias in the chick anxiety-depression model. *Brain Research* 1373, 124-130.
- Sanchez-Andrade, G., Kendrick, K.M., 2009. The main olfactory system and social learning in mammals. *Behavioural Brain Research* 200, 323-335.
- Sander, D., Grandjean, D., Scherer, K.R., 2005. A systems approach to appraisal mechanisms in emotion. *Neural Networks* 18, 317-352.
- Sandi, C., Loscertales, M., Guaza, C., 1997. Experience-dependent facilitating effect of corticosterone on spatial memory formation in the water maze. *European Journal of Neuroscience* 9, 637-642.
- Sandi, C., Pinelo-Nava, M.T., 2007. Stress and memory: behavioral effects and neurobiological mechanisms. *Neural plasticity* 2007, 78970.
- Sandi, C., Richter-Levin, G., 2009. From high anxiety trait to depression: a neurocognitive hypothesis. *Trends in Neurosciences* 32, 312-320.
- Satterlee, D.G., Johnson, W.A., 1988. Selection Of Japanese Quail For Contrasting Blood Corticosterone Response To Immobilization. *Poultry Science* 67, 25-32.
- Scherer, K.R., 1999. On the sequential nature of appraisal processes: Indirect evidence from a recognition task. *Cognition & Emotion* 13, 763-793.
- Scherer, K.R., 2001. Appraisal considered as a process of multilevel sequential checking. *Appraisal processes in emotion: Theory, methods, research*, 92-120.
- Scherer, K.R., 2003. Vocal communication of emotion: A review of research paradigms. *Speech Communication* 40, 227-256.
- Schlossberg, H., 1954. Three dimensions of emotion. *Psychological Review* 61, 81-88.
- Schwartzkopf-Genswein, K.S., Booth-McLean, M.E., Shah, M.A., Entz, T., Bach, S.J., Mears, G.J., Schaefer, A.L., Cook, N., Church, J., McAllister, T.A., 2007. Effects of pre-haul management and transport duration on beef calf performance and welfare. *Applied Animal Behaviour Science* 108, 12-30.
- Seegerstrom, S.C., Miller, G.E., 2004. Psychological stress and the human immune system: A meta-analytic study of 30 years of inquiry. *Psychological Bulletin* 130, 601-630.
- Selye, H., 1946. The general adaptation syndrome and the diseases of adaptation *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 6, 117-230

