



Evaluation et soulagement de la douleur chez les ruminants : intérêt d'une approche multiparamétrique

Marion Faure

► To cite this version:

Marion Faure. Evaluation et soulagement de la douleur chez les ruminants : intérêt d'une approche multiparamétrique. Médecine vétérinaire et santé animale. Université Clermont Auvergne [2017-2020], 2017. Français. NNT : 2017CLFAC013 . tel-02003410

HAL Id: tel-02003410

<https://theses.hal.science/tel-02003410>

Submitted on 1 Feb 2019

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.

UNIVERSITE CLERMONT AUVERGNE

D. U. N°2802

***ECOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE,
SANTÉ, AGRONOMIE, ENVIRONNEMENT***

N° d'ordre : 715

T h è s e

Présentée à l'Université CLERMONT AUVERGNE
pour l'obtention du grade de

D O C T E U R D ' U N I V E R S I T E

(Spécialité : physiologie)

soutenue le 16 mars 2017

Marion FAURE

**Evaluation et soulagement de la douleur chez les ruminants :
Intérêt d'une approche multiparamétrique**

Président :	Claude Baudoin	Professeur d'Université, Clermont-F ^d
Rapporteurs :	Armelle Prunier	Directeur de Recherche, INRA
	Stéphane Junot	Maitre de Conférence, VetAgro Sup
Examineurs :	Alain Eschaliér	Professeur d'Université, Clermont-F ^d
	Delphine Holopherne	Professeur, Université de Bristol
	Alain Boissy	Directeur de Recherche, INRA
	Alice de Boyer des Roches	Maitre de Conférence, VetAgro Sup
	Juliette Cognié	Ingénieur de Recherche, INRA
Membre invité :	Denys Durand	Ingénieur de Recherche, INRA
		Directeur de thèse

Laboratoire d'accueil :

Unité Mixte de Recherches sur les Herbivores
(UMR 1213 INRA – VetAgro Sup)
Equipes : BIOMARQUEURS et CARAIBE

Remerciements

Je remercie Isabelle Veissier et Isabelle Casser Malek, directrice et directrice adjointe de l'Unité de Recherches sur les herbivores de l'Institut National de Recherche Agronomique du centre de Clermont-Ferrand/Theix pour m'avoir accueillie et permis d'effectuer mon travail de thèse au sein de leur unité de recherche. Je remercie Brigitte Picard, Isabelle Ortigues et Muriel Bonnet (responsables des équipes Amuvi et Biomarqueurs) ainsi qu'Alain Boissy et Xavier Boivin (responsables des équipes ACS et Caraïbe) pour m'avoir accueillie au sein de leurs équipes.

Je tiens à remercier les membres de mon jury de thèse pour avoir accepté de juger ce travail. Merci à Mr Claude Baudoin d'avoir accepté de présider le jury de cette thèse, Mr Stéphane Junot et Mme Armelle Prunier d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse, ainsi que Mme Delphine Holopherne, Mme Alice de Boyer des Roches, Mme Juliette Cognié et Mrs Alain Eschalier et Alain Boissy d'avoir accepté d'assurer les fonctions d'examineurs de ce travail.

Je remercie également les membres de mon comité de thèse pour nous avoir aidé dans la conduite de ces travaux. Merci donc à Stéphane Junot, Raphael Guattéo, Alain Boissy, Isabelle Veissier, Christine Courteix, Juliette Cognié, Sophie Lemosquet.

La rédaction de mes remerciements va au-delà de ces trois dernières années. Pour commencer je tiens à remercier tout particulièrement Alain Boissy, ancien responsable de l'équipe Adaptation et comportements sociaux (ACS), qui fut mon premier maître de stage sur la thématique douleur au cours de stage de M1. En effet ces cinq dernières années professionnelles ne se seraient pas déroulées de cette façon si tu n'avais pas répondu positivement à ma demande de stage. Je te remercie donc beaucoup de m'avoir permis de découvrir la thématique douleur sous un angle comportemental mais également pour avoir été présent moralement et intellectuellement lorsque j'en avais besoin au cours de ces cinq dernières années.

Denys Durand et Alice de Boyer des Roches, ont été les encadrants scientifiques de mon travail de thèse. Je tiens donc à les remercier pour leur encadrement scientifique. Je remercie Alice de Boyer des Roches d'avoir co-encadré mon travail de thèse. Je te remercie tout spécialement pour ton investissement dans la rédaction des articles et plus spécifiquement

dans celle de l'article sur les mammites qui n'aurait pas pu être présenté dans ce manuscrit sans ton aide.

Je tiens tout particulièrement à remercier M. Denys Durand, d'avoir dirigé ma thèse, de m'avoir encadrée au quotidien de façon constructive en me donnant sa confiance, des responsabilités... Tu as su trouver le bon équilibre entre me laisser une certaine liberté d'action tout en étant présent et rassurant. Je te remercie non seulement pour les connaissances et compétences sur la thématique de la douleur que tu m'as apportés mais également pour les conseils que tu m'as donnés en termes de rédaction, organisation et méthodologie de travail. Je te remercie également pour ta grande disponibilité à mon égard et pour avoir fait de mon travail de thèse ta priorité, pour la confiance que tu m'as donnée, pour avoir écouté et compris mes choix. A tes côtés j'ai grandi professionnellement et tu m'auras apporté quelque chose de très précieux ; la confiance en soi, je te suis donc très reconnaissante et celle-ci va bien au-delà de ces quelques lignes...

Je remercie Agnès Thomas et Anne Sophie Bage pour les encadrements techniques, leur gentillesse et leur patience. Merci pour votre aide très précieuse au moment des expérimentations, merci d'avoir pris le temps de me former sur les différentes techniques de dosages, merci aussi pour les fous rires et tous les bons moments passés à vos côtés.

Je remercie Anne De la Foye d'avoir été ma référente statistique durant ce travail de thèse mais également Claudia Terlow pour son aide et ses nombreux conseils concernant la rédaction de mon premier article.

Je remercie également Eric Delval, Hervé Chandèze, Christine Ravel et Stéphane Andanson pour leur investissement sur le terrain et au laboratoire, vous avez largement contribué au bon déroulement des travaux de cette thèse concernant le comportement. Un grand merci pour votre disponibilité, votre enthousiasme et votre bonne humeur.

Je souhaite remercier l'équipe des "techniciens animaliers" à savoir Pascal Faure, Denis Roux, André Guittard, Yoan Thomas, Bernard Mallet, Sébastien Alcouffe, Bruno Fredot, Julien Mongiat, Simon Collange pour leur investissement dans l'expérimentation sur la castration chez les ovins ainsi que François Rosa, Julien Bourdassol, Dominique Roux et Sylvie Rudel pour leur investissement dans les expérimentations réalisées aux Cèdres. Travailler à vos côtés a été un réel plaisir donc merci à tous pour votre joie de vivre et pour

tous ces fous rires. Un grand merci également à Yohan Gaudron pour le développement de l'application EvaDoul et à Marjorie Coulon pour ces nombreux conseils sur le QBA.

Merci à Maryse Teyssedre et à Annie Royet pour leur aide administrative et leur sympathie.

Ces travaux sur la douleur animale m'ont amené à travailler en collaboration avec d'autres équipes de l'UMRH mais également avec d'autres centres INRA (Rennes et Tours) et avec l'école vétérinaire de Toulouse. Ces collaborations m'ont permis d'enrichir mon travail afin de pouvoir tester et valider l'approche multiparamétrique au cours de différentes situations douloureuse, je souhaite donc remercier :

- Mathieu Silberberg et Clothilde Villot qui nous ont permis de tester certains indicateurs sur le modèle acidose
- Vincent Niderkorn et Guiseppe Coppani qui nous ont permis de tester certains indicateurs sur le modèle canules digestives chez l'ovin
- José Pires et Christine Leroux qui nous ont permis de tester l'approche multiparamétrique sur le modèle des mammites inflammatoire chez la vache laitière et permis d'intégrer le métaprogramme "Ruminflame".
- Pierre Germon, Gilles Foucras, Alexandra Lussert et Vincent Herry qui nous ont permis de tester notre approche multiparamétrique sur le modèle des mammites inflammatoires et infectieuses chez la vache laitière
- Hugues Dardente de l'équipe NIGER et Juliette Cognié, Gilles Gomot, Frédéric Elleboul, Christian Moussu, Luc Perrigouard de l'équipe de la plate-forme CIRE de l'INRA de Tours qui nous ont permis de tester certains indicateurs de l'approche multiparamétrique sur le modèle de l'ovariectomie chez la brebis.
- Sophie Lemosquet, Philippe Lamberton, Jacques Lassalas, Daniel Chevrel et Maryline qui nous ont permis de tester l'approche multiparamétrique sur le modèle des canules digestives chez la vache laitière.

Je souhaite remercier tout particulièrement les personnes des Centres de Rennes (Sophie Lemosquet, Philippe Lamberton, Jacques Lassalas, Daniel Chevrel et Maryline) et de Tours (Juliette Cognié, Gilles Gomot, Frédéric Elleboul, Christian Moussu, Luc Perrigouard), chez qui je suis allée durant quelques semaines afin d'effectuer les mesures et prélèvements au cours de leurs expérimentations, pour leur gentillesse, convivialité et bonne humeur

Mes remerciements vont également vers l'ensemble de mes collègues de l'équipe anciennement Amuvi et actuellement Biomarqueurs et de l'équipe CARAIBE qui n'ont pas été précédemment cités. Je remercie donc Marie Madeleine Mialon, Véronique Deiss, Dominique Gruffat, Carole Delavaud, Yannick Faulconnier, Christiane Barboiron, Muriel Bonnet, Nicole Dunoyer, Geneviève Gentes, Céline Chantelauze, Arnaud Delavaud, David Chadeyron, Jean Luc-Montel, Vincent Largeau et Nicole Chonion. Je vous remercie tous pour votre accueil, votre disponibilité lorsque j'en ai eu besoin et par-dessus tout, pour votre convivialité.

Préparer une thèse c'est également préparer son avenir professionnel, pour cela je souhaite remercier Bernard Sepchat, Mickaël Bernard, Sylvie Rudel et Fabienne Blanc de m'avoir accordé de leur temps et de m'avoir apporté de nombreux conseils.

Un grand merci à mes parents qui m'ont toujours soutenue quels que soient mes choix, merci à vous de m'avoir appris à toujours relativiser, à rester positive quelle que soit la situation, à gravir les montagnes étape par étape.

Merci à mes amies d'être à mes côtés depuis 29 ans pour ma Chacha, 18 ans pour Haiti, 14 ans pour Béné, 13 ans pour Manu et 9 ans pour ma Lulu, merci à vous pour ces belles et précieuses amitiés. Merci à Johanna et à Ludivine pour votre soutien du weekend, à Valérie mais aussi à Amélie et Clothilde pour tous ces bons moments et soirées passés avec vous !

Merci également à Lalhoul, Benoît Pierre, Julien, Marwa et Hélène avec qui j'ai partagé notre bureau durant cette thèse.

Enfin je remercie de tout cœur mon "ninou" pour le bonheur que tu m'apportes chaque jour et pour ton immense soutien durant ces derniers mois difficiles...

SOMMAIRE

Liste des Travaux	1
Liste des Abréviations	4
Liste des Figures	5
Liste des Tableaux	7
Listes des Annexes	8
Introduction	9
A. Histoire de la douleur et de sa prise en charge en médecine humaine et vétérinaire.	9
B. Evolution de la législation	12
C. La douleur des animaux aujourd'hui	14
Etude Bibliographique	15
Chapitre I. Les différents types de douleurs chez les mammifères	15
A. Classification en fonction de la durée d'évolution	15
1. Douleur aiguë	15
2. Douleur chronique	15
3. Exemples de douleurs aiguës et chroniques	15
B. Classification en fonction de la physiopathologie et de la localisation	16
1. Douleur par excès de nociception	16
<i>a. Douleur somatique</i>	16
<i>b. Douleur viscérale</i>	17
2. Douleur neuropathique	18
Chapitre II. Mécanismes d'apparition de la douleur chez les mammifères	20
A. Elaboration et transmission du message nociceptif de la périphérie jusqu'au niveau spinal	20
1. Les nocicepteurs (neurone pré-synaptique)	20
2. Transmission synaptique du message nociceptif : neuromédiateurs et neuromodulateurs	22
3. Neurone post-synaptique de la moelle épinière	24
B. Système de transmission du message nociceptif du niveau spinal jusqu'au niveau supra-spinal	24
1. Activités réflexes	24
2. Système d'intégration	25
C. Système de modulation du message nociceptif	26
1. Modulations activatrices	
<i>a. Modulation activatrice au niveau de la lésion tissulaire</i>	26
<i>b. Modulation activatrice au niveau spinal</i>	27
2. Modulations inhibitrices par voie endogène	28
3. Modulations inhibitrices par voie exogène	29
<i>a. Modulation au niveau de l'élaboration et de la transmission des messages nociceptifs</i>	29

<i>b. Modulation de l'activation des messages nociceptifs</i>	30
<i>c. Modulation de la transmission et de l'intégration des messages nociceptifs</i>	32
<i>d. Modulation simultanée des différentes étapes de transmission du message nociceptif</i>	34
Chapitre III. Modifications consécutives à la douleur chez les mammifères	37
A. Modifications comportementales	37
1. Présentation des indicateurs comportementaux	37
2. Illustration chez différentes espèces	38
B. Modifications physiologiques et métaboliques	41
1. Présentation des indicateurs	41
<i>a. Le système nerveux autonome</i>	41
<i>b. L'inflammation et le stress oxydant</i>	42
<i>c. L'axe hypothalamo-hypophysaire-surrénalien</i>	42
2. Modifications physiologiques et métaboliques lors de douleur chez les mammifères	43
3. Avantages – Inconvénients	45
C. Modification des performances zootechniques	46
Chapitre IV. Evaluation de la douleur chez les mammifères	49
A. Chez l'homme	49
1. Les échelles unidimensionnelles d'autoévaluation de la douleur	49
2. Les échelles multidimensionnelles	50
B. Chez l'animal	50
1. Echelles comportementales	51
2. Echelle multiparamétrique	52
3. Méthodes de validation des échelles	54
Objectifs du travail de thèse	55
Développement du travail de thèse	57
Résultats	64
Publication N°3	64
Publication N°4	85
Publication N°5	112
Publication N°6	139
Discussion générale	166
Conclusions et Perspectives	180
Annexes	183
Annexe N°1	183
Annexe N°2	184
Références bibliographiques	185

Liste des travaux

Articles primaires dans des revues internationales à comité de lecture

1. **M. Faure**, V. Paulmier, A. de Boyer des Roches, A. Boissy, E.M.C. Terlouw, R. Guatteo, J. Cognié, C. Courtiex, D. Durand. Douleurs Animales : évaluation et traitement de la douleur chez les ruminants. INRA Prod. Anim., 2015, 28 (3), 231-242
2. V. Paulmier, **M. Faure**, D. Durand, A. Boissy, J. Cognié, A. Eschalier, E.M.C. Terlouw. Douleurs animales : les mécanismes. INRA Prod. Anim., 2015, 28 (3), 217-230
3. **M. Faure**, V. Paulmier, A. Boissy, A., A. de la Foye, A de Boyer des Roches, D. Durand. A multiparametric approach to discriminate post-traumatic situations in sheep. Animal, soumis pour publication le 01 juin 2016, en révision.
4. **M. Faure**, A., A de Boyer des Roches, A. de la Foye, D. Durand. A multiparametric approach discriminates level of pain and assess effectiveness of a multimodal analgesia after castration in sheep. The Veterinary Journal. (en préparation)
5. A. de Boyer des Roches, **M. Faure**, A. Lussert, D. Durand, G. Foucras. Pain assessment in dairy cows during Escherichia coli mastitis: a pilot study. Journal of Dairy Science (en préparation)
6. **M. Faure**, P. Lamberton, A. de Boyer des Roches, S. Lemosquet, D. Durand. Evaluation de l'efficacité d'une analgésie multimodale dans le cadre d'interventions chirurgicales sur le tractus digestif pratiquées chez la vache laitière en lactation. Research in Veterinary Science (en préparation)

Autres publications

A., de Boyer des Roches, **M., Faure**, R., Guatteo, S., Junot, L., Mounier, D., Durand, A., Boissy, et I., Veissier. Douleur des animaux de rente : mécanismes et signes cliniques. Le Point Vétérinaire, Mars 2014, N° 343

A., de Boyer des Roches, R., Guatteo, S., Junot, **M., Faure** , D., Durand, A., Boissy, L., Mounier et I., Veissier. Critères comportementaux d'évaluation de la douleur chez les ruminants en élevage. Le Point Vétérinaire, Mars 2014, N° 343

Communications courtes lors de congrès.

M. Faure, V. Paulmier, A. Boissy, A. Guittard, A-S. Bage, C. Ravel, A. de Boyer des Roches, D. Durand. Multiparametric approach to assess pain in sheep following an experimental surgery. WAFL2014 - 6th International Conference on the Assessment of Animal Welfare at Farm and Group Level, September 3-5, 2014, Clermont-Ferrand, France [POSTER]

Autres communications

M. Faure Comment évaluer la douleur et son soulagement suite à des interventions chirurgicales ou des pathologies chez le ruminant par une approche multiparamétrique ? 19ème Journées de l'Ecole Doctorale SVSAE. Mars 2016.

M. Faure, E., Dubois, C., Villot, A.C., Derecienne. Production et Bien-être animal sont-ils compatibles ? Communications aux journées des doctorants de l'INRA. Février 2015, Inra de Theix.

M. Faure. Évaluation et soulagement de la douleur induite par des interventions chirurgicales ou liées à des pathologies chez le Ruminant : approche multi-paramétrique. Communications aux journées des doctorants de l'INRA. Février 2014, Inra de Theix.

Séminaires

M. Faure. Comment évaluer la douleur et son soulagement suite à des interventions chirurgicales ou des pathologies chez le ruminant par une approche multiparamétrique ? Bilan UMRH équipe AMUVI. Décembre 2015.

M. Faure. Évaluation et soulagement de la douleur induite par des interventions chirurgicales ou liées à des pathologies chez le Ruminant : approche multiparamétriques. Bilan UMRH équipe AMUVI. Décembre 2014.

M. Faure. Évaluation et soulagement de la douleur induite par des interventions chirurgicales ou liées à des pathologies chez le Ruminant : approche multiparamétriques. Réunion d'équipe ACS. Septembre 2014.

Cours

Module de formation à l'expérimentation animale : Formation concepteur de procédures expérimentales « Sciences de l'animal de laboratoire » Spécialité « Animaux de rente ». Reconnaissance des signes de douleur. (3h) juin, 2016.

Module de formation à l'expérimentation animale : Formation concepteur de procédures expérimentales « Sciences de l'animal de laboratoire » Spécialité « Animaux de rente ». Reconnaissance des signes de douleur. (3h) juin, 2015.

Ingénieurs de 2ème année à l'AGROCAMPUS OUEST de Rennes. Evaluation de la douleur chez les animaux de rente. (1h) avril, 2014.

Liste des Abréviations

ACTH	: Hormone adrénocorticotrope
AGNE	: Acides Gras Non Estérifiés
AHH	: Axe Hypothalamo-Hypophyso-surrénalien
AINS	: Anti-Inflammatoires Non Stéroïdiens
AIS	: Anti-Inflammatoire Stéroïdiens
APP+	: Protéines inflammatoires de phases aiguës positives
APP-	: Protéines des phases aiguës négatives
ATP	: Adénosine Triphosphate
CBPI	: Canine Brief Pain Inventory
COX	: cyclo-oxygénase
CRP	: Protéine C-Réactive
EDS	: Echelle Descriptive Simple
EN	: Echelle Numérique
ERO	: Espèces Réactives Oxygénées
EVA	: Echelle Visuelle Analogique
HF	: High-frequency band
HRV	: Heart Rate Variability
LF	: Low-frequency band
MDA	: Malondialdéhydes
MSI	: Matière Sèche Ingérées
NMDA	: N-Méthyl-D-Aspartate
NO	: Nitric Oxide
RMSSD	: Root Mean Square of Successive R–R intervals
SAA	: Substance Amyloïde A
SNA	: Système Nerveux Autonome
SPA	: Société protectrice des animaux

Liste des Figures

Figure 1 : Représentation schématique des voies de la douleur en fonction des mécanismes physiopathologiques.

Figure 2 : Composition du nocicepteur.

Figure 3 : Projections des fibres A δ et C au niveau de la moelle épinière.

Figure 4 : Transmission des messages nociceptifs des neurones spinaux vers les structures cérébrales.

Figure 5 : Mécanisme de l'hyperalgésie primaire et secondaire.

Figure 6 : Modulation activatrice de la transmission synaptiques des messages nociceptifs.

Figure 7 : Modulation inhibitrice de la transmission synaptique des messages nociceptifs.

Figure 8 : Propriétés excitatrices et inhibitrices des neurones spinaux à convergence.

Figure 9 : Principaux sites d'action des AINS et AIS.

Figure 10 : Mécanismes d'action de la kétamine.

Figure 11 : Mécanisme d'action des morphiniques.

Figure 12 : Protocoles analgésiques en fonction de l'intensité douloureuse.

Figure 13 : Principes et cibles d'actions des différentes familles de molécules anesthésiques et analgésiques disponibles dans la pharmacopée vétérinaire.

Figure 14 : Comportements spécifiques liés à une douleur viscérale chez le cheval.

Figure 15 : Modification du Système Nerveux Autonome en situation de douleur.

Figure 16 : L'axe hypothalamo-hypophysaire et ses conséquences.

Figure 17 : Réponses locale et systémique du processus inflammatoire.

Figure 18 : Mécanismes physiologiques des conséquences de la douleur sur la reproduction.

Figure 19 : Echelle Visuelle Analogique (EVA).

Figure 20 : Echelle Verbale Simple (EVS).

Figure 21 : Echelle Numérique Simple (ENS).

Figure 22 : Echelle comportementale chez la souris « The Mouse Grimace Scale ».

Figure 23 : Echelle comportementale d'évaluation de la douleur chez le lapin « Rabbit Grimace Scale ».

Figure 24 : Echelle comportementale d'évaluation de la douleur chez le cheval « Horse Grimace Pain Scale (HGS) ».

Figure 25 : Echelle comportementale d'évaluation de la douleur post-opératoire chez le bovin « UNESP-Botucatu unidimensional pain scale ».

Figure 26 : Echelle 4Avet multiparamétrique d'évaluation de la douleur post-opératoire chez le chat.

Figure 27 : Echelle multiparamétrique d'évaluation de la douleur induite par une boiterie chez le bovin.

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Les types de douleur induits par des interventions ou des pathologies chez les ruminants.

Tableau 2 : Principales molécules à propriétés analgésiques et anesthésiques utilisées chez les animaux d'élevage.

Tableau 3 : Posologie des molécules anesthésiques et analgésiques disponibles pour les bovins en France.

Tableau 4 : Modifications comportementales chez les rongeurs.

Tableau 5 : Modifications comportementales chez les ruminants.

Tableau 6 : Conséquences zootechniques de la douleur chez les ruminants.

Tableau 7 : Les méthodes statistiques en fonction des méthodologies de métrologies.

Tableau 8 : Pertinence des différentes voies selon l'espèce, le type de douleur et le niveau de douleur supposé d'après les articles N°3, 4, 5 et 6.

Tableau 9 : Pertinence des différents indicateurs au sein de la voie comportementale d'après les articles N°3, 4, 5 et 6.

Tableau 10 : Pertinence des différents indicateurs au sein de la voie de l'inflammation d'après les articles N°3, 4, 5 et 6.

Tableau 11 : Pertinence des différents indicateurs au sein de l'axe Hypothalamo Hypophysaire Surrénalien d'après les articles N°3, 4, 5 et 6.

Tableau 12 : Pertinence des différents indicateurs au sein du Système Nerveux autonome d'après les articles N°3, 4, 5 et 6.

Tableau 13 : Pertinence des différents indicateurs au sein du Stress oxydant d'après les articles N°3, 4, 5 et 6.

Tableau 14 : Pertinence des différents indicateurs au sein de la voie des performances zootechniques d'après les articles N°3, 4, 5 et 6.

Liste des Annexes

Annexe N°1 :

Paulmier, V., **Faure**, M., Durand, D., Boissy, A., Cognie, J., Eschalier, A., Terlouw, C., 2015. Douleurs animales. 1. Les mécanismes. INRA Productions Animales 28 (3), 217-230.

Annexe N°2 :

Faure M., Paulmier V., De Boyer Des Roches A., Boissy A., Terlouw C., Guatteo R., Cognie J., Courteix C., Durand D., 2015. Douleurs animales. 2. Evaluation et traitement de la douleur chez les ruminants. INRA Productions Animales 28 (3), 231-242.

Etude Bibliographique

Introduction :

A. Histoire de la douleur et de sa prise en charge en médecine humaine et vétérinaire.

La douleur n'a pas eu la même signification à toutes les époques ni dans toutes les civilisations, pouvant être considérée comme épreuve nécessaire, une fatalité ou plus récemment comme une expérience insupportable face à laquelle il faut lutter avec tous les moyens disponibles (Lazorthes).

Durant l'antiquité Greco-Romaine, les hommes, incapables d'expliquer les mécanismes physiologiques des différentes fonctions humaines, cherchent des explications de ces mécanismes dans des interventions divines ou mythologiques. Par exemple, pour Galien (129-216), la douleur, aux côtés des autres symptômes, est chargée d'indiquer l'organe qui est malade, il ne lui accorde donc qu'une finalité utile (Lazorthes). En revanche, des tentatives pour soulager la douleur sont déjà présentes à cette époque. Par exemple, les Romains utilisaient des moyens physiques comme le chaud, le froid, les eaux et boues des sources thermales afin de soulager les douleurs d'origine musculaire ou articulaire.

A la renaissance, la douleur est considérée comme une conséquence d'un déséquilibre de la qualité des 4 humeurs (sang, bile jaune, bile noire et phlegme) constituant le corps humain (Lazorthes). Cette théorie ne sera d'ailleurs pas remise en question durant la Renaissance par Vesale (1514-1567) qui, malgré les très grandes avancées qu'il fera faire aux connaissances de l'anatomie humaine, notamment du système nerveux, continuera à penser que le rôle du cerveau est de sécréter le phlegme (correspond à une humeur muqueuse que l'on rejette en crachant). L'animal est considéré à cette époque comme sans âme, et ne peut pas ressentir de douleurs.

Du XVIIIe siècle au XIXe siècle, on assiste à une remise en question de l'approche de la douleur par les médecins et les philosophes. Elle est alors perçue comme indépendante du péché originel et de son châtement divin quelles que soient les explications nouvelles apportées sur son mécanisme de perception (Lazorthes). Les connaissances dans le domaine de l'anatomie et de la neurophysiologie progressent considérablement. Les principes de la biologie mécaniste s'effondrent et certains philosophes accordent aux animaux non seulement la sensation mais encore des facultés de jugement, un véritable langage, voire la capacité de se

perfectionner. Pour Rousseau (1712-1778) l'argument est la capacité de souffrir commune aux hommes et aux animaux, sur laquelle il se base pour attribuer des droits aux animaux. De plus, l'anatomie comparée et les travaux de Darwin (notamment (« On the Origin of Species » (1859)) remettent totalement en question la différence de nature entre l'homme et l'animal jusqu'ici avancée pour justifier l'exploitation des animaux par l'homme. Néanmoins, d'autres courants philosophique s'opposent à ceux de Rousseau comme celui d'Emmanuel Kant (1724-1804) qui à l'inverse, exclue les animaux de toute considération éthique car il les croit incapables d'avoir une pensée rationnelle. A cette même époque, la santé animale et la situation sanitaire des cheptels sont fortement impactés à cause d'une augmentation d'épisodes successifs d'épizooties et de maladies du bétail envahissant l'Europe et induisant des pertes économiques préoccupantes pour l'opinion et les pouvoirs publics. Par exemple entre 1713 et 1796, il aurait péri environ 10 millions de bovins en France et en Belgique (Robin). Ainsi pour lutter contre ce fléau, le premier établissement d'enseignement vétérinaire vit le jour à Lyon et servit de modèle pour la création d'institutions analogues dans presque toute l'Europe. Claude Bourgelat (1712-1779) est à l'origine de cette création et il établit ainsi le programme d'enseignement vétérinaire. Ces écoles furent à l'origine de l'art vétérinaire moderne et ont également permis aux médecins et aux chirurgiens désireux de s'instruire et de faire progresser la médecine humaine (Robin ; Barroux, 2011). L'anatomie et la physiologie vont considérablement progresser, notamment grâce à l'essor de la microscopie optique qui va permettre de nouvelles observations. Ainsi, François Magendie (1783-1855) et Charles Bell (1774-1842) démontreront le rôle des racines postérieures, tandis que Paccini (1812-1883) et Messner (1829 - 1905), identifieront les principaux récepteurs cutanés de la douleur de même que Von Frey précisera le rôle des terminaisons libres dans la douleur (1896). Concernant la prise en charge de la douleur ce n'est qu'à partir de 1847 que l'anesthésie générale s'impose avec la mise au point de la strychnine.

Dans ce contexte, une sensibilité nouvelle vis-à-vis de l'animal parmi les couches urbaines de la population émerge en Angleterre puis en France au début du XVIIIème siècle : la chasse, les combats de chiens et les mauvais traitements infligés aux bêtes de somme sont peu à peu dénoncés (Larrère et Larrère., 2000). En France, ces préoccupations conduisent à la création de la Société protectrice des animaux (SPA) en 1845 et l'adoption en 1850 d'un premier texte de loi (loi Grammont) qui érige en contravention punissable une amende et une peine de prison les mauvais traitements infligés en public à des animaux domestiques.

La question de la douleur des animaux apparaît en médecine vétérinaire dans la seconde partie du 19^{ème} siècle, soit plus tardivement qu'en médecine humaine (Le Neindre et *al.*, 2009). La douleur est parfaitement connue et reconnue par les vétérinaires de cette époque mais elle est considérée comme variable selon les espèces (Le Neindre et *al.*, 2009). Les bœufs, symbole de stoïcisme, manifestent peu leur douleur alors que les chevaux, symbole de courage, souffrent plus mais ce sont les chiens qui apparaissent comme les plus sensibles : plus l'animal est anthropomorphisé, plus sa sensibilité à la douleur est reconnue (Le Neindre et *al.*, 2009). Le traitement de la douleur reste jusqu'au milieu du 20^{ème} siècle très marginal.

Au XXème siècle en Humaine, la douleur est définie chez l'homme, par l'International Association for the Study of Pain (IASP) comme « une sensation désagréable et une expérience émotionnelle en réponse à une atteinte tissulaire réelle ou potentielle, ou décrite en ces termes » (1979). Cette définition prend en compte les expériences émotionnelles, un concept difficilement applicable chez les animaux.

A la fin du 20^{ème} siècle, Bernard Kouchner secrétaire d'état à la santé met en place un plan de lutte contre la douleur afin de développer une prise en charge globale du patient à toutes les étapes des processus de santé. Ce programme de lutte contre la douleur s'articule autour de 4 axes principaux (i) la prise en compte de la demande du patient (ii) le développement de la lutte contre la douleur dans les structures de santé et les réseaux de soins (iii) le développement de la formation et de l'information des professionnels de santé sur l'évaluation et le traitement de la douleur (iv) l'information du public. Ce programme de lutte permet la mise en place entre autre du carnet de douleur remis au patient à leur arrivée afin d'améliorer l'évaluation et la prise en charge de la douleur mais également l'introduction dans les établissements de santé des pompes d'auto-analgésie contrôlée permettant au patient de déclencher ses injections d'antalgiques.

Chez les animaux, depuis la 2nd Guerre Mondiale, et plus particulièrement depuis ces 10 dernières années, le consommateur se préoccupe de plus en plus du bien-être des animaux d'élevages. Cette évolution des mentalités a conduit, à la demande par les ministres chargés de l'Agriculture et de la Recherche, à la réalisation d'une expertise scientifique collective (ESCO) conduite par l'INRA sur ce sujet en 2008. Cette expertise montre, entre autres, les critiques et questionnements sociétaux envers l'utilisation de l'animal, que ce soit en élevage ou à des fins scientifiques (expérimentation animale) (Dartevelle, 2014). Jusqu'à 1950, la douleur animale est décrite en tant que "phénomène physiologique" et il faut attendre la

décennie suivante pour que la question de la douleur psychologique soit intégrée (Le Neindre *et al.*, 2009). La définition de la douleur fut adaptée à l'animal en 1982: « La douleur est une expérience sensorielle aversive causée par une atteinte réelle ou potentielle qui provoque des réactions motrices et végétatives protectrices, conduit à l'apprentissage d'un comportement d'évitement et peut modifier le comportement spécifique de l'espèce, y compris le comportement social ». L'absence de douleur est l'une des cinq libertés fondamentales de l'animal. La prise en charge de la douleur des animaux reste, jusqu'au milieu du 20^{ème} siècle très marginale : les médecins vétérinaires sont peu intéressés par cette question et le coût financier de l'anesthésie et de l'analgésie rend ces pratiques souvent impossibles pour les éleveurs (Goudeau, 1932; Pineteau, 1933). Le premier ouvrage d'anesthésiologie vétérinaire en français a été publié en 1973, mais ces approches sont strictement physiologiques et n'ont pour objectif que la sécurité du vétérinaire (Guezennec, 2006). Ce n'est que depuis 1985, date de la loi américaine votée pour le bien-être des animaux de laboratoire, que la douleur commence à être prise en compte dans les enseignements et la pratique vétérinaire (Guezennec, 2006).

B. Evolution de la législation :

Il aura fallu plus d'un siècle pour que la considération de l'animal dans les textes de loi passe de « meuble » à « être sensible » et que toute souffrance " inutile " soit évitée. En 1805 le code civil inclue l'animal dans les textes de lois uniquement pour l'intérêt économique de l'animal mais le considère comme un « meuble » (*article 528 du code civil de 1804 : « sont meubles, par leur nature, les corps qui peuvent se transporter d'un lieu à un autre, soit qu'ils se mesurent par eux-mêmes comme les animaux, soient qu'ils ne puissent changer de place que par l'effet d'une force étrangère comme des choses inanimées »*). Au début du XIX siècle, le contexte historique de la loi Grammont nous rapproche des mœurs anglaises témoignant d'un grand respect pour l'animal tout ceci entraînant un mouvement européen en faveur de l'animal et conduisant à la création en France de la SPA en 1845. Grace à cette loi l'animal bénéficie d'une protection qui punit ceux qui exerceraient publiquement et abusivement de mauvais traitements envers les animaux domestiques (*extrait de la loi Grammont : « seront punis d'une amende de cinq à quinze francs, et pourront l'être d'un à cinq jours de prison, ceux qui auront exercé publiquement et abusivement des mauvais traitements envers les animaux domestiques*). Néanmoins cette loi ne protège que les animaux domestiques et uniquement dans les lieux publics. Il faut attendre le décret n°59-1051 du 7

septembre 1959 pour que les animaux domestiques mais aussi apprivoisés ou tenus en captivité soient protégés à la fois dans les lieux publics ou privés (*article R.38-12 de l'ancien code pénal : cet article punit « ceux qui auront exercé sans nécessité, publiquement ou non, de mauvais traitements envers un animal domestique ou apprivoisé ou tenu en captivité »*). Jusqu'à cette époque, l'animal sauvage n'est pas pris en compte dans les textes de loi et on ne reconnaît que l'aspect physiologique de la sensibilité animal (Dupas, 2005). En 1976, la loi du 10 juillet (loi n°76-629) prend en compte la faune ainsi que l'aspect psychologique de la sensibilité animale et reconnaît des droits aux possesseurs d'animaux et leur impose des devoirs notamment de veiller au bien-être de leurs animaux, d'empêcher toutes souffrance et abandon et d'être responsable des dommages commis par leurs animaux. Si les lois ont avancé sur la protection des animaux contre la maltraitance au fil des années, l'animal est toujours considéré comme une « chose » qui est animée, qui vit et qui meurt (Dupas, 2005).

Il faut attendre le 28 janvier 2015, pour que l'animal soit reconnu comme un « être vivant doué de sensibilité » dans le Code civil (nouvel article 515-14) et non comme un bien meuble (article 528).

Concernant les animaux utilisés à des fins d'élevage ou d'expérimentations, la directive n°98/58/CE en juillet 1998 est établie et protège les animaux élevés ou détenus sur leurs conditions de détention prenant en considération entre autre leurs besoins physiologiques et éthologiques. Suite à cette directive, plusieurs réformes seront mises en place afin d'améliorer le bien-être au cours du transport, de l'abattage et de l'expérimentation animale. La directive européenne sur la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques a été révisée et mise à jour en 2010 (Directive 2010/63/UE). Les conditions d'application de cette directive sont (i) l'application autant que possible du principe des 3R qui demande que l'utilisation d'animaux soit remplacée, réduite ou améliorée (ii) le control via un examen critique des projets d'étude sous l'angle bénéfique pour la recherche et contrainte pour les animaux et la publication de résumés non-techniques (iii) la mise en place de conditions d'hébergement adéquate (iv) l'utilisation autant que possible de méthodes alternatives. Concernant la réglementation nationale, la réglementation en vigueur en France (articles R214-87 à R214-137 du code rural) a été mise à jour par le décret 2013-118 et cinq arrêtés datés du 1er février 2013 et publiés le 7 février 2013, en application de la directive 2010/63/UE. Les conditions d'application de cette réglementation sont (i) la protection des animaux vertébrés, des formes larvaires autonomes ou fœtales évoluées (ii) la provenance des animaux d'élevage ou de

fournisseurs agréés (iii) l'utilisation d'anesthésique pour chaque intervention douloureuse (iv) l'agrément pour les établissements utilisateur et valable 6 ans (v) l'évaluation éthique et les autorisations des projets de recherches.

C. La douleur des animaux aujourd'hui.

Deux principes majeurs ont été mis en place afin de limiter la douleur chez l'animal de rente :

- le principe des 3R, applicable en expérimentation animale, vise à **R**éduire le nombre d'animaux, à **R**affiner, c'est-à-dire améliorer la méthodologie utilisée, ou à **R**emplacer le modèle animal (Russell et Burch, 1959)
- le principe des 3S applicable en élevage vise à **S**upprimer les sources de douleur lorsqu'elles sont inutiles, à **S**ubstituer les pratiques à l'origine de douleur par des pratiques moins douloureuses et, lorsqu'elles sont inévitables, **S**oulager la douleur (Guatteo et *al.*, 2012).

Dans ce cadre, la prise en charge et le traitement de la douleur ne peuvent être réalisés que si celle-ci a été au préalable évaluée de manière la plus objective et la plus fiable possible notamment en tenant compte des causes de la douleur, du ressenti de l'animal et du contexte.

Cette seconde partie aura pour objet de décrire, dans un premier temps, les différents types de douleur rapportés chez les mammifères ainsi que les mécanismes associés à ces douleurs y compris les mécanismes régulateurs (endogènes ou exogènes). Dans un deuxième temps, nous nous attacherons à rapporter les modifications engendrées par la douleur chez l'animal, en particulier les modifications comportementales, physiologiques, métaboliques et zootechniques ainsi que l'incidence de ces modifications sur les performances des animaux. Enfin, nous ferons le point sur les principales méthodes disponibles actuellement pour évaluer l'intensité douloureuse chez les mammifères en particulier chez l'animal de rente.

Une part importante des notions développées dans les chapitres suivants a donné lieu à 2 articles de synthèses (Faure et *al.*, 2015 ; Paulmier et *al.*, 2015 ; cf Annexe N°1 et 2).

Chapitre I.

Les différents types de douleurs chez les mammifères

Chapitre I. Les différents types de douleurs chez les mammifères

Au cours de leur vie les animaux peuvent présenter différents types de douleurs qui se distinguent, comme chez l'Homme, par leur **durée d'évolution** (aiguë vs chronique), par leur **physiopathologie**, (douleur par excès de nociception vs douleur neuropathique) et par leur **localisation** (tissus cutané, musculaire, viscères, système nerveux).

A. Classification en fonction de la durée d'évolution

Cette classification se fonde sur la durée d'évolution de la douleur. Ainsi, une douleur peut évoluer selon deux grandes modalités : la douleur aiguë et la douleur chronique.

1. Douleur aiguë

La douleur aiguë fait suite à un traumatisme, une chirurgie ou une maladie infectieuse aiguë, le siège de la sensation douloureuse est généralement bien identifié. Elle est de durée limitée (durée inférieure à 3 mois) et induit un état de stress physiologique à l'origine de modifications comportementales et physiologiques protectrices. Elle ne persiste pas après la résolution de sa cause et répond généralement bien au traitement analgésique conventionnel (Dartevelle, 2014).

2. Douleur chronique

La douleur chronique peut faire suite à une douleur aiguë mal gérée. Son installation est plus insidieuse, et contrairement à une douleur aiguë, plus lente. Son origine ainsi que son ancienneté n'est pas toujours facile à déterminer. Elle peut évoluer sur plusieurs mois (au-delà de 3 à 6 mois) ou plusieurs années et de façon continue ou intermittente (Dartevelle, 2014).