- Shechner, T., Britton, J.C., Perez-Edgar, K., Bar-Haim, Y., Ernst, M., Fox, N.A., Leibenluft, E., Pine, D.S., 2012. Attention biases, anxiety, and development: toward or away from threats or rewards? *Depression And Anxiety* 29, 282-294.
- Shettleworth, S.J., 2001. Animal cognition and animal behaviour. *Animal Behaviour* 61, 277-286.
- Silverstone, P.H., 1991. Is Anhedonia A Good Measure Of Depression. *Acta Psychiatrica Scandinavica* 83, 249-250.
- Smith, C.A., Kirby, L.D., 2001. Toward delivering on the promise of appraisal theory, In: Scherer, K.R., Schorr, A., Johnstone, T. (Eds.), *Appraisal processes in emotion: Theory, methods, research*, Oxford University Press, New York, NY, US, pp. 121-138.
- Spinka, M., 2012. Social dimension of emotions and its implication for animal welfare. *Applied Animal Behaviour Science* 138, 170-181.
- Spruijt, B.M., van den Bos, R., Pijlman, F.T.A., 2001. A concept of welfare based on reward evaluating mechanisms in the brain: anticipatory behaviour as an indicator for the state of reward systems. *Applied Animal Behaviour Science* 72, 145-171.
- Stein, N.L., Oatley, K., 1992. Basic emotions - Theory and measurement *Cognition & Emotion* 6, 161-168.
- Tallet, C., Veissier, I., Boivin, X., 2005. Human contact and feeding as rewards for the lamb's affinity to their stockperson. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 94, 59-73.
- Terlouw, E.M.C., Boissy, A., Blinet, P., 1998. Behavioural responses of cattle to the odours of blood and urine from conspecifics and to the odour of faeces from carnivores. *Applied Animal Behaviour Science* 57, 9-21.
- Terlouw, E.M.C., Bourguet, C., Deiss, V., 2012. Stress at slaughter in cattle: role of reactivity profile and environmental factors. *Animal Welfare* 21, 43-49.
- Terlouw, E.M.C., Porcher, J., Fernandez, X., 2005. Repeated handling of pigs during rearing. II. Effect of reactivity to humans on aggression during mixing and on meat quality. *Journal of Animal Science* 83, 1664-1672.
- Valance, D., Boissy, A., Despres, G., Constantin, P., Leterrier, C., 2007. Emotional reactivity modulates autonomic responses to an acoustic challenge in quail. *Physiology & Behavior* 90, 165-171.
- van der Harst, J.E., Baars, A.M., Spruijt, B.M., 2005. Announced rewards counteract the impairment of anticipatory behaviour in socially stressed rats. *Behavioural Brain Research* 161, 183-189.
- Vauclair, J., 1992. *Cognition animale*. Dunod, Paris, France.
- Vauclair, J., 1996. *La cognition animale*. Presses universitaires de France, Paris, France.
- Vaughan, W., Greene, S.L., 1984. Pigeon visual memory capacity. *Journal of Experimental Psychology-Animal Behavior Processes* 10, 256-271.
- Veissier, I., Boissy, A., 2007. Stress and welfare: Two complementary concepts that are intrinsically related to the animal's point of view. *Physiology & Behavior* 92, 429-433.
- Veissier, I., Boissy, A., dePassille, A.M., Rushen, J., van Reenen, C.G., Roussel, S., Andnason, S., Pradel, P., 2001. Calves' responses to repeated social regrouping and relocation. *Journal of Animal Science* 79, 2580-2593.
- Veissier, I., Boissy, A., Desire, L., Greiveldinger, L., 2009. Animals' emotions: studies in sheep using appraisal theories. *Animal Welfare* 18, 347-354.
- Visser, E.K., van Reenen, C.G., van der Werf, J.T.N., Schilder, M.B.H., Knaap, J.H., Barneveld, A., Blokhuis, H.J., 2002. Heart rate and heart rate variability during a novel object test and a handling test in young horses. *Physiology & Behavior* 76, 289-296.
- von Borell, E., Langbein, J., Després, G., Hansen, S., Leterrier, C., Marchant-Forde, J., Marchant-Forde, R., Minero, M., Mohr, E., Prunier, A., Valance, D., Veissier, I., 2007.

- Heart rate variability as a measure of autonomic regulation of cardiac activity for assessing stress and welfare in farm animals -- A review. *Physiology & Behavior* 92, 293-316.
- Weinstein, A.A., Deuster, P.A., Francis, J.L., Bonsall, R.W., Tracy, R.P., Kop, W.J., 2010. Neurohormonal and inflammatory hyper-responsiveness to acute mental stress in depression. *Biological Psychology* 84, 228-234.
- Weiss, J.M., 1972. Psychological factors in stress and disease. *Scientific American* 226, 104-113.
- Welp, T., Rushen, J., Kramer, D.L., Festa-Bianchet, M., de Passille, A.M., 2004. Vigilance as a measure of fear in dairy cattle. *Applied Animal Behaviour Science* 87, 1-13.
- Willner, P., 1997. Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. *Psychopharmacology* 134, 319-329.
- Willner, P., Muscat, R., Papp, M., 1992. Chronic mild stress-induced anhedonia: a realistic animal model of depression. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 16, 525-534.
- Wright, W.F., Bower, G.H., 1992. Mood effects on subjective probability assessment. *Organizational Behavior and Human Decision Processes* 52, 276-291.
- Zager, A., Andersen, M.L., Ruiz, F.S., Antunes, I.B., Tufik, S., 2007. Effects of acute and chronic sleep loss on immune modulation of rats. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 293, R504-R509.
- Zayan, R., Vauclair, J., 1998. Categories as paradigms for comparative cognition. *Behavioural Processes* 42, 87-99.
- Zebunke, M., Langbein, J., Manteuffel, G., Puppe, B., 2011. Autonomic reactions indicating positive affect during acoustic reward learning in domestic pigs. *Animal Behaviour* 81, 481-489.