3- Exemples de douleurs aiguës et chroniques

En médecine vétérinaire et humaine, les exemples les plus couramment cités de douleur chroniques sont les douleurs liées au cancer, aux problèmes ostéo-articulaires et/ou musculo-tendineuses ou encore à un membre fantôme suite à une amputation (Fouquet et Orset, 2012). Par exemple chez les ruminants, la castration qui est reconnue comme une procédure douloureuse (Molony et *al.*, 1995; Robertson et *al.*, 1994) peut induire soit une douleur aiguë suite aux techniques de castration pratiquées avec la pince Burdizzo ou via la chirurgie (Molony et *al.*, 1995) soit une douleur chronique suite à la pose d'anneau élastique (Thüer et *al.*, 2007). Plus globalement, les douleurs par excès de nociception (cf paragraphe suivant)

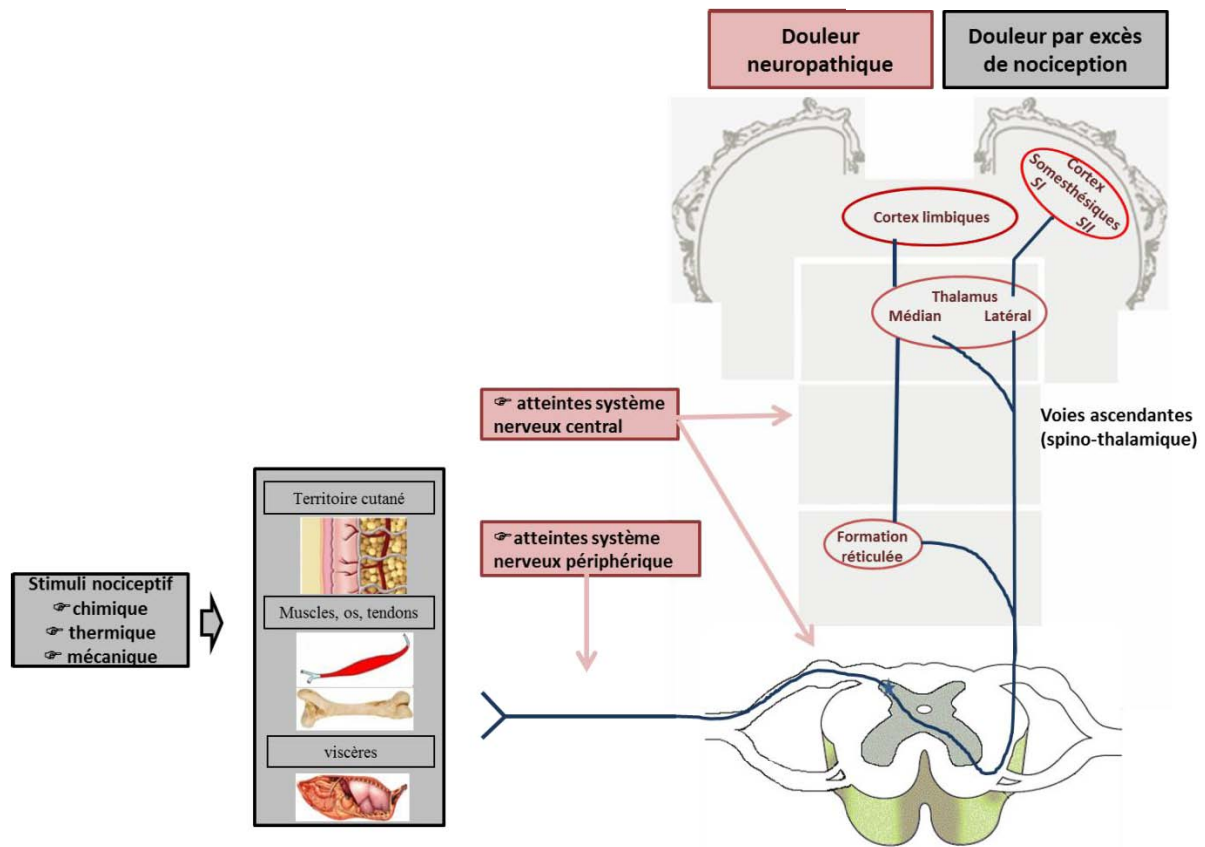


Figure 1 : Représentation schématique des voies de la douleur en fonction des mécanismes physiopathologiques (d'après Meintjes et *al* 2012 ; Le Bars et Willer 2004)

induisent généralement des douleurs aiguës comme par exemple les mammites, les coliques, une laparotomie alors que les douleurs neuropathiques induisent généralement des douleurs chroniques. Chez le porc, la caudectomie induit en plus d'une douleur aiguë probablement une douleur chronique similaire à celle décrite chez l'homme après une amputation par la présence de névromes (Simonsen et *al.*, 1991 ; Done et *al.*, 2003).

B. Classification en fonction de la physiopathologie et de la localisation

Une douleur peut être induite par un mécanisme de type nociceptif ou de type neuropathique et être localisée au niveau somatique ou au niveau viscéral.

Avant de revenir plus largement sur les mécanismes impliqués dans chacun de ces types de douleur, nous allons dans un premier temps rapporter les grands principes qui ont prévalu à cette classification.

1. Douleur par excès de nociception

La douleur par excès de nociception est consécutive à l'activation des fibres nerveuses impliquées dans la douleur (nocicepteurs périphériques) par des stimuli suffisamment intenses pour dépolariser la membrane neuronale et créer un potentiel d'action (PA). L'activation de ces nocicepteurs peut être déclenchée par des stimuli chimiques, mécaniques ou thermiques. Si les nocicepteurs appartiennent au tissu cutané, musculaire, articulaire ou osseux, on parlera de 'douleur somatique'. Si les nocicepteurs sont localisés au niveau des zones thoracique, abdominale ou pelvienne, la douleur sera qualifiée de 'douleur viscérale' (Figure 1).

a. Douleur somatique

La douleur « somatique » peut-être de type superficiel (atteinte des tissus cutanés) ou profond (atteinte des tissus musculaires, des articulations ou des os). Le message nociceptif élaboré au cours de douleurs somatiques sera transmis au système nerveux central par les fibres nerveuses A δ myélinisées et C amyéliniques (Le Bars et Willer, 2004).

En élevage, les douleurs somatiques peuvent être provoquées par des lésions tissulaires survenant au cours d'interventions chirurgicales ou de traumatismes accidentels, ou encore par des agents infectieux comme lors de pathologies induisant une réaction inflammatoire. (Tableau 1). Ainsi, des pratiques de convenance comme la caudectomie et la castration sont reconnues comme des procédures douloureuses liées à la lésion de tissus cutanés et musculaires (Molony et Kent, 1997).

Tableau 1 : les types de douleur induits par des interventions ou des pathologies chez les ruminants

	Douleur par excès de nociception		Douleur neuropathique
	Douleur Somatique	Douleur viscérale	
Interventions de convenance : écornage, caudectomie, castration	✓		
Castration / caudectomie (méthode élastique)			✓
Césarienne	✓	✓	
Mammite	✓		
Pathologies au niveau de la tête : Stomatite Gingivite, Glossite, Lésions dentaires, Fracture de la mâchoire, Conjonctivite, Uvéite	✓		
Pathologies au niveau de l'encolure : Atteintes du larynx et du pharynx, Obstruction oesophagienne	✓		
Pathologies au niveau du thorax : Pleurésie Bronchopneumonie, Péricardite		✓	
Pathologies au niveau de l'abdomen : Réticulite, Ulcère de la caillette, Hépatite aiguë Affections digestives : syndrome occlusif, invagination intestinale, intussusception, torsion de caillette, volvulus du cæcum, spasmes intestinaux, obstruction du cholédoque, péritonite diffuse aiguë Affections génitales : avortement, torsion de matrice, coliques de faux travail Affections urinaires : pyélonéphrites, cystites, urolithiase, pyélonéphrite, néphrite interstitielle, hydronéphrose		✓	
Pathologies au niveau des organes génitaux : métrite, vaginite		✓	
Rumenocentèse		✓	
Biopsie du foie		✓	
Pathologies au niveau des membres : fourbure aiguë, phlegmon interdigité, dermatite digitée	✓		
Pathologies au niveau du système nerveux : listériose, botulisme, tétanos, entérotoxémie, nécrose du cortex, toxémie de gestation, parésie puerpérale, tétanie d'herbage, intoxications végétales, organiques, coénurose, border disease, louping ill, maladie aujeszky, visna-maedi, rage et tremblante			✓

D'autres procédures, telle que la césarienne, impliquent en plus de ces douleurs somatiques, des lésions et des tensions des organes pelviens pouvant générer également des douleurs viscérales. Les infections sont également des sources de douleurs somatiques, mettant en jeu un processus inflammatoire, comme dans le cas des mammites (infection du canal du trayon de la mamelle de la vache). Les boiteries peuvent également indiquer l'existence d'une douleur liée à des atteintes ostéo-articulaires et des problèmes locomoteurs. Elles peuvent être liées au type de logement et aux conditions d'élevage chez plusieurs espèces animales comme le bovin, l'ovin, le porc et la volaille (Le Neindre et *al.*, 2009).

b. Douleur viscérale

La douleur « viscérale » est quasi-exclusivement véhiculée par les fibres C non myélinisées impliquant une conduction des messages nociceptifs plus lente que les fibres A δ (0.2 – 1m/s vs 4 – 30 m/s) (Giamberardino, 2004). Ainsi, la douleur viscérale est perçue moins rapidement que la douleur somatique (Le Bars et Willer 2004).

En élevage, les douleurs viscérales peuvent être déclenchées par des tensions, dilatations, distensions des organes creux mais également par des inflammations au niveau du tractus digestif, génital et de la sphère thoracique (Tableau 1). Chez le bovin, la dilatation induite par une accumulation gazeuse et/ou liquidienne dans un segment intestinal est également à l'origine de douleurs viscérales fortes (Caillat, 2008). D'autres situations conduisent à des distensions fortes comme les coliques ou les déplacements de caillette, incidents particulièrement fréquents chez les bovins laitiers après vêlage, les distensions de cette partie de l'estomac s'accompagnant parfois de torsions (Walkera et *al.*, 2011). Chez le cheval, la douleur viscérale peut être également déclenchée par des stimuli mécaniques (traction, distension...) comme par exemple lors des coliques qui induisent des douleurs abdominales intenses liées à des contractions intestinales. Des processus inflammatoires peuvent engendrer une douleur viscérale (i) du tractus génital comme dans le cas des métrites (inflammation de la paroi utérine causée par une infection bactérienne), fréquentes chez les bovins, (ii) de la sphère thoracique comme lors de maladies respiratoires (Heegaard et *al.*, 2000). Enfin, les césariennes souvent pratiquée chez les vaches de race allaitante ou les ovariectomies sont à l'origine de douleurs viscérales (Walkera et *al.*, 2011).

2. Douleur neuropathique

La douleur « neuropathique » est consécutive à une lésion ou à une maladie affectant le système somato-sensoriel. Sa sémiologie inclut des douleurs spontanées (continues ou paroxystiques) et évoquées par des stimulations nociceptives (hyperalgésie : stimulus douloureux provoquant une sensation amplifiée de la douleur) ou non nociceptives (allodynie : stimulus habituellement non douloureux provoquant des sensations douloureuses) (Le Bars et Willer 2004) (Figure 1).

En élevage, les principales causes de douleurs neuropathiques sont liées à des chirurgies et à des maladies neurologiques (Tableau 1). Certaines interventions comme la castration, la caudectomie, qui sont des pratiques courantes en France, induisent, en plus d'une douleur somatique, une douleur neuropathique. En effet, les techniques de castration et de caudectomie par pose d'anneau élastique peuvent induire une nécrose importante des tissus parfois associée à une formation de névrome (développement anormal des terminaisons nerveuses sectionnées) responsable d'une sensibilisation à long terme des zones amputées (Prunier et *al.*, 2002 ; Vinuela-Fernandez et *al.*, 2007 ; Sutherland et Tucker, 2011). Les maladies nerveuses peuvent avoir plusieurs étiologies. Elles peuvent être d'origine virale comme dans le cas de l'arthrite encéphalite caprine, bactériennes (cas de la listériose), toxiques (végétaux, minéraux), métaboliques (carence en vitamine B1) ou parasitaires (cas de la cœnurose). L'arthrite encéphalite, provoquée par un lentivirus fréquemment rencontrée chez les caprins, conduit en plus d'une démyélinisation des axones, une nécrose de la substance blanche de la moelle épinière, à une inflammation de la glande mammaire et des articulations pouvant évoluer en tétraplégie (Lamara et *al.*, 2013). L'herpès virus bovin 5 (BoHV-5) est un alpha herpès virus responsable de méningo-encéphalite chez les jeunes bovins. Il infecte les cellules épithéliales et provoque une infection latente dans les ganglions des nerfs sensitifs à l'origine de maladies neurologiques. Quelques cas de cette maladie ont été signalés en Europe, aux Etats-Unis et en Australie, l'infection se limitant principalement à l'Amérique du Sud, notamment au Brésil et en Argentine (Del Médico Zajac et *al.*, 2010). Chez l'homme, il est bien connu que les douleurs neuropathiques peuvent apparaître suite à une amputation d'un membre. Ces amputations induisent les sections de nerfs et favorisent la formation de névromes à l'origine de douleur neuropathique avec l'apparition d'hyperalgésie et d'allodynie (Garcia-Larrea et *al.*, 2008).

La formation de névrome correspond à la repousse de façon anarchique des axones ou des cellules gliales qui n'étant plus guidées par une gaine nerveuse, s'enchevêtrent et forment une petite masse : le névrome. Ce processus est très long suite à une amputation car la vitesse de croissance des terminaisons nerveuses est très lente. Chez le porc, la présence de névrome a également été montrée suite à la caudectomie chez les porcelets (Le Neindre et *al.*, 2009).

Chapitre II.

*Mécanismes d'apparition de la
douleur chez les mammifères*

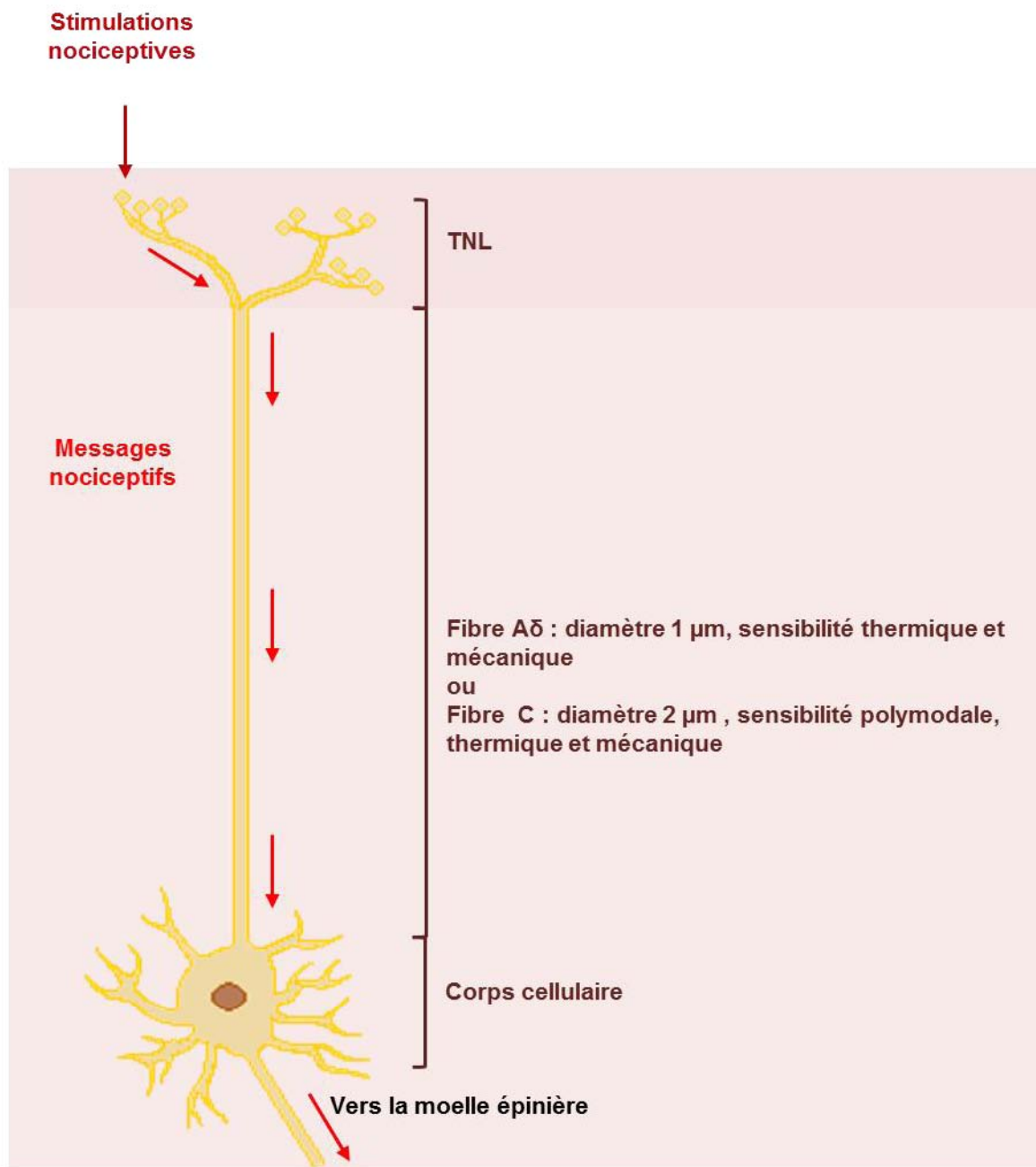


Figure 2 : Composition du nocicepteur (Paulmier et *al.*, 2015)

Les nocicepteurs sont des neurones sensoriels primaires. Ils sont constitués de terminaisons nerveuses libres (TNL), d'un corps cellulaire et d'axones peu myélinisés (Fibres Aδ) ou amyéliniques (Fibres C). La réception des stimulations nociceptives s'effectue au niveau des TNL qui sont localisées dans différents tissus (peau, muscles, viscères). Lorsque les stimulations nociceptives sont reçues par les TNL, elles sont transformées en courants électriques (messages nerveux nociceptifs) par les canaux ioniques TRP (« *Transient Receptor Potential* »), localisés sur la membrane de ces TNL. Une fois créés, les messages nociceptifs sont transmis par les axones des nocicepteurs à des neurones de la moelle épinière.

Chapitre II. Mécanismes d'apparition de la douleur chez les mammifères

La nociception, correspond à l'ensemble des mécanismes assurant la perception des stimuli « dangereux pour l'organisme » appelés également stimuli nociceptifs. C'est un système d'alarme qui protège l'organisme et qui représente la composante sensorielle de la douleur. En clinique, il existe des lésions tissulaires sans perception de douleur et à l'inverse, certaines douleurs peuvent survenir en l'absence de cause nociceptive identifiée (douleurs d'origine neuropathique ou psychologique) (Richard, 2013). Ainsi, pour qu'il y ait douleur, il faut rajouter à la nociception les composantes émotionnelle et cognitive. L'homologie des structures nerveuses impliquées dans la perception de la douleur (cortex somesthésique impliqué dans la composante sensori-discriminative et système limbique impliqué dans la composante émotionnelle) entre les mammifères indique que les mammifères non primates sont capables de ressentir une douleur. C'est pourquoi on peut avancer que les mécanismes d'apparition de la douleur décrits dans cette partie sont valables pour l'ensemble des mammifères.

A. Elaboration et transmission du message nociceptif de la périphérie jusqu'au niveau spinal

Le nocicepteur est un neurone présynaptique. Il réceptionne le stimulus nociceptif, génère un message nociceptif et le transmet jusqu'à la moelle épinière à un neurone post-synaptique.

1 Les nocicepteurs (neurone pré-synaptique)

Les nocicepteurs sont constitués (i) de terminaisons nerveuses libres (ces terminaisons libres constituent des arborisations dans les tissus cutané ou viscéral) capables de discerner une stimulation nociceptive d'une stimulation non nociceptive et d'en coder la durée, l'intensité, la nature et la localisation, (ii) d'un corps cellulaire (au niveau des ganglions rachidiens ou trigéminaux), (iii) d'axones peu ou pas myélinisés (respectivement « fibres A δ » et « fibres C ») qui font le lien entre les terminaisons nerveuses libres, le corps cellulaire du nocicepteur et les neurones de la moelle épinière (Le Bars et Willer 2004) (Figure 2). Des stimulations mécaniques, thermiques et chimiques peuvent être appliquées sur différents sites anatomiques (peau, muscles, articulations, viscères et nerfs) et générer, en fonction de la durée de stimulation, un message nociceptif au niveau des terminaisons libres des nocicepteurs par un mécanisme de transduction. La transduction correspond à la transformation d'une énergie chimique, thermique ou mécanique en énergie électrique (potentiel d'action) (Bridgestock et

Rae, 2013) et est induite grâce aux canaux TRP (Transient Receptor Potential) localisés sur les membranes des nocicepteurs. Ces canaux captent les stimulations nociceptives mécaniques, thermiques et/ou chimiques (TRPV1, TRPM8 et TRPA1 sont les plus étudiés), s'ouvrent et induisent des courants cationiques (entrée de calcium et de sodium, sortie de potassium) membranaires (Basbaum et *al.*, 2009 ; Julius, 2013) qui sont à l'origine des potentiels d'action qui constituent les messages nociceptifs.

Les nocicepteurs sont caractérisés par (i) leur seuil d'excitation (plus élevé que celui des fibres non nociceptives) et (ii) leur fréquence de décharge (qui peut s'accroître pour des stimulations intenses). Ces deux caractéristiques permettent au nocicepteur de détecter une stimulation nociceptive et d'en coder l'intensité nociceptive (Richard, 2007).

Plusieurs groupes de nocicepteurs se distinguent en fonction du diamètre de leurs fibres :

- -les **fibres nociceptives A δ** ont des axones myélinisés de petit diamètre (2 μ m) à conduction rapide (5-30 m/s) et caractérisent les **nocicepteurs spécifiques** qui répondent spécifiquement à des stimulations mécaniques (mécano-nocicepteurs), ou thermiques (thermonocicepteurs).
- -les **fibres nociceptives C** ont des axones amyélinisés, de petit diamètre (1 μ m) et ont une vitesse de conduction plus faible que les fibres A δ (0,5-2 m/s). La majorité des fibres C sont dites polymodales car elles répondent à des stimuli variés : mécaniques, thermiques et chimiques extrêmes.

Une sous-population de fibres C sont dites « silencieuses » car elles ne sont activées que par des stimuli thermique ou mécanique induit par l'inflammation d'une lésion tissulaire. Au sein de ces fibres C on distingue :

- les fibres C « peptidergiques », qui synthétisent et libèrent des neuropeptides et peptides comme la substance P et le CGRP (calcitonin gene-related peptide) au niveau périphérique (à l'origine de l'inflammation neurogène) et au niveau de la transmission spinale des messages nociceptifs. Ces fibres expriment les récepteurs spécifiques (TrK A) du facteur de croissance NGF (nerve growth factor) (Richard, 2013).

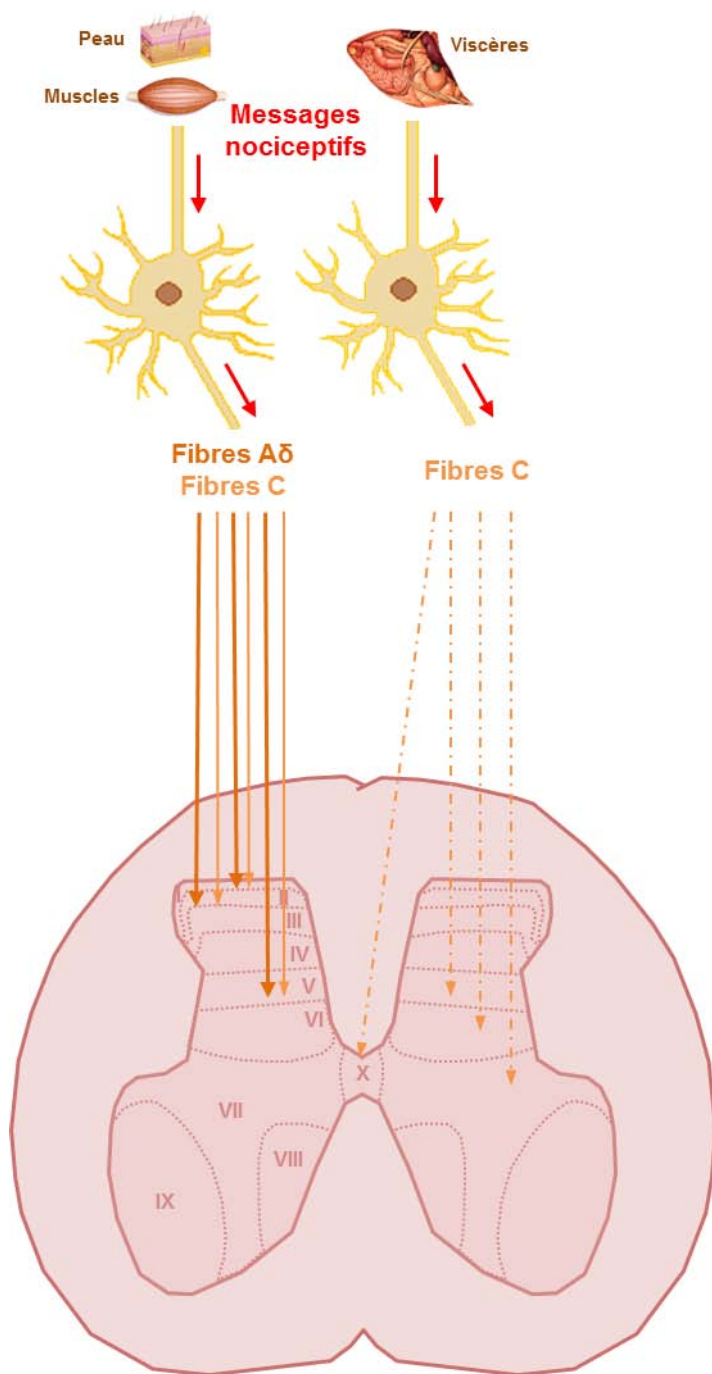


Figure 3 : Projections des fibres A δ et C au niveau de la moelle épinière (Paulmier et *al.*, 2015).

Les fibres A δ et C transmettent les messages nociceptifs aux neurones localisés dans la moelle épinière. Les messages nociceptifs provenant de la peau et des muscles sont transmis par les fibres A δ et C aux neurones spinaux localisés dans les couches I, II et V de la moelle épinière (flèches continues). Ceux qui proviennent des viscères sont transmis par les fibres C aux neurones spinaux localisés dans les couches V, VI, VII et X de la moelle épinière (flèches discontinues).

- - les fibres « non peptidergiques », qui n'expriment ni la substance P ni le CGRP, en revanche elles expriment des récepteurs (RET Tyrosine Kinase, GFR α -1) d'une autre famille de facteurs de croissance : glial derived neurotrophic factor (GDNF). Ces fibres expriment également des récepteurs purinergiques (P2X3) dont le ligand naturel est l'adénosine triphosphate (ATP) (Le Bars et Adam, 2002).

Les récepteurs des nocicepteurs mécanothermiques et polymodaux C ont un seuil de stimulation bien plus élevé que les récepteurs des fibres responsables de la sensibilité tactile et proprioceptive (fibres myélinisées de gros diamètre A α et A β). De plus, la répartition des fibres A δ et C est de 1 pour 2 dans la peau et de 1 pour 9 dans les viscères. Les fibres C étant donc très majoritaires dans les viscères, la sensation douloureuse à ce niveau est généralement diffuse (Guezennec, 2006). Les nocicepteurs se projettent dans la moelle épinière au niveau de différentes lames de Rexed au sein desquelles il y a un relai synaptique : les nocicepteurs transmettent le message nociceptif à des neurones post-synaptiques par l'intermédiaire des synapses.

2. Transmission synaptique du message nociceptif : neuromédiateurs et neuromodulateurs

La substance grise de la moelle épinière est divisée en 10 couches de Rexed. Les fibres A δ se terminent principalement dans les couches superficielles I, II et dans la lame profonde V (Bridgestock et Rae, 2013 ; Steeds, 2013). Les fibres C se terminent principalement dans les lames V, VI, VII, et X (Bridgestock et Rae, 2013; Steeds, 2013) (Figure 3). C'est au niveau de ces lames que le nocicepteur fait synapse avec le neurone post-synaptique. La transmission du message nociceptif se fait au niveau des synapses grâce à des neurotransmetteurs (rôle de transmission du message nociceptif) et neuromodulateurs (rôle de modulation de la transmission du message nociceptif). Ces neurotransmetteurs et neuromodulateurs ont soit (i) un rôle excitateur (molécules pro-nociceptives) en augmentant l'entrée de calcium dans le neurone pré-synaptique et ainsi favoriser la transmission ou la modulation du message nociceptif (ii) un rôle inhibiteur (molécules anti nociceptives) en limitant l'entrée de calcium dans le neurone pré-synaptique et ainsi inhiber la transmission ou la modulation du message nociceptif.

Parmi les neuromodulateurs et les neurotransmetteurs on distingue les acides aminés, les peptides et les neurohormones :

- **Les acides aminés :**

- Acides aminés excitateurs : le glutamate et ses 3 récepteurs, des récepteurs ionotropiques liés à un canal ionique (récepteurs NMDA-R (canal préférentiellement calcique) et des récepteurs AMPA-R (canal préférentiellement sodique) et métabotropiques liés à une protéine G couplés à la phospholipase C ou à l'adényl cyclase (mGlu-R).
- Acides aminés inhibiteurs : l'acide gamma amino-butyrique (GABA) et son récepteur GABA b qui ouvre un canal potassique (Le Bars et Willer, 2004 ; Steeds, 2013)

- **Les peptides :**

- la substance P (peptide de 11 acides aminés) particulièrement présente dans les ganglions de la racine dorsale. Elle est particulièrement présente dans les couches superficielles I et II. Elle a un rôle controversé car elle n'est ni nécessaire ni suffisante pour provoquer une douleur. Elle apparaît plus aujourd'hui comme un neuromodulateur que comme un neurotransmetteur de la transmission du message nociceptif.
- Le CGRP (Calcitonin gene-related peptide) est un peptide de 37 acides aminés. Il joue un rôle excitateur dans la transmission des messages nociceptifs au niveau spinal. Il est également présent au niveau médullaire où il potentialise les effets excitateurs de la substance P.
- Les opioïdes endogènes et leurs récepteurs mu, delta et kappa impliqués dans la modulation inhibitrice du message nociceptif (Le Bars et Willer, 2004 ; Steeds, 2013).

- **Les neurohormones :**

- La noradrénaline et la sérotonine qui ont pour récepteurs $\alpha 2$ et 5-HT participent à la modulation inhibitrice du message nociceptif

Sous l'influence des molécules pronociceptives, les potentiels d'action sont transmis des neurones pré-synaptiques aux neurones post-synaptiques permettant ainsi la transmission des messages nociceptifs. Cependant cette transmission est régulée par les molécules anti nociceptives

3. Neurones post-synaptique de la moelle épinière

Dans la moelle épinière, les nocicepteurs font synapses avec deux types de neurones post-synaptiques : (i) **les neurones non spécifiques** (encore appelés neurones à convergence) qui répondent à des stimulations non nociceptives et aux stimulations nociceptives mécaniques et thermiques. Ils reçoivent des messages véhiculés par les fibres A α , A β , A δ et C. Leur activation ne traduit pas uniquement une stimulation nociceptive. Ils sont principalement localisés dans les lames V et VI de Rexed (ii) **les neurones nociceptifs spécifiques** répondent à des messages exclusivement nociceptifs issus des fibres A δ et/ou C. Ils sont localisés essentiellement dans les lames II et III de Rexed (Steeds, 2013 ; Guirimand, 2003). Les deux types de neurones (spécifiques et non spécifiques) se projettent vers les faisceaux ascendants qui véhiculent le message nociceptif au niveau supraspinale.

B. Système de transmission du message nociceptif du niveau spinal jusqu'au niveau supra-spinal

Le message nociceptif est ensuite véhiculé : soit vers la partie antérieure de la moelle qui contient les motoneurones commandant les activités réflexes, soit vers les structures supra-spinales via des voies ascendantes.

1. Activités réflexes

Ces activités réflexes comprennent toutes les activités motrices déclenchées par des messages afférents provenant de la peau ou des tissus sous-cutanés et relayés dans la moelle. Par exemple chez le chien, un réflexe de retrait d'une patte postérieure ne peut être obtenu que par des stimulations nociceptives des coussinets plantaires de cette même patte. Ce réflexe de flexion correspond à une réaction de protection de l'organisme vis-à-vis d'un stimulus potentiellement dangereux pour son intégrité. Le mouvement réflexe résulte de la contraction d'un ensemble de muscles fléchisseurs et du relâchement de muscles extenseurs. Chaque muscle possède ainsi un « champ récepteur cutané nociceptif » organisé de telle façon qu'il se soustrait au stimulus nociceptif par le mouvement qu'il déclenche (Le Bars et Willer, 2004 ; Guirimand, 2003).

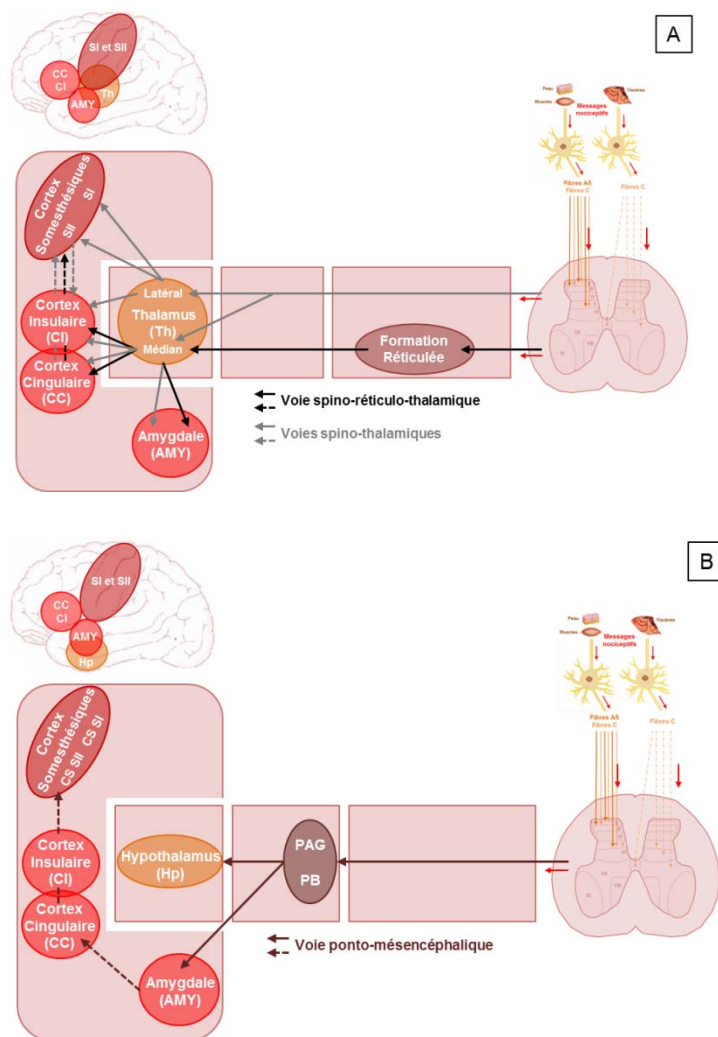


Figure 4 : Transmission des messages nociceptifs des neurones spinaux vers les structures cérébrales (Paulmier et *al.*, 2015).

En fonction des parties du cerveau par lesquelles passent les messages nociceptifs au cours de leur transmission supra-spinal, trois voies principales de transmission ont été décrites : la voie spino-thalamique, la voie spino-réticulo-thalamique et la voie ponto-mésencéphalique. Ces trois voies de transmission peuvent être suivies par les messages nociceptifs en simultanée.

A) Dans la voie spino-thalamique, les messages nociceptifs sont transmis aux thalamus médian et latéral. Ils sont ensuite transmis par le thalamus médian à l'amygdale et aux cortex limbiques : cingulaire et insulaire. Le thalamus latéral transmet les messages nociceptifs au cortex insulaire et aux cortex somesthésiques primaire (SI) et secondaire (SII). Le cortex insulaire a un rôle central dans cette voie car il transmet en partie les messages nociceptifs qu'il reçoit du thalamus médian au cortex SII et ceux qu'il reçoit du thalamus latéral au cortex cingulaire. Dans la voie spino-réticulo-thalamique, les messages nociceptifs sont transmis à la formation réticulée bulbaire. Ils sont ensuite transmis par la formation réticulée au thalamus médian. Le thalamus médian les transmet ensuite à l'amygdale et aux cortex limbiques : cingulaire et insulaire. Puis le cortex insulaire les transmet en partie aux neurones du cortex SII.

B) Dans la voie ponto-mésencéphalique, les messages nociceptifs sont transmis à la substance grise périaqueducale (PAG) et à l'aire parabrachiale (PB) mésencéphaliques. La PAG et le PB transmettent ensuite ces messages à l'hypothalamus et à l'amygdale. Puis l'amygdale les transmet au cortex cingulaire qui les transmet au cortex insulaire qui les envoie au cortex SII. Quelle que soit la voie de transmission, les structures cérébrales qui reçoivent en dernier les messages nociceptifs sont les cortex cingulaire et insulaire ainsi que les cortex somesthésiques SI et SII. Ce sont ces structures qui font l'intégration finale de l'information portée par les messages nociceptifs.

2. Système d'intégration

Les messages nociceptifs sont véhiculés jusqu'aux structures supra spinale par des voies ascendantes. Trois voies se distinguent : la voie spino- thalamique, la voie spino-réticulo-thalamique et la voie (ponto)-mésencéphalique (Figure 4).

La voie spino- thalamique (Figure 4A) permet, via l'activation des thalamus médian et latéral, la transmission des messages nociceptifs conduisant à l'activation des cortex limbiques (cingulaire et insulaire) et somesthésiques (primaire SI et secondaire SII). Il existe un certain recouvrement entre ces deux populations puisque certains neurones projettent à la fois sur les parties latérale et médiane du thalamus (Paulmier et *al.*, 2015).

La voie spino-réticulo-thalamique (Figure 4A) se projette au niveau des structures encéphaliques, véhiculant un message d'alarme et d'éveil et support de la composante affective et cognitive de la sensation douloureuse. En effet, les neurones se projettent au niveau de la formation réticulée puis du thalamus médian et enfin au niveau des cortex limbiques (cingulaire et insulaire) (Paulmier et *al.*, 2015).

Enfin, la voie (ponto)-mésencéphalique (Figure 4B) permet, via l'activation de structures mésencéphaliques (substance grise périaqueducule et aire parabrachiale), la transmission des messages nociceptifs à l'hypothalamus et à l'amygdale qui peuvent activer les cortex limbiques et somesthésiques (Paulmier et *al.*, 2015).

Une fois arrivé au niveau supra-spinale les messages nociceptifs sont intégrés comme douloureux ou comme non douloureux, cette intégration est dépendante des modulations qui ont lieu tout au long de la transmission des messages nociceptifs.

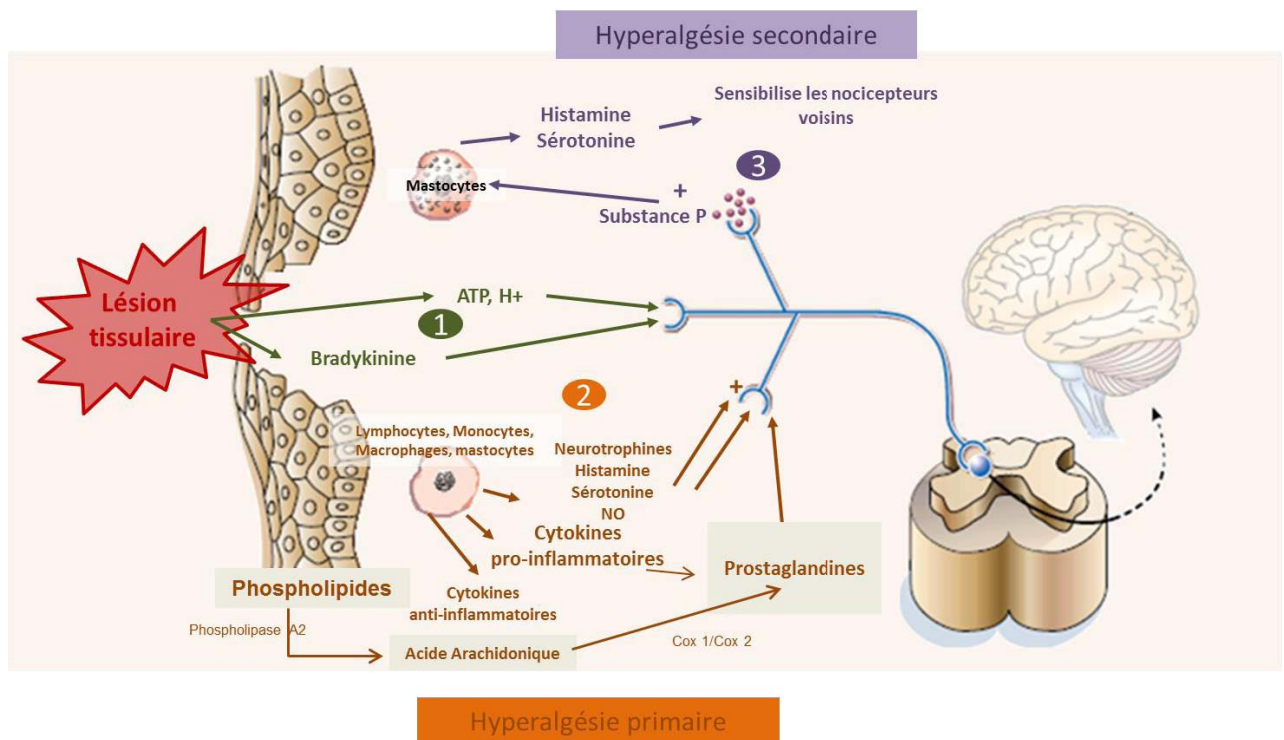


Figure 5: Mécanisme de l'hyperalgésie primaire et secondaire (Le Bars et Willer 2004)

1. Suite à la lésion tissulaire, les nocicepteurs sont activés (dépolariation de la membrane : Potentiel d'Action) entre autres par les ions hydrogènes (H⁺), l'adénosine triphosphate (ATP) et la bradykinine.
2. Le processus inflammatoire se met en place et les cellules immunitaires (lymphocytes, macrophages...) ainsi que les médiateurs de l'inflammation (bradykinines, prostaglandines, cytokines...) envahissent le site de la lésion. Les cellules de la lignée inflammatoire (macrophages...) vont libérer des neurotrophines, de l'histamine et de la sérotonine. Les phospholipides membranaires sont dégradés libérant ainsi de l'acide arachidonique, qui par une cascade de réactions, impliquant plusieurs enzymes comme la cyclo-oxygénase (COX) conduira à la production de prostaglandine. Ces molécules induisent la sensibilisation des nocicepteurs (**hyperalgésie primaire**) qui se caractérise par la baisse de leur seuil de dépolariation, ainsi les nocicepteurs deviennent sensibles à des stimulations de plus faible intensité.
3. L'inflammation peut également induire la sensibilisation des tissus sains autour du site lésé et constitue l'**hyperalgésie secondaire**. En effet, des neuropeptides comme la substance P présente dans les ganglions rachidiens, peuvent être libérés au niveau du site de la lésion ainsi qu'à la périphérie de la lésion initiale et induire la sensibilisation des fibres nerveuses appartenant au tissu non lésé.

C. Système de modulation du message nociceptif

Lors de la transmission des messages nociceptifs, deux types de modulations ont lieu : des modulations activatrices ou des modulations inhibitrices (Paulmier et *al.*, 2015).