---

## LISTE DES PUBLICATIONS

---



Articles dans des périodiques à comité de lecture

❖ **Destrez A.**, Deiss V., Belzung C., Lee C., Boissy A.  
Does reduction of fearfulness tend to reduce pessimistic-like judgment in lambs?  
*Applied Animal Behaviour Science*, 139 (2012) 233-241.

❖ **Destrez A.**, Deiss V., Leterrier C., Boivin X., Boissy A.  
Long-term exposure to unpredictable and uncontrollable aversive events alters fearfulness in sheep.  
*Animal (accepté, 2012)*

❖ **Destrez A.**, Deiss V., Levy F., Calandreau L., Lee C., Chaillou E., Boissy A.  
Chronic stress induces a pessimistic-like judgment and learning deficits in sheep.  
*Animal Cognition (en révision)*

❖ **Destrez A.**, Coulon M., Deiss V., Delval E., Boissy A., Boivin X.  
Long-term emotional experiences with various handlers modulate sheep discrimination/generalization of individual humans.  
*Journal of Animal Science (en révision)*

❖ **Destrez A.**, Deiss V., Leterrier C., Calandreau L., Boissy A.  
Repeated exposure to positive events enhances optimistic-like judgment and fearfulness in chronically stressed sheep.  
*(soumission prévue mi septembre 2012)*

❖ **Destrez A.**, Deiss V., Andanson S., Guilloteau L., Boissy A.  
Effects of long-term exposure to unpredictable and uncontrollable aversive events on sheep health.  
*(en prévision)*

### Animations scientifiques

❖ **Destrez A., Deiss V., Boissy A.**

Emotions, cognition et bien-être : accumulation d'émotions négatives et développement d'états de stress chez les ovins. Bilan 2010.

Conseil Scientifique de l'Unité de Recherche sur les Herbivores. INRA centre de Clermont-Ferrand/Theix, France. Mars 2010.

❖ **Destrez A., Deiss V., Boissy A.**

Emotions, cognition et bien-être : accumulation d'émotions négatives et développement d'états de stress chez les ovins. Bilan 2011.

Conseil Scientifique de l'Unité de Recherche sur les Herbivores. INRA centre de Clermont-Ferrand/Theix, France. Juin 2011.

❖ **Destrez A., Deiss V., Boissy A.**

Emotions, cognition et bien-être: accumulation d'émotions négatives et développement d'états de stress chez les ovins. Bilan 2012.

Conseil Scientifique de l'Unité Mixte de Recherche sur les Herbivores. INRA centre de Clermont-Ferrand/Theix, France. Juin 2012.

### Communications à des manifestations nationales et internationales

❖ **Destrez A., Deiss V., Leterrier C., Boissy A.**

Un traitement de stress chronique sur ovins entraîne une réactivité émotionnelle exacerbée et une perception négative de l'environnement.

*Poster*

Journées de l'école doctorale. Clermont-Ferrand, France. Avril 2011.

❖ **Destrez A., Deiss V., Leterrier C., Boissy A.**

Une expérience stressante prolongée accroît la réactivité émotionnelle et la perception négative chez les ovins.

*Communication orale*

Société Française pour l'Etude du Comportement Animal. Tours, France. Mai 2011.

❖ **Destrez A., Deiss V., Boissy A.**

Cognitive bias as a measure of affective state in sheep.

*Communication orale*

International Ethological Conference. Bloomington, Etats-Unis. Juillet 2011.

❖ **Destrez A., Deiss V., Leterrier C., Boivin X., Boissy A.**

Emotional state and long-term exposure to unpredictable and aversive events of sheep.