1. Modulations activatrices

Les modulations activatrices induisent une sensibilisation des nocicepteurs en diminuant leur seuil de réponse et agissent soit au niveau de la lésion tissulaire par des mécanismes d'hyperalgésies et d'allodynie soit au niveau des transmissions synaptiques spinale et supra-spinale.

a. Modulation activatrice au niveau de la lésion tissulaire

Un stimulus nociceptif engendre des lésions tissulaires avec la libération de substances algogènes (qui ont un rôle d'activation des nocicepteurs) et des substances sensibilisatrices (qui sensibilisent les nocicepteurs) qui sont à l'origine de la sensibilisation des nocicepteurs. Les substances algogènes et sensibilisatrices sont libérées soit au niveau de la lésion, par les nocicepteurs ou lors du processus inflammatoire (Figure 5) :

- **Les substances algogènes** telles que la bradykinine, les ions hydrogène et potassium, l'histamine et la sérotonine sont **libérées lors de la lésion tissulaire** et participent à l'activation des nocicepteurs en modifiant leur perméabilité membranaire et en abaissant leurs seuil de stimulation.
- **Les substances algogènes** telles que la substance P, les neurokinines A et le peptide associé au gène de la calcitonine **libérés par les nocicepteurs** vont participer à l'activation et/ou la sensibilisation.
- **Les substances sensibilisantes** telles que les prostacyclines, prostaglandines et leucotriènes sont **libérés lors du processus inflammatoire**. Elles ne sont pas des substances activatrices (donc non algogène) mais induisent une sensibilisation des nocicepteurs à l'action d'autre substances algogènes. La lésion tissulaire dégrade les phospholipides membranaires libérant ainsi de l'acide arachidonique, qui par une cascade de réactions, impliquant plusieurs enzymes comme la cyclo-oxygénase (COX) et la lipo oxygénase (LipoX), conduit à la production de prostaglandines, prostacyclines et leucotriènes.

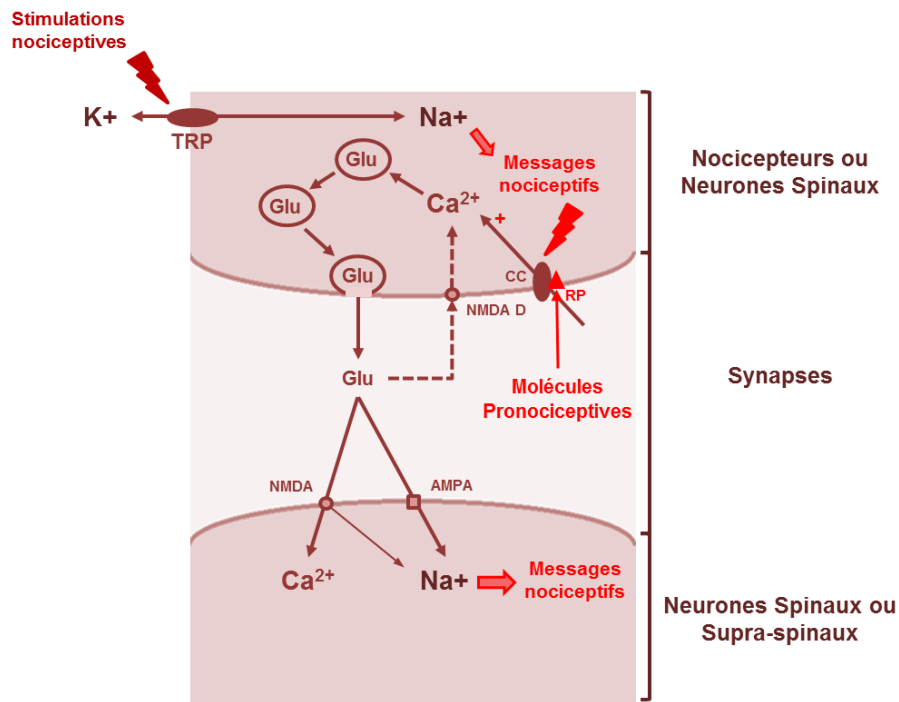


Figure 6 Modulation activatrice de la transmission synaptiques des messages nociceptifs (Paulmier et al., 2015).

L'activation de la transmission synaptique des messages nociceptifs est liée à une augmentation de la concentration calcique cytoplasmique des neurones présynaptiques (nocicepteurs ou neurones spinaux). L'entrée massive de calcium dans ces neurones est permise par le maintien de l'ouverture des canaux calciques voltagedépendants (CC) localisés sur la membrane de ces neurones. Ces CC sont couplés à des récepteurs pronociceptifs (RP) sur lesquels se lient spécifiquement des molécules pronociceptives. C'est la liaison entre les molécules pronociceptives (prostanoïdes, sérotonine et ATP) et leur RP spécifique (EP, 5-HT3 et P2X) qui induit le maintien de l'ouverture des CC. La conséquence de l'entrée massive de calcium dans les neurones présynaptiques est le relargage massif du glutamate (Glu) qui permet la transmission synaptique des messages nociceptifs. Plus il y aura de glutamate libéré, plus les neurones postsynaptiques (neurones spinaux ou supra-spinaux) recevront de messages nociceptifs et pourront en transmettre.

L'ensemble de ces substances algogènes et sensibilisantes forme une « soupe sensibilisante » et induit la sensibilisation des terminaisons libres des nocicepteurs appelée également **hyperalgésie primaire** qui se caractérise par la baisse de leur seuil de dépolarisation. Ainsi les nocicepteurs deviennent sensibles à des stimulations de plus faible intensité (Figure 5). Les tissus sains autour de la zone lésée peuvent également être sensibilisés par le mécanisme de l'**hyperalgésie secondaire** ou neuro-inflammation. Les peptides comme la substance P synthétisée dans les ganglions rachidiens, peuvent être libérés au niveau du site de la lésion ainsi qu'à la périphérie de la lésion initiale et induire la sensibilisation des fibres nerveuses appartenant au tissu non lésé (Le Bars et Willer, 2004) (Figure 5).

Les hyperalgésies primaire et secondaire contribuent à la sensibilisation des terminaisons libres des nocicepteurs touchés par la lésion mais également celles des nocicepteurs adjacents.

b. Modulation activatrice au niveau spinal

Au niveau spinal (c'est-à-dire au niveau de la moelle épinière), les nocicepteurs font synapses avec des neurones post-synaptiques afin de transmettre les messages nociceptifs.

Les stimulations nociceptives induites au niveau de la zone lésée sont à l'origine d'une sommation temporelle au niveau spinal lié au fait que les potentiels postsynaptiques générés par les nocicepteurs (particulièrement les fibres C) sont lents et se « superposent » lorsqu'ils sont répétés à intervalles courts, on parle d'effet « wind-up » (Meintjes, 2012). Cet effet est permis par l'activation des récepteurs NMDA, activation induite par la suppression du blocage du récepteur par le magnésium, modifiant sa structure et le rendant sensible au glutamate, acide aminé excitateur. L'activation de ces récepteurs induit une augmentation de la concentration calcique cytoplasmique des neurones présynaptiques qui libèrent des neurotransmetteurs et des neuromodulateurs en plus grande quantité. Le relargage massif de ces molécules permet d'intensifier la transmission synaptique des messages nociceptifs entre les neurones. Ce phénomène est amplifié par l'ouverture des canaux calciques associés aux récepteurs NMDA-R présents sur les neurones présynaptiques. Ces canaux s'ouvrent lorsque les récepteurs NMDA-R en dormance sont activés suite à un relargage massif de glutamate qui peut être induit par l'action des molécules pronociceptives (Basbaum et *al.*, 2009 ; Paulmier et *al.*, 2015) (Figure 6).

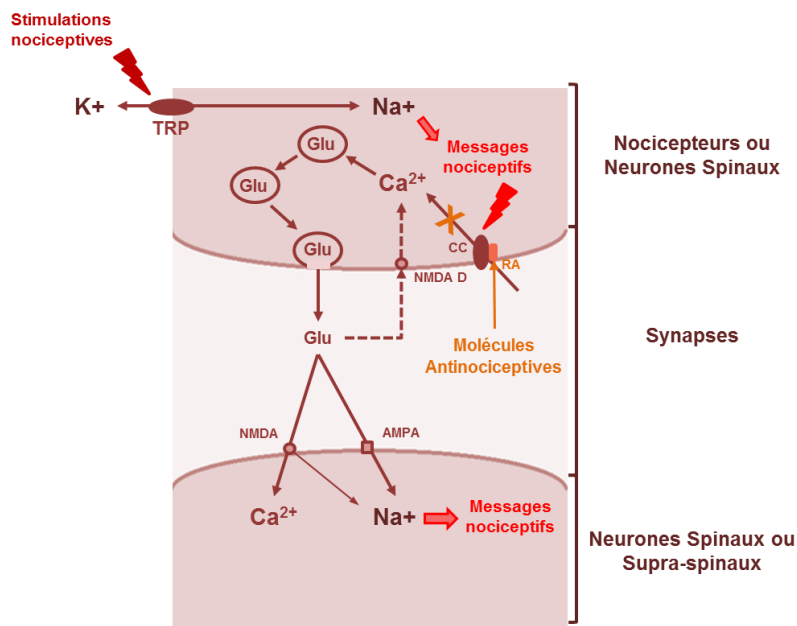


Figure 7 : Modulation inhibitrice de la transmission synaptique des messages nociceptifs (Paulmier et *al.*, 2015).

L'inhibition de la transmission synaptique des messages nociceptifs est liée à une diminution de la concentration calcique cytoplasmique des neurones présynaptiques (nocicepteurs ou neurones spinaux). La limitation de l'entrée de calcium dans ces neurones est permise par la fermeture de certains canaux calciques voltage-dépendants (CC) localisés sur la membrane de ces neurones. Ces CC sont couplés à des récepteurs anti-nociceptifs (RA) sur lesquels se lient spécifiquement des molécules antinociceptives. C'est la liaison entre les molécules anti-nociceptives (acide gamma amino butyrique (GABA), noradrénaline, sérotonine et opioïdes) et leur récepteur antinociceptif (RA) spécifique (GABAA,B, $\alpha 2$, 5-HT1A,1B et μ, δ et κ) qui induit la fermeture des CC. La conséquence de la diminution de la concentration calcique cytoplasmique dans les neurones présynaptiques est la diminution du relargage du glutamate (Glu) qui permet la transmission synaptique des messages nociceptifs. Moins il y aura de glutamate libéré, moins les neurones postsynaptiques (neurones spinaux ou supra-spinaux) recevront de messages nociceptifs et pourront en transmettre.

2. Modulations inhibitrices par voie endogène

La transmission du message nociceptif est soumise à plusieurs modulations inhibitrices : i) la modulation de la transmission synaptique des messages nociceptifs, ii) la modulation « segmentaire » et iii) la modulation « supra-segmentaire » (Le Bars et Willer, 2004).

La modulation de la transmission synaptique des messages nociceptifs s'effectue au travers d'une modulation de la concentration calcique cytoplasmique des neurones présynaptiques (Figure 7) (Le Bars et Willer, 2004). Lorsqu'elle diminue, les neurones présynaptiques libèrent moins de neurotransmetteurs et de neuromodulateurs ce qui a pour conséquence une limitation voire un blocage de l'information nociceptive qui n'est plus envoyée aux structures cérébrales. Cette limitation et/ou ce blocage de l'information est induit par certaines substances telles que la sérotonine, l'Acide-Gamma-Amino-Butyrique (GABA), la noradrénaline ou les opioïdes endogènes qui se fixent à des récepteurs spécifiques dits « antinociceptifs » (respectivement 5-HT_{1A} , 5-HT_{1B} , $\text{GABA}_{A,B}$, α_2 et μ , δ et κ) (Paulmier et *al.*, 2015).

La modulation « segmentaire » (Figure 8) est une inhibition de la transmission des messages nociceptifs par des influx nerveux non nociceptifs (Guirimand et Le Bars, 1996 ; Le Bars et Willer, 2004). Cette modulation est donc liée à l'activation de fibres capables d'élaborer et de transmettre des messages nerveux non nociceptifs telles que les fibres $A\beta$ (responsables des sensations tactiles). Cet effet inhibiteur est lié à la structure des neurones spinaux à convergence. En effet, ces neurones ont deux champs récepteurs : l'un excitateur, l'autre inhibiteur. Ces neurones spinaux s'activent lorsqu'un influx nerveux nociceptif ou non nociceptif (tactile par exemple) excite leur champ excitateur et s'inactivent lorsqu'un influx nerveux exclusivement non nociceptif (tactile par exemple) excite leur champ inhibiteur. Lorsqu'un neurone spinal à convergence reçoit un message nociceptif (provenant de nocicepteurs cutanés et/ou viscéraux) dans son champ excitateur, il s'active et transmet ce message nociceptif vers la « matrice cérébrale de la douleur ». Si au cours de cette transmission il reçoit un message non nociceptif (lié à un message de la zone qui avait reçu les stimulations nociceptives par exemple) dans son champ inhibiteur alors il s'inactivera et le message nociceptif sera inhibé. De plus, dans la moelle épinière les neurones spinaux à convergence sont en contact les uns avec les autres et leur champs excitateurs et inhibiteurs se recouvrent (Figure 8B). Ceci implique qu'un influx nerveux non nociceptif peut

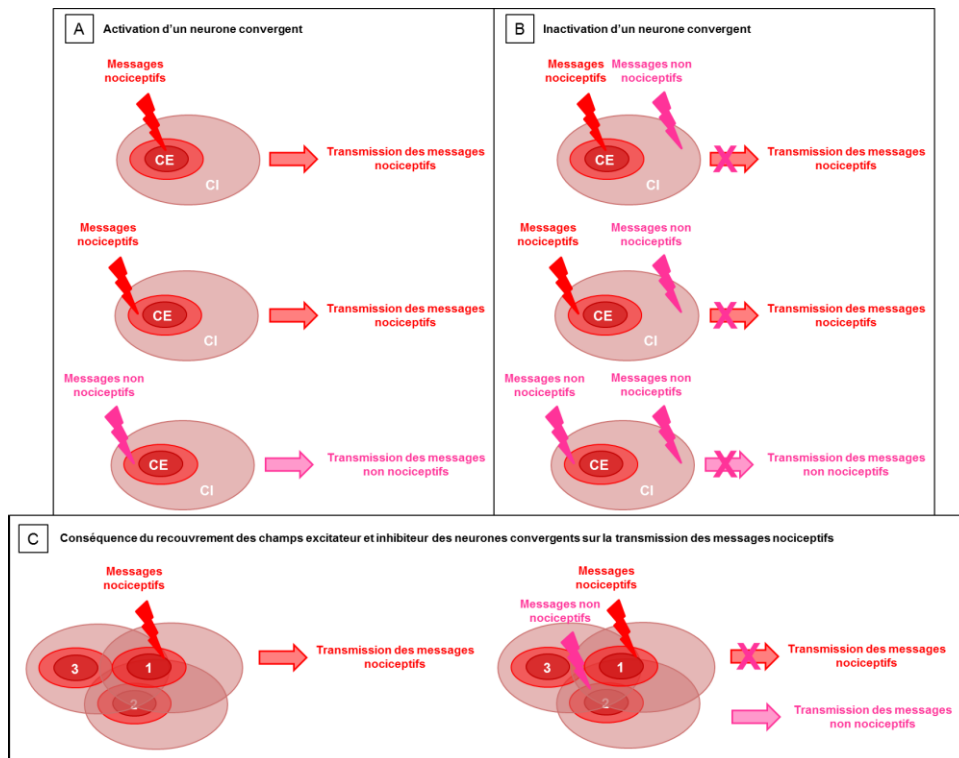


Figure 8 : Propriétés excitatrices et inhibitrices des neurones spinaux à convergence (Paulmier et *al.*, 2015).

Le corps cellulaire des neurones convergents possède deux champs récepteurs, l'un excitateur (CE) et l'autre inhibiteur (CI).

A) L'activation des neurones convergents peut être induite par des messages nociceptifs transmis par les nocicepteurs ou par des messages non nociceptifs transmis par les neurones sensitifs. Le centre du CE des neurones convergents (en rouge foncé) est activé lorsqu'il reçoit des messages nociceptifs tandis que la périphérie du CE (en rouge clair) peut être activée par des messages nociceptifs ou non nociceptifs à condition qu'ils soient de forte intensité. L'activation des neurones convergents permet la transmission des messages nociceptifs ou non nociceptifs que ces neurones ont reçus à des neurones supra-spinaux localisés dans le tronc cérébral et le cerveau de l'animal.

B) L'inactivation des neurones convergents n'est induite que par des messages non nociceptifs transmis par les neurones sensitifs, surtout lorsque ces messages nerveux sont appliqués de manière rapide et répétitive. Le CI des neurones convergents est activé lorsqu'il reçoit ces messages nerveux ce qui inactive ces neurones. Cette inactivation des neurones convergents bloque la transmission de tous les messages nerveux que ces neurones transmettaient aux neurones supra-spinaux.

C) Lorsque l'on fait une coupe de moelle épinière, on observe un recouvrement des CE et CI de différents neurones convergents. Par exemple sur le schéma, les champs excitateur et inhibiteur des neurones 1, 2 et 3 se recouvrent. Si le neurone 1 reçoit des messages nociceptifs au niveau de son CE, il les transmet à des neurones supra-spinaux. Si au même moment, un message non nociceptif de forte intensité arrive au niveau du CE périphérique du neurone 2, il sera transmis aux neurones supra-spinaux en priorité puisqu'il aura inactivé le neurone 1 en activant son CI. Les messages nociceptifs ne seront donc pas transmis aux neurones supra-spinaux et ne pourront pas être traités par la matrice douleur.

simultanément activer un neurone à convergence (en activant son champ activateur) et inactiver ses voisins (en activant leur champ inhibiteur) (Paulmier et *al.*, 2015).

La modulation « supra-segmentaire » peut être « descendante » ou « descendante via les Contrôles Inhibiteurs Diffus Nociceptifs (CIDN) » (Guirimand et Le Bars, 1996 ; Le Bars et Willer, 2004). La modulation « descendante » consiste en une activation de la modulation de la transmission synaptique par des molécules (sérotonine et opioïdes endogènes) libérées par certaines structures cérébrales, telles que la substance grise périaqueducale mésencéphalique, activées par les premières stimulations nociceptives. La modulation « descendante via les CIDN » est induite par des messages nociceptifs secondaires (par exemple induites par la mise en place d'aiguilles dans le cadre d'une acupuncture pour traiter la douleur). Elle est impliquée dans le phénomène qui permet de masquer une douleur par une autre et semble jouer un rôle de filtre facilitant la détection des messages nociceptifs par la « matrice cérébrale de la douleur » (Guirimand et Le Bars, 1996 ; Le Bars et Willer, 2004 ; Plas, 2011 ; Paulmier et *al.*, 2015).

3. Modulations inhibitrices par voie exogène

Différentes molécules thérapeutiques (anesthésiques, analgésiques) agissent sur les processus d'élaboration et/ou de transmission et /ou d'intégration du message nociceptif et permettent ainsi de limiter le ressenti d'une douleur. Ces molécules peuvent agir en périphérie et/ou au niveau central par différents mécanismes d'action.

a. Modulation au niveau de l'élaboration et de la transmission des messages nociceptifs

L'anesthésie locale induit une perte de sensation réversible au niveau de la zone lésée sans perte de conscience. Les anesthésiques locaux, en bloquant les canaux sodiques, s'opposent aux décharges d'activité neuronale ectopique, au niveau périphérique. L'anesthésique est soit déposé à la surface de la zone cutanée, soit injecté par voie sous-cutanée ou intramusculaire et permet d'insensibiliser les nocicepteurs, l'anesthésie est dite "locale". L'anesthésique peut également être injecté en amont de la zone à anesthésier, bloquant la transmission du message nociceptif jusqu'à la moelle épinière, l'anesthésie est dite "régionale" ou "loco-régionale" (Holopherne et Guatteo, 2009).

Molécules disponibles Chez les ruminants, la procaine est une molécule bénéficiant d'une autorisation de mise sur le marché (AMM). Elle est utilisée en préopératoire dans des

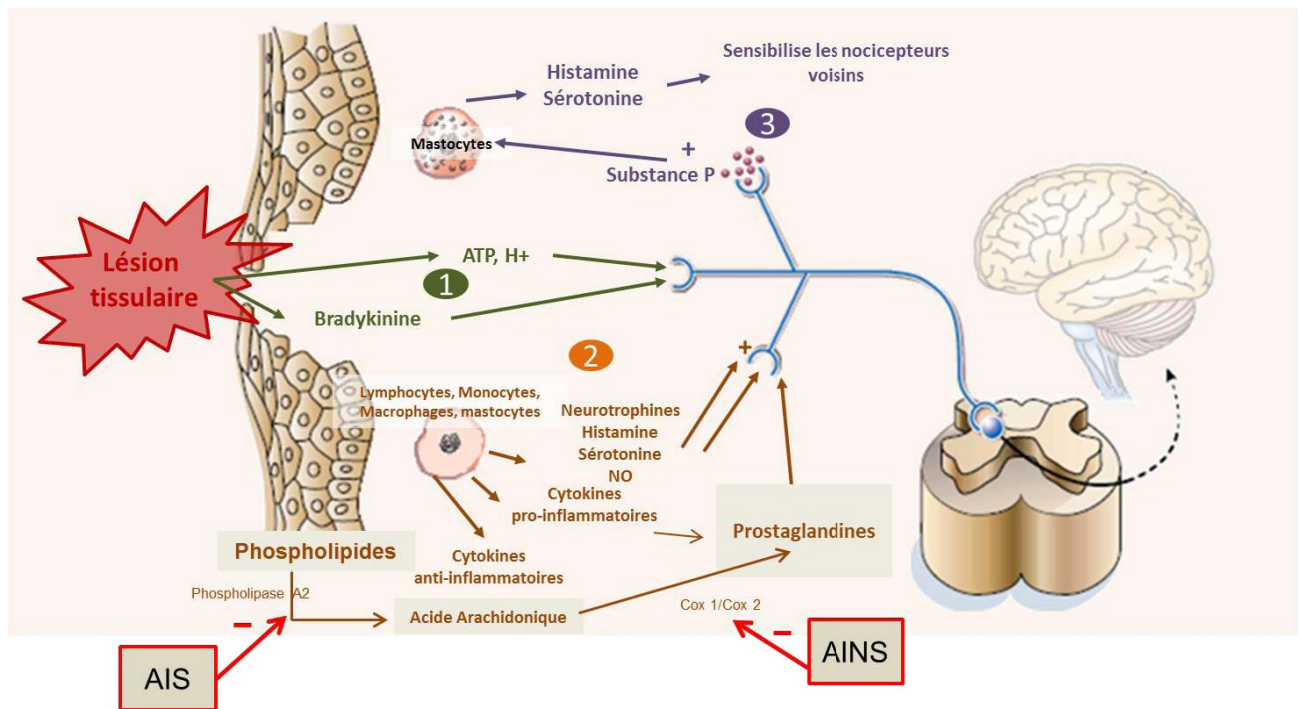


Figure 9 : Principaux sites d'action des AIS et AINS (Rao & Knaus, 2008)

Suite à une lésion tissulaire, la phospholipase A2 libère de l'acide arachidonique à partir des phospholipides qui sous l'action des cyclo-oxygénase se transforme en prostaglandines. Ces prostaglandines induisent une sensibilisation des nocicepteurs. Les AIS ont la propriété de limiter la sensibilisation des nocicepteurs en inhibant la synthèse des prostaglandines par limitation de l'accès de l'acide arachidonique par les sites actifs des cyclo-oxygénases (COX) (Blain et al 2000, Le Bars et Willer 2004).

situations de chirurgies de terrain comme des castrations ou lors de césariennes. L'utilisation de la procaine chez les animaux d'élevage est intéressante de par son coût peu élevé et sa simplicité d'utilisation. Peu d'effets secondaires ont été rapportés hormis une toxicité si une dose trop importante est administrée notamment par voie intravasculaire (Valverde, 2005).

b. Modulation de l'activation des messages nociceptifs

La modulation de l'activation du message nociceptif peut être réalisée au niveau du processus inflammatoire mais aussi au niveau de la transmission synaptique excitatrice spinale. Nous traiterons successivement ces deux niveaux de modulation.

Modulation au niveau du processus inflammatoire.

L'activation exagérée et l'abaissement du seuil d'activation des nocicepteurs par des facteurs algogènes et/ou sensibilisants (prostaglandines, histamine, substance P, protons, sérotonine, bradykinine) libérés au cours de la réponse inflammatoire sont responsables d'un phénomène de sensibilisation se traduisant par l'hyperalgésie et l'allodynie. Ces modulations activatrices peuvent avoir lieu au niveau du site d'élaboration du message nociceptif ou au niveau de la transmission synaptique dans la moelle épinière et sont à l'origine des processus de sensibilisations périphériques et centrales.

Au cours du processus inflammatoire, la phospholipase A2 est activée et provoque la libération d'acide arachidonique (à partir des phospholipides membranaires) qui se transformera en prostaglandine sous l'action des cyclo-oxygénases. Les prostaglandines participent à la sensibilisation des nocicepteurs augmentant le nombre de messages nociceptifs élaborés et transmis vers les neurones spinaux. L'action anti-inflammatoire et antalgique des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) est liée à leur action inhibitrice vis-à-vis des cyclo-oxygénases bloquant ainsi la synthèse des prostaglandines (Blain et al 2000). En inhibant la formation de prostaglandines, les AINS luttent contre l'oedème et l'érythème produits par l'inflammation. Cependant, leur action anti-inflammatoire proprement dite est moins puissante que celle des anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS). En effet, les AIS agissent plus « haut » sur la cascade inflammatoire en inhibant la formation des phospholipases, ils empêchent la libération d'acide arachidonique inhibant également la synthèse des prostaglandines des thromboxanes et des leucotriènes. Les leucotriènes sont, entre autres, responsables de vasodilatation et d'oedème et entretiennent donc le phénomène inflammatoire lorsque les cyclo-oxygénases sont inhibées (Figure 9).

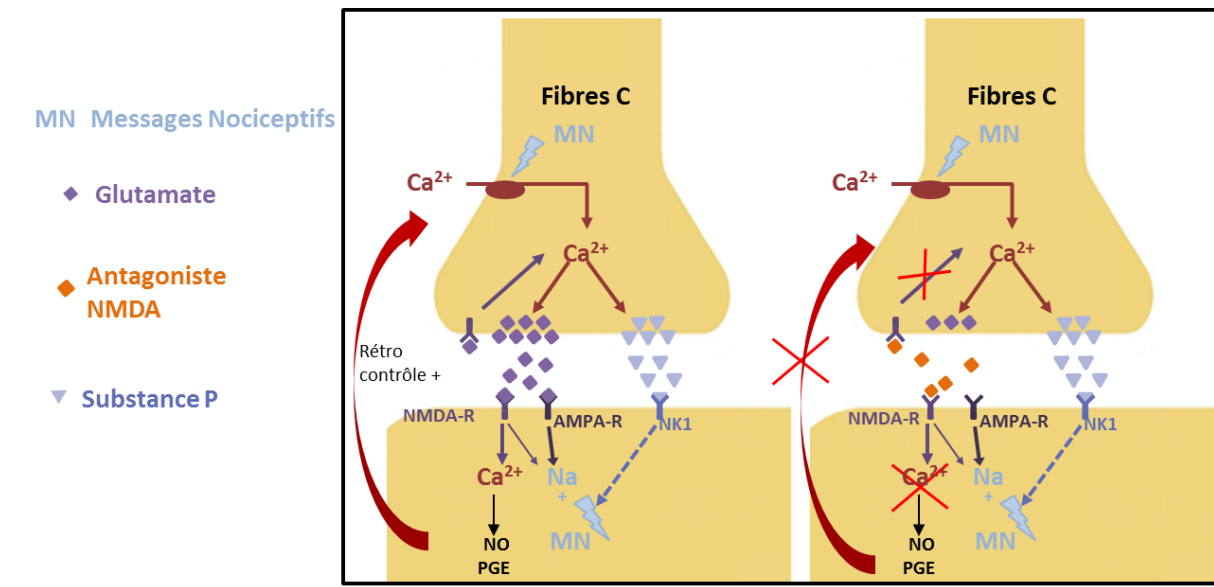


Figure 10 : Mécanismes d'action de la kétamine

Le récepteur canal NMDA perméable au calcium, est présent sur les neurones pré et post-synaptiques. Le glutamate libéré dans la fente synaptique, suite à un message nociceptif, va se fixer sur des récepteurs NMDA post-synaptique induisant l'entrée de calcium mais aussi pré-synaptiques favorisant sa propre libération. Par ailleurs, le calcium en se fixant à des protéines de liaison va induire la synthèse de monoxyde d'azote (NO) et de prostaglandine (PG). Le NO et les PG vont à leur tour diffuser vers le neurone pré-synaptique et favoriser l'entrée de calcium. Ces rétrocontrôles positifs liés aux récepteurs NMDA sont à l'origine du phénomène de sensibilisation centrale. L'action antagoniste de la kétamine sur les récepteurs NMDA inhibe ces mécanismes et limite le phénomène de sensibilisation centrale (Le Bars et Willer 2004).

Molécules disponibles Les AINS bénéficiant d'une AMM chez le bovin sont la flunixin, le kétoprofène, le carprofène, le méloxicam, l'acide tolfénamique, le métamizole et l'acide acétylsalicylique. Ces molécules sont utilisées pour des douleurs par excès de nociception préférentiellement d'origine somatique (douleurs musculo-squelettique, mammites, boiteries) mais certaines molécules comme la flunixin sont également conseillées pour des douleurs viscérales (Fitzpatrick et *al.*, 1998 ; Heinrich et *al.*, 2010 ; Coetzee, 2011 ; Lizarraga et Chambers, 2012). Les AINS peuvent induire des effets secondaires comme des érosions gastro-intestinales ou une toxicité rénale, néanmoins ils sont limités chez les ruminants si la posologie est respectée. L'utilisation des AINS est peu contraignante, le coût est modéré ainsi que le temps d'attente (4 à 21 jours dans la viande). Néanmoins pour la production laitière, les pertes liées à la production de lait écarté doivent être additionnées au coût des médicaments afin d'évaluer l'impact économique total.

- **Modulation au niveau synaptique.** La sensibilisation centrale observée lors des états douloureux chroniques neuropathiques ou inflammatoires est caractérisée par une facilitation de la transmission synaptique excitatrice spinale, sous-tendue par les récepteurs-canaux du glutamate, en particulier les récepteurs NMDA, dont l'activité est augmentée. L'activité du récepteur NMDA est régulée par phosphorylation/déphosphorylation de résidus tyrosine impliquant diverses protéines kinases et protéines phosphatases. Dans des conditions d'homéostasie, le récepteur NMDA est à l'état quiescent, le canal étant bloqué par les ions Mg^{2+} . Dans des conditions de douleur soutenue, le glutamate libéré par les fibres afférentes primaires, en se liant au récepteur-canal de type AMPA perméable au Na^+ , du neurone postsynaptique, lève l'inhibition voltage-dépendante exercée par le Mg^{2+} (Gielen, 2010). En se liant au récepteur NMDA, le glutamate ouvre le canal et provoque une entrée massive de Ca^{2+} à travers les pores dans le neurone post-synaptique (Figure 10).

La cascade de signalisation induite par l'activation des récepteurs AMPA (entrée de Na^+) et NMDA (entrée de Ca^{++}) inclut 1) l'activation de kinases de la famille des sérine/thréonine kinases (Src) qui sensibiliseraient le récepteur NMDA au Na^+ et faciliteraient sa phosphorylation (Salter et Pitcher, 2012) 2) et l'activation d'enzymes dont la NO synthase (NOS) et les cyclo-oxygénases COX, catalysant la formation de monoxyde d'azote (NO) et de prostaglandines (PG). Le NO et les PG ainsi formés diffusent vers le neurone présynaptique renforçant la libération de glutamate dans la fente synaptique (Le Bars et Willer, 2004). L'effet résultant est une facilitation de la transmission glutamatergique se traduisant par une augmentation du nombre de récepteurs AMPA et NMDA au niveau de la membrane

Tableau 2. Principales molécules à propriétés analgésiques et anesthésiques utilisées chez les animaux d'élevage (d'après Valverde 2005).

Molécules	Voies d'administrations	Principes actifs	Mode d'action	Type de douleur ciblé	AMM bovin
Anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)	Intraveineuse, intramusculaire	Flunixin	Inhibiteur non sélectif des COX	Douleur viscérale	oui
		Kétoprofène	Inhibiteur préférentiel des COX 1	Douleur musculo-squelettique	oui
		Carprofène	Inhibiteur préférentiel des COX 2	Infections respiratoires et mammites aiguës	oui
		Méloxicam	Inhibiteur préférentiel des COX 2	Infections respiratoires et mammites aiguës	oui
		Acide tolfénamique	Inhibiteur non sélectif des COX	Syndromes respiratoires, mammites aiguës et boiteries	oui
Sédatifs	Intraveineuse, intramusculaire et péridurale	Xylazine	Agoniste des récepteurs α_2 -AD	Douleur viscérale et orthopédique (cheval)	oui
		Détomidine	Agoniste des récepteurs α_2 -AD		oui
Dérivés morphiniques	Intraveineuse, intramusculaire, Epidurale, Transdermal, Intra-articulaire	Morphine,	agoniste μ	Douleur orthopédique (cheval) Douleur somatique et viscérale (mouton)	non
		Fentanyl,			non
		Meperidine			non
		Butorphanol	agoniste κ et antagoniste μ	Douleur viscérale (cheval) Douleur somatique (mouton)	utilisation de la « cascade »
		Buprénorphine	agoniste μ partiel et antagoniste κ	Douleur somatique	non
Antagonistes du récepteur NMDA	Epidurale Intraveineuse, intramusculaire, sous-cutanée	Kétamine	Antagoniste NMDA	Douleur par excès de nociception et neuropathique	oui
Anesthésique local	Locale et loco-régionale	Procaïne	Bloque les canaux sodiques	Douleur par excès de nociception et neuropathique	oui

postsynaptique et de leur activité. Les antagonistes des récepteurs NMDA réduisent donc la sensibilisation centrale en inhibant l'action excitatrice du glutamate (Meintjes, 2012).

Molécules disponibles Chez les ruminants, la kétamine qui bénéficie d'une AMM, a une action anesthésique à forte dose ou analgésique à faible dose (Valverde, 2005). L'administration de la kétamine est bénéfique (i) en pré ou peropératoire, elle permet de diminuer la douleur post-opératoire (ii) dans des situations de douleurs chroniques répondant mal au traitement initial comme les douleurs neuropathiques aussi bien chez l'animal (Vinuela-Fernandez et *al.*, 2007) que chez l'homme (Hocking et Cousins, 2003). La kétamine permet également de potentialiser les effets analgésiques de diverses autres molécules administrées conjointement (Boreve, 2010). La kétamine est relativement facile d'utilisation car son administration n'implique pas de temps d'attente dans le lait et la viande, en revanche son coût est relativement élevé. Néanmoins, étant classé comme psychotrope, seul le vétérinaire est autorisé à l'administrer (Tableau 2).

c. Modulation de la transmission et de l'intégration des messages nociceptifs

Le message nociceptif est soumis à divers systèmes de contrôles inhibiteurs lors de sa transmission de la périphérie jusqu'au cerveau. Ces modulations peuvent être exercées au niveau des récepteurs aux enképhalines et aux endorphines mais aussi au niveau des récepteurs $\alpha 2$ -adrénergiques.

Modulation au niveau des récepteurs aux enképhalines et endorphines

Les opioïdes sont des agonistes des récepteurs aux enképhalines et endorphines et agissent au niveau spinal et supra spinal en déprimant la transmission synaptique et/ou en activant la modulation inhibitrice. Les récepteurs aux morphiniques sont des récepteurs opioïdes mu (μ), kappa (κ) et delta (δ) principalement situés au niveau du cerveau (endorphines) et de la moelle épinière (enképhalines), c'est pourquoi l'on qualifie les opioïdes d'analgésiques centraux. La fixation des morphiniques sur ces récepteurs va induire la fermeture des canaux calciques et l'ouverture des canaux potassiques induisant une hyperpolarisation du neurone bloquant ainsi la transmission des potentiels d'action et donc des messages nociceptifs (Lizarraga et Chambers, 2012). Plus précisément, trois sites d'action semblent exister. La fixation des morphiniques sur leurs récepteurs μ , κ et δ explique les effets analgésiques mais également certains effets indésirables comme la sédation, l'euphorie, la dépression respiratoire, la

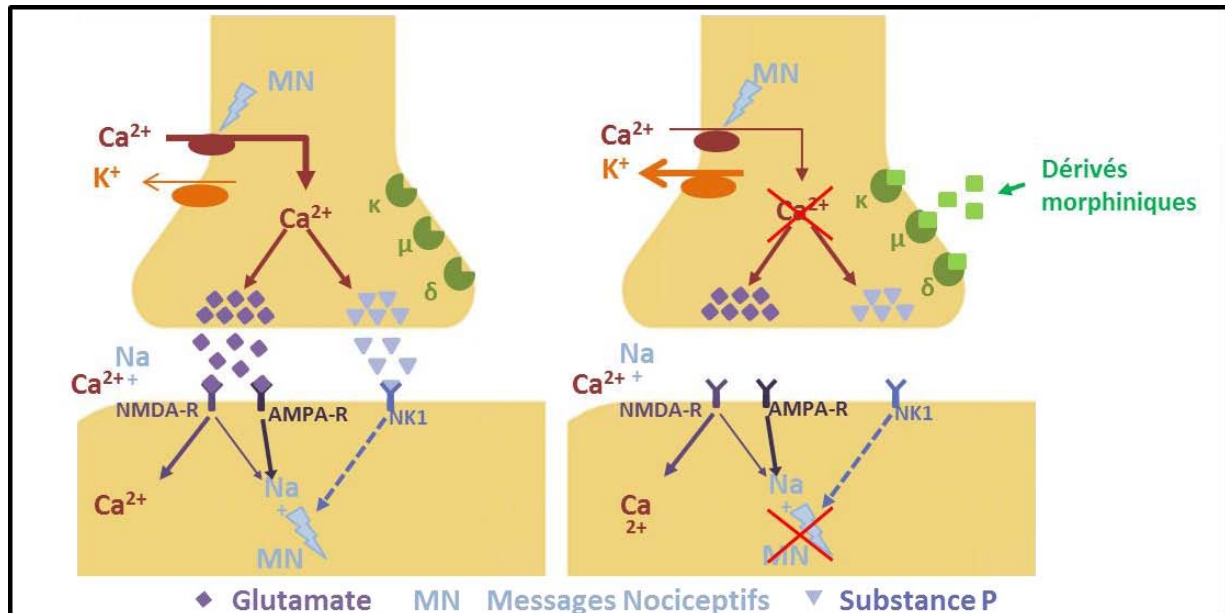


Figure 11 : Mécanisme d'action des morphiniques

Les récepteurs opioïdes μ , κ et δ sont les cibles des morphiniques ; leur activation induit la fermeture de canaux calciques et l'ouverture de canaux potassiques membranaires. Ces deux actions au niveau membranaire vont entraîner une hyperpolarisation de la membrane des neurones, bloquant ainsi la transmission des potentiels d'action et donc des messages nociceptifs (Lizarraga et Chambers 2012).

diminution du transit digestif et le myosis. Ils agissent également en renforçant les voies descendantes inhibitrices par leur action sur des récepteurs opioïdes présents au niveau de la substance grise périaqueducule (Bille, 2008) (Figure 11).

Molécules disponibles Chez les ruminants, aucun morphinique ne possède d'AMM. Seul le butorphanol peut être utilisé dans le cadre de la « cascade de prescription » (Boreve, 2010). Le butorphanol, grâce à son action antagoniste μ , est intéressant car ses effets indésirables sont moins marqués que ceux de la morphine (Coetzee, 2011). L'utilisation des morphiniques est limitée par la réglementation et par leur coût relativement élevé surtout chez les grands animaux. Les morphiniques peuvent être utilisés par voie intraveineuse, intramusculaire, intra-articulaire ou par voie péridurale. Ils sont efficaces pour la plupart des douleurs modérées à sévères par excès de nociception. Ils sont d'intérêt plus limité pour les douleurs neuropathiques.

Modulation au niveau des récepteurs $\alpha 2$ -adrénergiques

Les agonistes des récepteurs $\alpha 2$ -adrénergiques ($\alpha 2$ -AD) induisent une sédation, une analgésie et un relâchement musculaire (Otto et Short, 1998). Ils agissent de façon agoniste sur les récepteurs $\alpha 2$ -AD. Ces récepteurs sont présents au niveau du bulbe (*locus coeruleus*) et au niveau du système limbique impliqués respectivement dans les régulations de l'état de veille/sommeil et des émotions. Comme pour les morphiniques, la fixation des agonistes $\alpha 2$ -AD sur leurs récepteurs spinaux induit une hyperpolarisation du neurone bloquant ainsi la transmission des messages nociceptifs.

En se liant aux récepteurs $\alpha 2$ -AD du système nerveux sympathique, les agonistes $\alpha 2$ -AD induisent une diminution de l'activité de ce système sympathique qui explique le relâchement musculaire et les effets secondaires sur les systèmes cardiovasculaires, respiratoires (bradycardie et hypotension) et digestifs (diminution de la motilité intestinale) (Lizarraga et Chambers, 2012).

Molécules disponibles Chez le bovin, les agonistes $\alpha 2$ -AD possédant une AMM sont la xylazine et la detomidine (site de l'Agence Nationale du Médicament Vétérinaire). Ils sont principalement utilisés chez les ruminants comme sédatifs facilitant la contention de l'animal. Chez le cheval, ils sont utilisés comme analgésique dans le traitement des douleurs somatiques (douleur orthopédique) et viscérales (colique) (Valverde, 2005). Les agonistes $\alpha 2$ -AD peuvent être utilisés par voie intraveineuse, intramusculaire ou péridurale (Tableau 3).