*Communication orale*

International Society for Applied Ethology. Indianapolis, Etats-Unis. Août 2011.

❖ **Destrez A., Deiss V., Leterrier C., Calandreau L., Lévy F., Boissy A.**

Est-ce qu'une expérience d'enrichissement peut atténuer le pessimisme et les réactions de peur d'agnelles stressées ?

*Communication orale*

Société Française pour l'Etude du Comportement Animal. Saint-Etienne, France. Mai 2012

- ❖ Cornilleau F., Lévy F., Chaillou E., Leterrier C., Nowak R., **Destrez A.**, Deiss V., Boissy A.

Un stress chronique subi avant la puberté stimule la proceptivité et la réceptivité sexuelle des brebis

*Poster*

Société Française pour l'Etude du Comportement Animal. Saint-Etienne, France. Mai 2012

- ❖ **Destrez A.**, Deiss V., Leterrier C., Calandreau L., Lévy F., Boissy A.

Does repeated exposure to positive events alleviate pessimistic-like judgment in chronic-stressed sheep?

*Poster*

International Society for Applied Ethology. Vienne, Autriche. Aout 2012.

- ❖ Boissy, A., **Destrez, A.**, Deiss, V., Aubert, A. and Veissier, I.4

Cognitive processes involved in the development of animal stress and welfare.

*Communication orale*

EAAP, European Federation of Animal Science. Bratislava, Slovaquie. Aout 2012.



---

ANNEXE

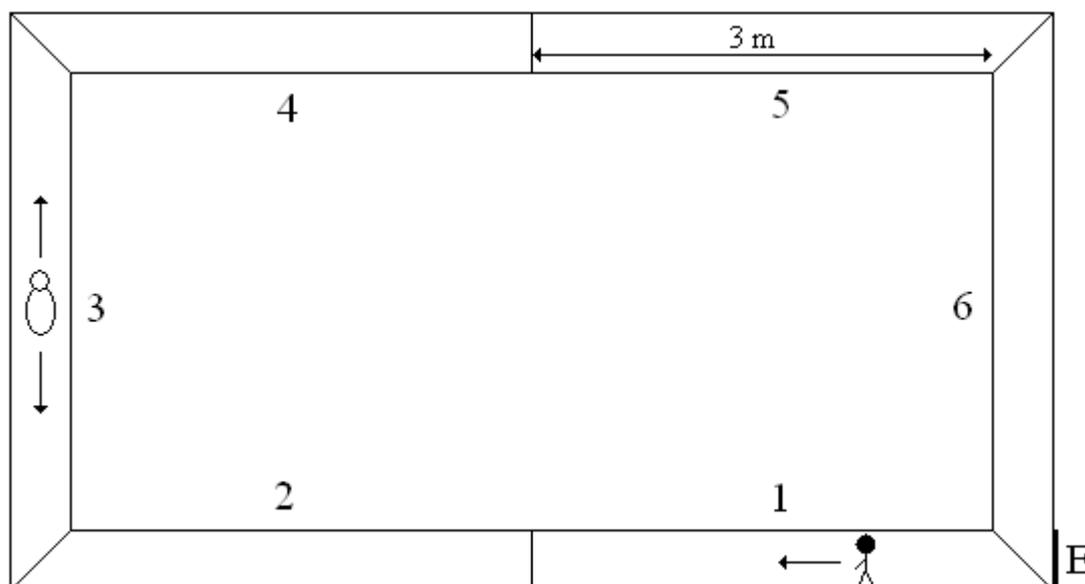
---



### Evaluation de la réactivité des agnelles à l'isolement, la nouveauté et l'homme au moment du sevrage

Afin de s'affranchir d'un effet de la réactivité précoce sur l'efficacité des traitements expérimentaux, nous avons évalué cette réactivité juste après le sevrage (entre 60 et 70 jours) et équilibré les lots expérimentaux en fonction de cette caractéristique.