Tableau 3 : Posologie des molécules anesthésiques et analgésiques disponibles pour les bovins en France (Dartevelle 2014)

Principe actif	AMM bovin	Voie d'administration	Durée d'action	Posologie (mg/Kg)
Méglumine de flunixin	Oui	IM IV SC PO	24h	2-2.2 1-2
Méloxicam	Oui	IV SC	72h	0.5
Kétoprofène	Oui	IV IM	24	3-3.3
Carprofène	Oui	SC PO IV	24H 24-48H	1-2 0.7
Acide tolfénamique	Oui	IV IM SC	24-48	2
Butorphanol	principe de la cascade	IV IM IV IM	120-240min	0.05 – 0.5 0.02 – 0.05
Xylazine	Oui	IV IM Epidurale	2-4h 2-4h 2h	0.01-0.02 0.05-0.1 0.05
Détomidine	Oui	IV IM Epidurale	3-6h 3h	0.005-0.05 0.04 (dilué dans 5 mL de NaCl)
Romifidine	Non	IV IM Epidurale	2-4h >12h	0.003-0.02 0.05 (dilué dans 30 mL de NaCl)
Lidocaine	Non	Locale/locorégionale	60 min (au bout de 5 à 15 min)	50-10 ml (plusieurs points)
		Par vertébrale	90 min (au bout de 10 à 15 min)	3*20 ml
		Péridurale	30-120 min (au bout de 10min)	1-8 ml/100 Kg
		Bloc	60 min (au bout de 10 à 15 min)	5 à 15 ml
		Sous arachnoidienne (rachianesthésie)	60 à 120 min (au bout de < 2 min)	1 ml/10 Kg
		IV	60 min	2.5 mg/Kg

d. Modulation simultanée des différentes étapes de transmission du message nociceptif

Une prise en charge optimale de la douleur doit à la fois limiter l'élaboration et la transmission des messages nociceptifs mais également limiter la modulation activatrice à l'origine des processus de sensibilisation périphérique et centrale, on dit alors qu'elle est **multimodale**. Elle doit aussi être adaptée au type de douleur et à l'intensité douloureuse. L'emploi concomitant de différents principes actifs permet en outre d'optimiser leur action respective et ce, à dose moindre : les effets secondaires de chacun d'entre eux s'en trouvent également limités. Enfin, il apparaît qu'une prise en charge la plus précoce possible d'une douleur améliore sa réduction.

Comment limiter de façon précoce les processus de sensibilisation périphérique et centrale ?

L'intérêt d'une prise en charge précoce de la douleur est de limiter les processus d'hyperalgésie et d'allodynie (Le Bars et Willer, 2004). Certaines molécules peuvent être administrées juste avant une intervention chirurgicale afin de limiter les modulations activatrices. La kétamine ou les AINS par exemple, utilisés en préopératoire permettent de limiter efficacement les processus de sensibilisation par une action périphérique et centrale (Levionnois, 2008). En périphérie, les AINS permettent de limiter l'action sensibilisatrice des prostaglandines.

Au niveau central, l'action antagoniste de la kétamine permet de limiter la nociception pouvant se prolonger plusieurs heures après l'arrêt du stimulus initial (Boreve, 2010).

Comment s'adapter au type de douleur et pourquoi préconiser une analgésie multimodale ?

Le traitement pharmacologique des douleurs par excès de nociception repose sur l'utilisation des anesthésiques locaux, des morphiniques, des antagonistes des récepteurs NMDA et des AINS. Le choix du traitement est réalisé en fonction de l'étiologie, du type et de la localisation de la douleur. Ainsi, les AINS présentent l'avantage d'être utilisés dans des cas de douleur somatique et viscérale. Dans des situations de douleurs plus intenses les AINS peuvent être associés à des agonistes $\alpha 2$ -AD ou des morphiniques permettant d'obtenir une action synergique et d'améliorer l'analgésie (Valverde, 2005). Les morphiniques, bien que peu utilisés en pratique, sont préconisés dans des cas de douleur viscérale dont l'origine est de type tension/distension.

Le traitement pharmacologique des douleurs neuropathiques repose, chez les ruminants, sur l'utilisation des anesthésiques locaux (bloquant la transmission des messages nociceptifs et les

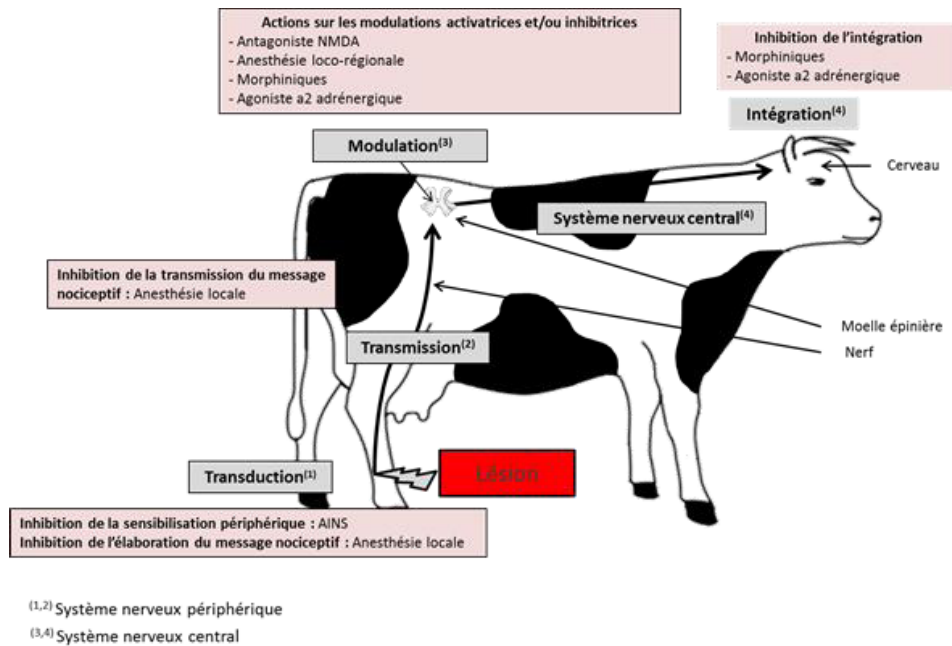


Figure 12 : Principes et cibles d'actions des différentes familles de molécules anesthésiques et analgésiques disponibles dans la pharmacopée vétérinaire.

Suite à une lésion (au niveau de la patte par exemple), le message nociceptif est élaboré et transmis de la périphérie jusqu'aux structures supra-spinales grâce à 4 processus physiologiques : la transduction, la transmission, la modulation et l'intégration. Au niveau du système nerveux périphérique, les anesthésiques locaux et les Anti-inflammatoires Non Stéroïdiens (AINS) permettent de limiter les processus de transduction et de transmission. Au niveau du système nerveux central, les morphiniques, les agonistes $\alpha 2$ -AD, les bloqueurs de canaux sodiques et les antagonistes NMDA s'opposent à la transmission et à l'intégration du message nociceptif

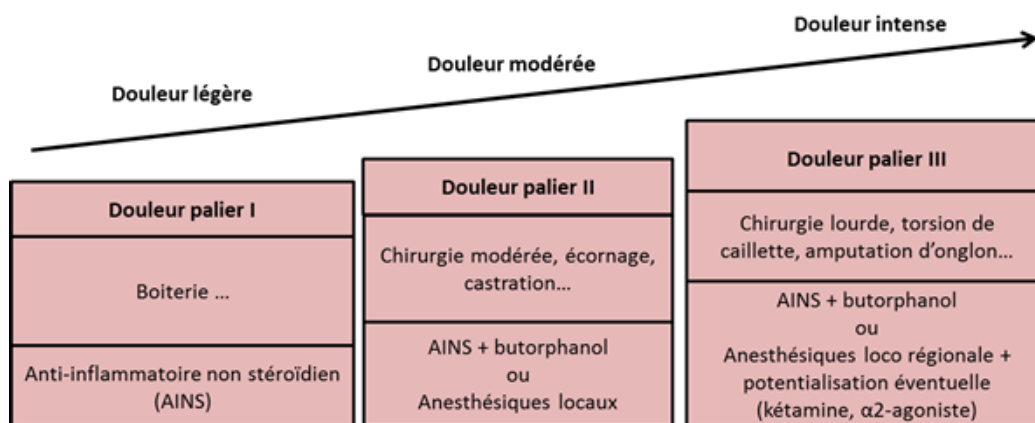


Figure 13: Protocoles analgésiques en fonction de l'intensité douloureuse (Boreve 2010)

décharges ectopiques) et des antagonistes des récepteurs NMDA (bloquant l'action activatrice du glutamate et limitant la sensibilisation centrale).

Il est maintenant bien admis que l'inhibition des messages nociceptifs à plusieurs niveaux de son élaboration (transduction, transmission, modulation, intégration) (analgésie multimodale) est la méthode la plus efficace pour réduire la douleur (Figure 12). L'association d'un sédatif et d'un AINS est beaucoup plus efficace pour limiter des douleurs de type somatique et probablement neuropathique comme dans les situations d'écornage (Stafford et Mellor, 2005). Cette association permet de limiter les processus de sensibilisation périphérique et centrale. L'association du butorphanol, des AINS et des agonistes $\alpha 2$ -AD permet de potentialiser leurs effets analgésiques et sédatifs respectifs mais également de réduire les doses administrées. De même, l'association d'un AINS et d'un anesthésique local administrés avant une castration est plus efficace pour réduire la douleur que la monothérapie (Earley et Crowe, 2002 ; Stafford et al., 2002).

S'adapter à l'intensité de la douleur (antalgiques de paliers I, II et III).

Comme chez l'homme et les animaux de compagnie, les différentes douleurs rencontrées en élevage ont été classées en trois paliers (Boreve, 2010). Les protocoles médicamenteux sont ensuite adaptés à la définition préalable du palier de douleur. Ainsi, pour des douleurs de palier I, seuls des AINS sont préconisés comme par exemple dans des cas de boiteries. Pour des douleurs de paliers II, l'anesthésie locale ou un AINS associé à un morphinique léger sont conseillés comme par exemple lors de l'écornage. L'anesthésie loco-régionale, la sédation et le butorphanol sont, eux, recommandés pour des douleurs de palier III comme par exemple lors de torsion de caillette (Boreve, 2010). Cependant ce classement par palier, chez les animaux de rente, n'a été proposé que pour certaines maladies (boiteries) et chirurgies (castrations, torsions de caillette) (Figure 13).

S'il apparait comme évident que l'arsenal thérapeutique disponible en médecine vétérinaire est assez large pour pouvoir intervenir sur les différents mécanismes de la douleur, de la transduction du stimulus à l'intégration du message nociceptif et que l'approche d'une thérapie multimodale est plus apte à limiter au mieux la douleur il n'en reste pas moins vrai que dans bon nombre de situations d'élevage ou expérimentales, des douleurs plus ou moins intenses subsistent. Aussi, pour améliorer leur prise en charge (détection, soulagement) il est apparu essentiel de pouvoir 1) évaluer le niveau

douloureux des animaux 2) tester l'efficacité antalgique des protocoles médicamenteux à disposition. Avant de faire le point sur les différentes approches actuellement disponibles chez les animaux de rente pour évaluer le niveau de douleur, il nous est apparu important de commencer par une description précise des différents indicateurs de douleur potentiellement accessibles chez les animaux de rente. Ces indicateurs, pour l'essentiel, découlent des changements ou modifications engendrés par des situations de douleur, ces changements ou modifications étant liés au comportement, aux performances ou à la physiologie des animaux algiques.

Chapitre III.

Modifications consécutives à la douleur chez les mammifères

Chapitre III. Modifications consécutives à la douleur chez les mammifères

La douleur peut entraîner de nombreuses modifications comportementales, physiologiques et métaboliques chez les mammifères et induire chez les animaux de rente une baisse des performances zootechniques.

A. Modifications comportementales

1. Présentation des indicateurs comportementaux

La douleur se manifeste sur le plan comportemental par l'abandon de certains comportements normaux et l'expression de comportements anormaux (Seksel, 2009) permettant à l'animal d'éviter la source douloureuse ou de la limiter. En règle générale, les espèces proies comme les ruminants, pour ne pas se rendre vulnérables aux attaques des prédateurs, expriment moins de modifications comportementales que les espèces prédatrices comme le chien (Seksel, 2009). Ces modifications comportementales varient au cours du temps pour un même animal et en fonction de l'individu dans une espèce donnée. Elles peuvent également être modulées par les mécanismes d'analgésie endogène et par des états physiologiques particuliers, comme la gestation et la mise bas (Le Neindre et *al.*, 2009).

Bien que chaque espèce ait une expression comportementale qui lui est propre, il y a des signes comportementaux communs à différentes espèces de mammifères (chevaux, ruminants, carnivores domestiques, rongeurs et lagomorphes). Ainsi, la douleur peut induire chez tous les mammifères (Prunier et *al.*, 2013) :

- (i) **des modifications à la réponse à la manipulation** comme des mouvements de retrait pour protéger la partie du corps lésée.
- (ii) **des modifications de postures** (postures antalgiques, difficulté à se coucher...) et/ou **d'activités** (augmentation de l'agressivité, léchage ou mordillage de site douloureux, changement fréquent de position, apathie, agitation...)
- (iii) **des modifications d'expressions faciales**
- (iv) **une modification de la locomotion** comme la boiterie et le retrait du membre en cas de tentative de manipulation
- (v) **une modification des vocalisations**
- (vi) **une diminution de la prise alimentaire**

Tableau 4: modifications comportementales chez les rongeurs (Wenger 2012 ; Miller et Richardson 2011 ; Sotocinal et al., 2011 ; Langford et al., 2010.) et lagomorphes (Morton Griffiths 1985)

Items	Comportements
Posture	➤ Posture recroquevillée ➤ Dos voussé ➤ Boiterie ➤ Abdomen au sol ou levreté
Pelage	➤ Augmentation ou diminution de la toilette ➤ Arrachage de poils au niveau de la zone douloureuse ➤ Piloérection
Comportement social	➤ Isolement ➤ Aggressivité chez un animal docile ➤ Cris ➤ Apathie ➤ Sursaut
Comportement alimentaire et signes cliniques digestifs	➤ Dysnorexie ou anorexie ➤ Ingestion de corps étrangers ➤ Production de fèces plus petites, en moins grande quantité
Expressions faciales (rongeurs)	➤ Rétrécissement des orbites oculaires (Orbital tightening) avec fermeture partielle des paupières et yeux plissés. ➤ Renflement du nez (Nose bulge) chez la souris ou Aplatissement du nez et des joues (Nose/Cheek flattening) chez le rat ➤ Modification du positionnement des oreilles (Ear position) orientées vers l'arrière. ➤ Changement de position des vibrisses (Whisker change) qui peuvent être regroupées vers l'arrière ou hérissées en avant.

2. Illustration chez différentes espèces

Chez les carnivores domestiques (chat et chien), les modifications comportementales sont assez visibles car ce sont des espèces prédatrices. On peut donc observer l'apparition de comportements inhabituels comme (i) une **modification des postures** (postures antalgiques comme un animal ayant le dos voussé) (Mathews 2014) des **expressions faciales** (dilatation des pupilles, oreilles basses), (ii) une modification de l'**attitude** avec une excitation, agitation ou au contraire une prostration voir une léthargie, (iii) une **modification des vocalisations** (gémissements, plaintes, grognements, feulements). (Mathews 2014) (iv) une **diminution de l'appétit** et (v) une **modification des interactions avec l'homme** (indifférence, agressivité). Chez le chat le ronronnement synonyme pour les propriétaires de bien être de leur chat est très controversé car un chat peut ronronner en cas d'extrême douleur et peut continuer pratiquement jusqu'à sa mort. De plus, chez le chat on peut observer une disparition du comportement de toilettage ce qui induit une altération de la qualité du pelage (Junot, 2005).

Les rongeurs et lagomorphes peuvent modifier leurs postures en adoptant par exemple une posture recroquevillée, un dos voussé (Flecknell, 1994). Leur niveau d'activité peut être réduit avec une immobilité fréquente et ils peuvent présenter une diminution des comportements normaux comme grimper, s'étirer ou se gratter (Flecknell, 1994). Le comportement de l'animal vis-à-vis de l'homme peut changer et là où habituellement ils tentent d'échapper aux manipulateurs ils peuvent devenir apathiques et se laisser facilement attraper ou inversement des animaux dociles à l'origine qui en cas de douleur deviennent agressifs (Flecknell, 1994). L'apparence et le pelage peuvent également être modifiés comme par exemple une diminution du toilettage ce qui implique un poil mal entretenu, des souillures en région péri-anale, la présence d'un écoulement permanent autour des yeux, du nez et de la bouche (Flecknell, 1994).). Comme chez les autres espèces, la baisse de l'ingestion s'observe aussi chez les rongeurs pouvant entraîner par la suite une hypoglycémie et une déshydratation. Contrairement aux carnivores pour lesquelles les vocalisations ne sont pas spécifiques de douleur, chez le lapin, les vocalisations sont révélatrices d'un état de douleur aiguë et sévère ou de stress intense (Morton et Griffiths, 1985). Enfin les expressions sont modifiées chez le lapin, les oreilles sont portées basses ou plaquées sur le dos ; une exophthalmie est fréquemment observée, chez les rongeurs. Langford (2010) décrit un rétrécissement des orbites oculaires, un aplanissement ou un renflement du nez et des joues et un changement de position des oreilles ou des vibrisses (Tableau 4).



Cliché de N. Cadec, CISCO

Figure 14: Comportements spécifiques liés à une douleur viscérale chez le cheval (Delattre 2016)

A : jument qui se roule suite à des adhérences abdominales/ **B** jument qui se tape le ventre avec son membre suite à une insuffisance hépatique / **C** Jument en colique qui se regarde les flancs

Certains comportements ou signes cliniques sont spécifiques de la localisation de la douleur. Ainsi Sanford (1986) observe par exemple (i) l'apparition d'un blépharospasme, d'une sécrétion lacrymale plus ou moins accompagnés d'une photophobie lors de douleur oculaire (ii) un secouement de la tête lors de douleur auriculaire (iii) une salivation, une perte d'appétit et un grattage de la face sur le sol ou avec la patte lors de douleur au niveau de la cavité buccale.

Chez le cheval, les indicateurs comportementaux peuvent être non spécifiques ou spécifiques de la zone douloureuse. Concernant les indicateurs comportementaux non spécifiques (Ashley et *al.*, 2005), on observe une modification des expressions faciales (Regard fixe, naseaux dilatés et mâchoires contractées (Taylor et *al.*, 2002), l'apparition d'une agressivité envers l'homme ou ses congénères (Juarbe et *al.*, 1998 ; Dupreez, 2002) ainsi qu'une modification de l'attitude générale (augmentation de la nervosité) et de la locomotion (raideurs, refus de bouger) (Fleming, 2002 ; Price et *al.*, 2003).

Concernant les indicateurs comportementaux spécifiques de la zone douloureuse, on différencie les indicateurs représentatif (i) d'une douleur abdominale comme par exemple un cheval qui se roule, se tape le ventre, se regarde les flancs, s'étire, hennit et grogne (Figure14) (ii) d'une douleur musculo-squelettique comme par exemple un cheval qui passe son poids du corps d'un membre sur un autre membre, refuse de se déplacer (iii) d'une douleur dentaire comme par exemple l'apparition de morsures anormales.

Les ruminants, comme les autres espèces, modifient leur comportement suite à la perception d'une douleur afin de se soustraire de la source de douleur ou de limiter le ressenti. Néanmoins, les ruminants étant des espèces proies leurs modifications comportementales sont plus subtiles et moins visibles que chez des prédateurs comme les carnivores domestiques. Lors de l'application d'un stimulus nociceptif, l'animal peut se soustraire de la source de douleur en adoptant un comportement d'évitement ou de fuite, ou des tentatives d'évitement et de fuite s'il est contenu. Pendant une castration chirurgicale, des veaux expriment des comportements de lutte, vocalisent et donnent des coups de pieds (Coetzee, 2013). De la même façon lors d'une castration effectuée avec une pince, les veaux sont plus agités, piétinent : cela peut être considéré comme une tentative d'échappement au stimulus (Robertson et *al.*, 1994). Pendant une biopsie du foie effectuée avec une anesthésie locale mais sans analgésie, les vaches sont plus agitées et effectuent plus de mouvements de la tête (Mølgaard et *al.*, 2012).