La réactivité de l'agneau face à un environnement nouveau, l'isolement et l'homme a été évaluée dans un test standardisé qui se déroule en deux phases : la première phase dure 30 secondes, la seconde 1 minute. Lors de la première phase, l'agneau est introduit dans un manège divisé en 6 zones (Figure 1), on note le nombre de zones traversées et le nombre de bêlements. Lors de la seconde phase, un homme entre dans le dispositif et se déplace à une vitesse constante (1 zone toutes les 5 secondes). On mesure le temps durant lequel l'agneau est visible par l'homme, la distance moyenne séparant l'homme et l'agneau (distance de fuite).



**Figure A** : Schéma du dispositif constitué de 6 zones avec une entrée E (chaque zone mesure 3 mètres de long ; les flèches indiquent le sens dans lequel l'homme se déplace).





**Résumé      Accumulation d'émotions et modifications de la sensibilité émotionnelle et de fonctions cognitives chez les ovins**

La question du bien-être de l'animal ne se pose que si on lui reconnaît le statut d'être sensible, capable de ressentir des émotions. Les émotions dépendent de processus cognitifs qu'entreprend l'animal pour évaluer son environnement. Pour comprendre le passage des émotions à un état de bien-être, nous avons étudié si ces processus cognitifs peuvent être biaisés par les émotions, lesquelles en retour seraient modulées durablement.

Un modèle de stress chronique a été développé sur ovins : des agnelles sont exposées de manière répétée à des évènements aversifs, imprévisibles et incontrôlables. L'altération des systèmes neuroendocriniens et la potentialisation de la réactivité émotionnelle confirment que les agnelles ont développé un stress. Ensuite, l'effet de ce stress chronique sur les processus d'évaluation a été exploré : les agnelles stressées montrent une évaluation négative et des déficits d'apprentissage. Enfin, nous avons cherché à savoir si l'induction répétée d'émotions positives chez des agnelles stressées peut contrecarrer les biais d'évaluation négative induits par le stress. Elles évaluent de manière plus positive les événements ambigus que les agnelles uniquement stressées. L'accumulation d'émotions négatives peut conduire l'animal à développer une perception pessimiste de son environnement et une anhédonie, qui contribuent à auto-entretenir l'état de stress. La réduction d'anhédonie après induction répétée d'émotions positives montre que des stratégies cognitivo-comportementales sont envisageables pour corriger un stress. Bien qu'analytiques, ces travaux contribuent à la conception de pratiques d'élevage innovantes améliorant la qualité de vie des animaux.

**Mots clés**      Emotion, cognition, état affectif, biais cognitif, stress, bien-être, ovins

---

**Abstract      Accumulation of emotions and modification of emotional reactivity and cognitive functions in sheep**

The term 'animal welfare' embraces both physical and mental well-being of animals. The consideration of mental well-being of animals results from the acceptance that they are sentient beings that feel emotions. Emotions depend on cognitive abilities used by animals to evaluate its environment. To understand the progression from emotions to welfare state, we investigated whether these cognitive abilities could be biased by emotions which would be in turn modified in a lasting fashion.

A model of chronic stress was developed in sheep: female lambs were repeatedly exposed to unpredictable and uncontrollable aversive events. The alteration of neuroendocrine systems and the increase of emotional reactivity showed that lambs underwent a chronic stress experience. Then, we investigated the impact of chronic stress on cognitive abilities: chronic stressed lambs showed negative evaluation and learning deficits. Finally, we investigated if a repeated exposure to positive emotions could alleviate negative cognitive biases in chronically stressed lambs. These animals showed a more positive evaluation of ambiguous events than lambs which had only been chronically stressed. Accumulation of negative emotions could lead the animal to develop a pessimistic-like perception of environment and anhedonia thus reinforcing and maintaining the state of stress. A decrease in anhedonia after repeated exposure to positive emotions in stressed animals showed that cognitive-behavioral strategies are possible to alleviate negative effects of stress. This work will contribute to develop innovating rearing practices which improve animal welfare.

**Keywords**      Emotion, cognition, affective state, stress, cognitive bias, sheep