Tableau 5: Modifications comportementales chez les ruminants

Items	Comportements
Position et/ou mouvement au niveau de la tête Expressions faciales modifiées	➤ Position de la tête (horizontal, en bas, diagonale) ➤ Position oreilles (en avant, en arrière, intermédiaire) ➤ Mouvement des oreilles, de tête (secouement, frottement) ➤ Léchage museau, des lèvres, du corps ➤ Extension de l'encolure ➤ Protrusion de la langue ➤ Tête portée basse dans le prolongement de l'encolure ➤ Sécrétion excessive de salive (ptyalisme) ➤ Crainte de la lumière (photophobie) ➤ Difficulté à manger (dysphagie) ➤ Inappétence ➤ Fermeture répétitive des paupières (blépharospasme) ➤ Écoulement anormal des larmes (épiphora)
Position et/ou mouvements du corps,	➤ locomotion, ➤ Immobilité tonique ➤ Posture antalgique (Dos vouté) ➤ Augmentation des transitions debout/couché ➤ Modification des positions debout ou couché ➤ Signes de coliques (agitation, piétinement, auto-auscultation, coups de pieds à l'abdomen, alternance coucher / relever)
Position et/ou mouvements et/ou aspects des pattes	➤ Positions des pattes en arrière ➤ Donne des coups de pieds ➤ Piétinement ➤ Boiterie intense ➤ Station debout difficile ➤ Réticence au déplacement ➤ Port de pied en pince ➤ Font musculaire du membre soulagé
Position et/ou mouvement de la queue	➤ Mouvement de la queue ➤ Queue plaquée (base de la queue contre pis)
Comportement social (envers congénères et/ou homme)	➤ Agressif envers congénères ➤ Regarde ou renifle ses congénères ➤ Perturbé par l'homme ➤ Isolement
Vigilance	➤ Vigilance (réactivité au bruit) ➤ prostration, Etre au ralenti
Budget temps	➤ Temps passé couché, debout, à manger, à ruminer
Activités	➤ Vocalisation (nombre, durée, intensité et composante spectrale des cris) ➤ Comportement auto-dirigé (regarde la blessure, lèche la plaie) ➤ Baisse de l'alimentation ➤ Stéréotypie ➤ Modification rumination (baisse ou irrégularité) ➤ Flehmen ➤ Grincement des dents (bruxisme)

Dans les heures ou les jours qui suivent l'application du stimulus, l'animal modifie certaines activités générales et/ou adopte des postures/mouvements antalgiques afin de limiter la douleur (Prunier et *al.*, 2013). Concernant les modifications d'activité de l'animal, certains auteurs ont montré des modifications du budget temps suite à une intervention douloureuse. Par exemple, suite à une biopsie hépatique les vaches passent plus de temps debout que les témoins (266 ± 137 s vs 168 ± 77 s) (Mølgaard et *al.*, 2012). Le 1er jour suivant une césarienne réalisée uniquement sous anesthésie locale et sans prise en charge de la douleur en post-opératoire, Kolkman (2010) montrent que les vaches changent plus souvent de posture debout/couchée (nombre de transition : 5.5 ± 2 vs 3.7 ± 0.9) et passent plus de temps couchées (80 ± 32.4 min vs 39.5 ± 41.2 min) que des vaches ayant vêlées par voie naturelle. Les animaux peuvent également adopter des postures antalgiques. Par exemple, dans le cas de boiteries, les bovins voussent le dos, écartent leurs membres et reportent leurs poids du corps du membre douloureux sur un autre membre (Yunta et *al.*, 2012) (Tableau 5).

Les animaux qui ressentent une douleur peuvent également répéter certains mouvements comme par exemple des comportements dirigés vers la zone douloureuse tels que le léchage ou le grattage de la zone douloureuse. Sur une période d'1h après une castration effectuée sans anesthésique ni analgésique, les agneaux se lèchent plus souvent la plaie que les agneaux non castrés (nombre de léchage : 1.8 vs 0) (Paull et *al.*, 2012).

Les animaux peuvent également modifier leurs interactions sociales en s'isolant des congénères ou en devenant plus agressif vis-à-vis d'eux ou de l'homme. L'ensemble de ces comportements montre que les animaux évitent de stimuler les zones douloureuses et/ou cherchent à les soulager (Prunier et *al.*, 2013). Certaines modifications comportementales ou signes cliniques vont être spécifiques d'un type particulier de douleur comme par exemple (i) la photophobie est révélatrice d'une douleur oculaire (conjonctivite, uvéite) (ii) la dysphagie, le ptyalisme orientent le diagnostic vers une atteinte de la sphère oropharyngée (fracture de la mâchoire, gingivite, stomatite, ...).

3. Avantages - Inconvénients

Les critères comportementaux de la douleur présentent de nombreux avantages car ils sont non invasifs, non coûteux, assez sensibles et faciles d'utilisation. Néanmoins seules les postures antalgiques semblent être spécifiques d'une douleur. En outre, ces indicateurs comportementaux présentent certains inconvénients liés en particulier aux fortes variabilités interindividuelle, interspécifique et entre contextes (Short, 1998). Il est donc indispensable de

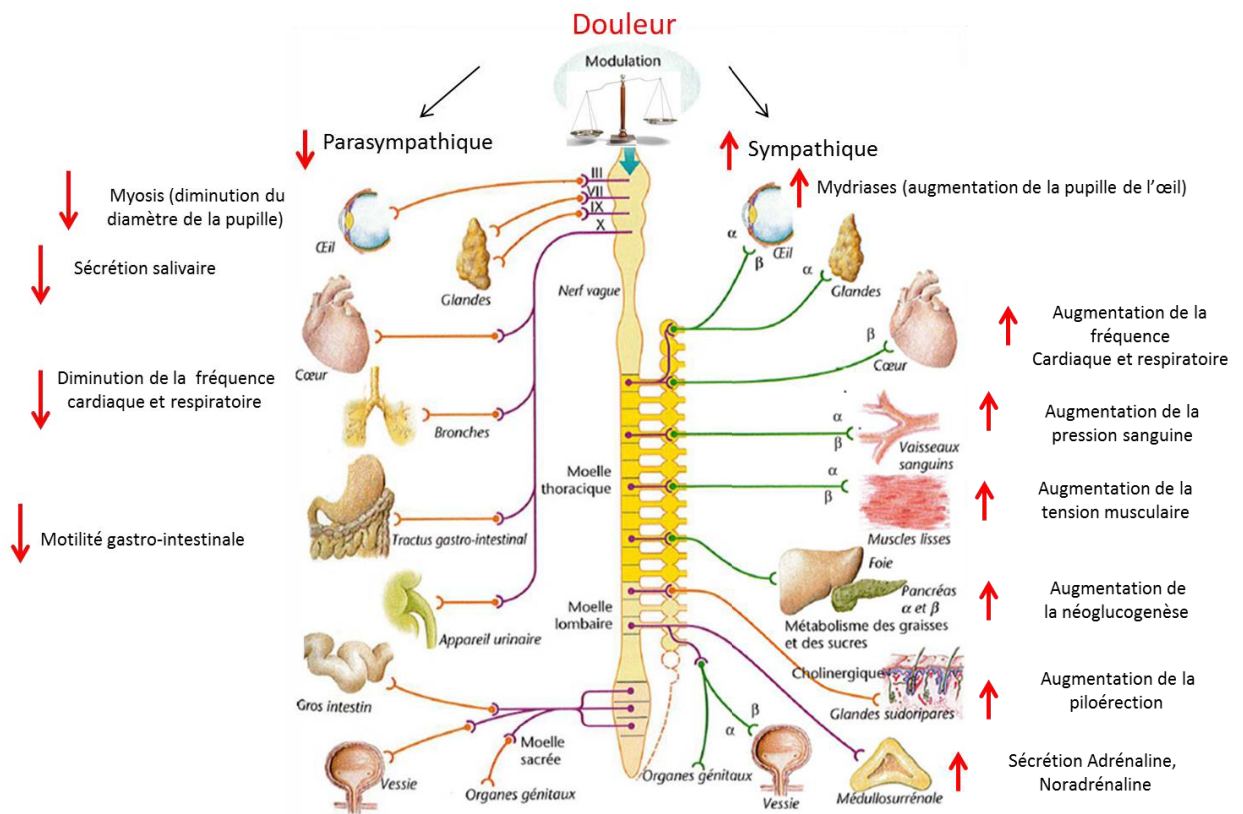


Figure 15 : Modification du Système Nerveux Autonome en situation de douleur d'après Silbernagl et *al.*, 2008.

mettre au point des protocoles rigoureux d'un point de vue scientifique pour éviter les biais expérimentaux. Finalement, les modifications comportementales sont fréquemment utilisées, aussi bien par les scientifiques, les éleveurs que par les vétérinaires praticiens, pour mettre en évidence la douleur animale (Short, 1998).

B. Modifications physiologiques et métaboliques

Les modifications physiologiques et métaboliques rapportées dans la littérature sont essentiellement liées à l'activité du système nerveux autonome qui lui-même est dérégulé dans des situations de stress ou de douleur.

1. Présentation des indicateurs

a. Le système nerveux autonome

Le **système nerveux autonome** est constitué par i) le système sympathique dont les signaux synaptiques sont principalement cholinergiques (acétylcholine) et adrénergiques (noradrénaline), ii) le système parasympathique dont les signaux synaptiques sont strictement cholinergiques (acétylcholine). La plupart des organes sont innervés par les fibres de ces deux systèmes qui jouent un rôle essentiellement activateur pour le système sympathique et inhibiteur pour le système parasympathique. A l'état basal, il existe un équilibre entre ces deux systèmes. En cas de stress ou de douleur le système sympathique est plus actif permettant à l'organisme de réagir et de se défendre. Ce déséquilibre induit des réponses physiologiques et métaboliques comme l'augmentation des fréquences cardiaques et respiratoires, l'augmentation de la néoglucogenèse, la diminution de la motilité intestinale ainsi que l'apparition de sudation, de piloérection et de mydriase (Figure 15).

Les modifications de la fréquence cardiaque peuvent être évaluées par la mesure de la variabilité de cette fréquence (HRV) au travers différents indicateurs comme le RMSSD (racine carrée des intervalles entre battements), l'intervalle R-R (intervalle entre deux battements consécutifs) ou encore le rapport LF / HF qui traduit l'équilibre sympatho- vagal. (Stubsj en et *al.*, 2015).

b. L'axe hypothalamo-hypophysaire-surr alien

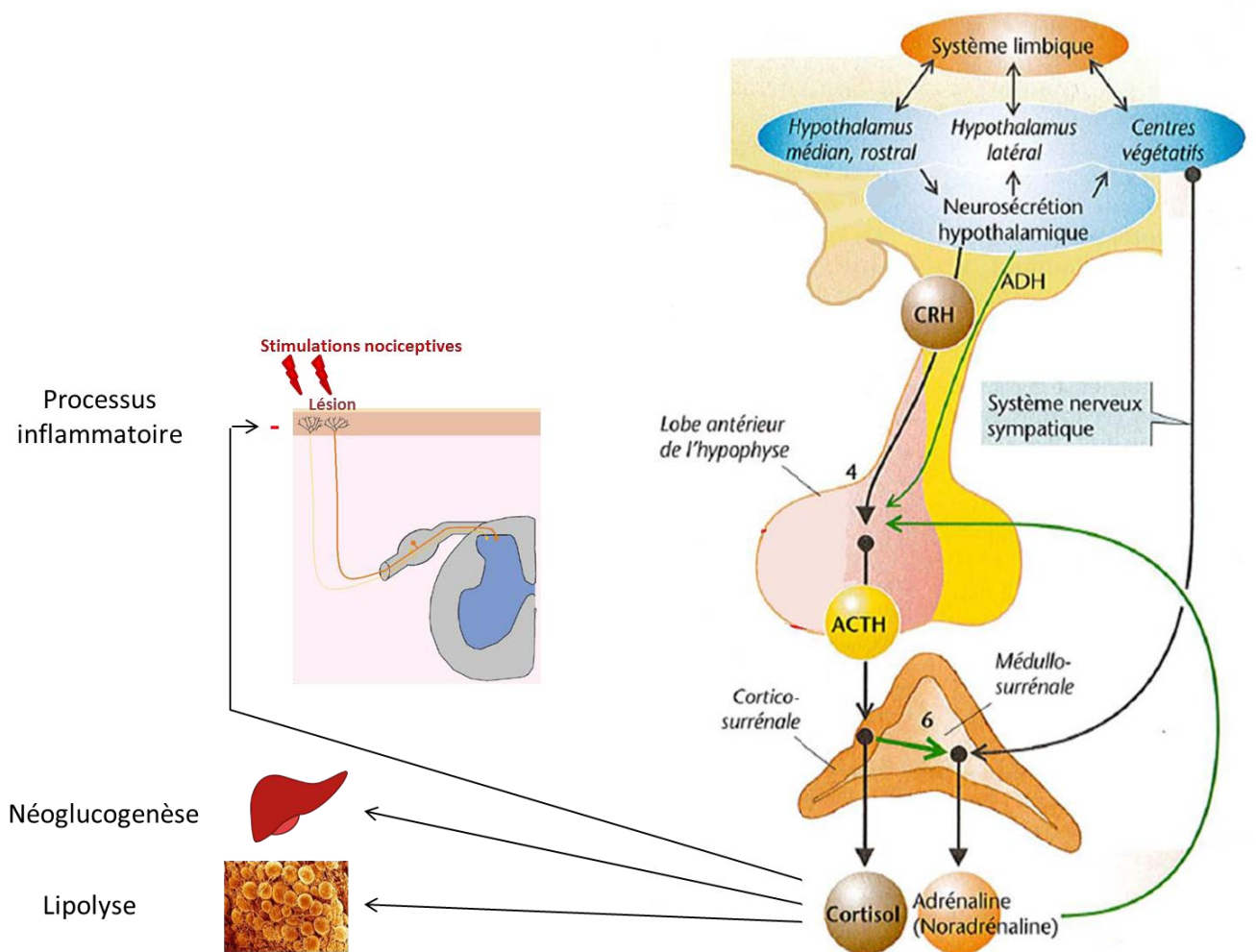


Figure 16: L'axe hypothalamo-hypophysaire et ses conséquences d'après Silbernagl et *al.*, 2008

La corticolibérine libérée par l'hypothalamus va stimuler l'hypophyse qui à son tour va libérer l'hormone adrénocorticotrope (ACTH). L'ACTH va ensuite aller stimuler les glandes surrénales qui secréteront le cortisol. Le cortisol exerce un rétro négatif sur l'hypothalamus et l'hypophyse. Le cortisol agit sur :

- Sur le métabolisme glucidique (stimule néoglucogénèse = stimule glucose sanguin à partir des réserves en glycogène hépatiques), il diminue la captation du glucose par les transporteurs
- Sur le métabolisme des lipides en stimulant la lipolyse
- Sur l'inflammation par une action anti-inflammatoire en favorisant le retour des lymphocytes et des polynucléaires dans les organes immunitaires. Il agit également sur les lymphocytes T et B en favorisant leur apoptose et il diminue la production de cytokines et d'interleukines
- Au niveau cutané en retardant la cicatrisation des plaies en stimulant la synthèse des enzymes de dégradation de la matrice extracellulaire et en inhibant les gènes codants pour le collagène

L'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien est également activé lors d'une situation douloureuse (Prunier et *al.*, 2013). Son activation conduit à une cascade de production d'hormones par l'hypothalamus, l'hypophyse et les glandes surrénales. La corticolibérine libérée par l'hypothalamus stimule l'hypophyse qui à son tour libère l'hormone adrénocorticotrope (ACTH). L'ACTH stimule ensuite les glandes surrénales qui, en réponse secréteront le cortisol. Le cortisol peut également exercer un rétrocontrôle négatif sur l'hypothalamus et l'hypophyse. Le cortisol déclenche les nombreuses réponses métaboliques habituellement décrites dans des situations de stress ou de douleur. Ainsi, le cortisol augmente la néoglucogénèse et le catabolisme protéique et lipidique modifiant les concentrations plasmatiques en glucose, lactate et en acides gras non estérifiés (AGNE) (Otto et Short, 1998). Le cortisol diminue l'inflammation (en favorisant entre autre le retour des lymphocytes et des polynucléaires dans les organes immunitaires) et l'absorption intestinale du calcium. (Figure 16).

c. L'inflammation et le stress oxydant

Suite à des situations douloureuses liées à des atteintes tissulaires aiguës ou chroniques d'origine inflammatoire, lésionnelle ou infectieuse, l'organisme met en place des processus de réparation visant essentiellement à contrôler l'inflammation et à cicatrifier les tissus lésés. La réponse de l'organisme inclut la production d'espèces réactives oxygénées (ERO), de cytokines et d'autres médiateurs comme le facteur de coagulation et les protéines de la phase aiguë de l'inflammation par exemple. L'inflammation est caractérisée par la formation d'œdème, de rougeur, de chaleur et par l'apparition de douleurs. Le processus inflammatoire comporte trois phases : une phase d'initiation permettant d'alerter l'organisme d'un danger en activant les nocicepteurs, une phase d'amplification à l'origine des phénomènes de sensibilisation périphérique et centrale et une phase de réparation permettant la cicatrisation des tissus lésés. (Figure 17).

La phase d'initiation. Suite à la lésion tissulaire, Le processus inflammatoire se met en place et les nocicepteurs sont activés et sensibilisés par les ions hydrogènes (H^+), l'adénosine triphosphate (ATP), la bradykinine, prostaglandines, histamine et sérotonine. Au cours de la phase d'initiation, diverses substances sont libérées par les cellules lésées et par les cellules inflammatoires (Paulmier et *al.*, 2015). Les cellules phagocytaires comme les macrophages libèrent des ERO permettant une action bactéricide locale. La production de ces radicaux oxygénés, dangereux pour l'organisme à forte concentration, est contrôlée par les antioxydants endogènes comme le glutathion. Le glutathion en passant de sa forme réduite

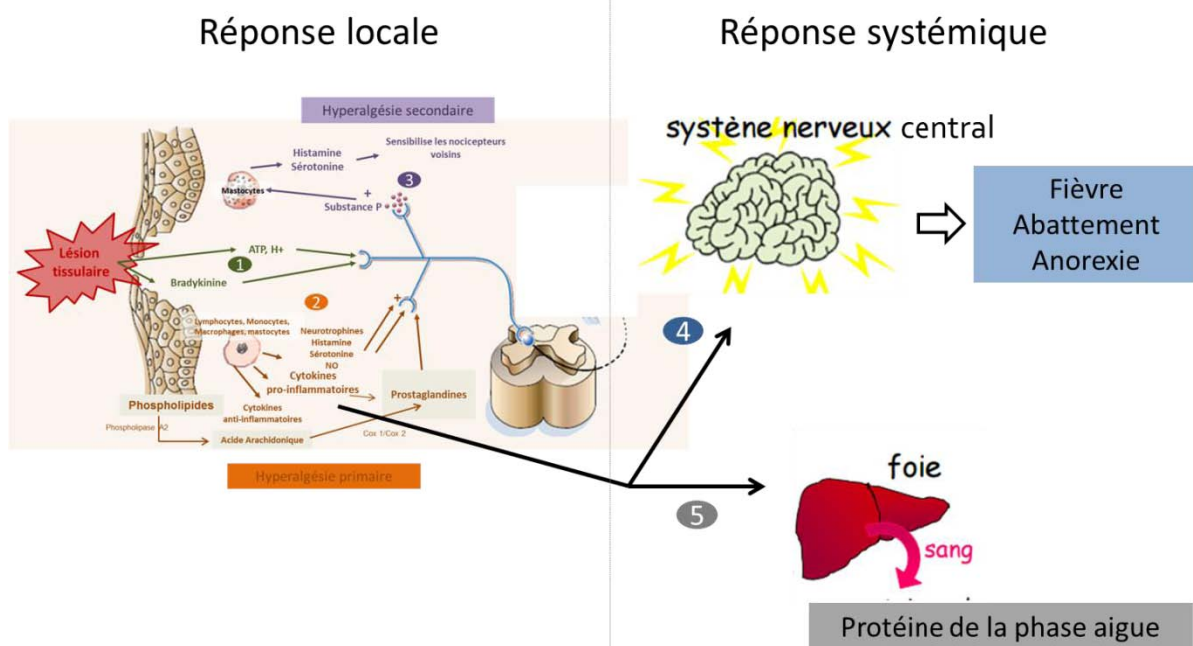


Figure 17 : Réponses locale et systémique du processus inflammatoire

Les cytokines pro-inflammatoires ont une action locale et peuvent agir à distance, sur le système nerveux central induisant de la fièvre et sur le foie conduisant à la production de protéine de la phase aigue comme par exemple l'haptoglobine ou l'amyloïde A sérique (SAA). La SAA est un marqueur très précoce de l'inflammation aiguë chez différentes espèces comme le bovin, le cheval ou le porc et elle a pour rôle principal d'inhiber la prolifération des lymphocytes. L'haptoglobine est un marqueur protéique de l'inflammation chez les ruminants, le porc ou le cheval. Elle a pour rôles (i) d'éliminer le fer de l'hémoglobine libre circulante en vue de protéger l'hôte contre son activité oxydative (ii) de limiter la synthèse des prostaglandines.

(GSH) à sa forme oxydée (GSSG) stabilise les ERO. Ainsi, le rapport GSH/GSSG peut-être un indicateur indirect du processus inflammatoire (Gladine, 2006).

La phase d'amplification. La bradykinine, les prostaglandines, l'histamine et la sérotonine induisent la sensibilisation des nocicepteurs au niveau des tissus lésés qui se caractérise par la baisse de leur seuil de dépolarisation et caractérise l'hyperalgésie primaire. L'inflammation peut également induire la sensibilisation des tissus sains autour du site lésé et donc l'hyperalgésie secondaire ou neuro-inflammation. En effet, des neuropeptides comme la substance P, présente dans les ganglions rachidiens, peuvent être libérés au niveau du site de la lésion ainsi qu'à la périphérie de la lésion initiale et induire la sensibilisation des fibres nerveuses appartenant au tissu non lésé (Le Bars et Willer, 2004).

La phase de réparation. Au cours du processus inflammatoire, les cytokines anti-inflammatoires (interleukines 10) et pro-inflammatoires (interleukines de type 1, 6 et 8, TNF α) agissent d'une part de façon paracrine au niveau du site inflammatoire puis certaines cytokines comme l'interleukine 6 agissent au niveau du foie pour augmenter la production des protéines de phase aiguë positive (APP+) et diminuer la synthèse des protéines de phase aiguë négative (APP-) (Petersen et al., 2004). Parmi les APP+, on peut citer la protéine C-réactive (CRP), la substance amyloïde A (SAA), l' α -1 glycoprotéine (AGP) et l'haptoglobuline (Hp). Les APP- sont principalement représentées par l'albumine et la transferrine. Les APP+ se distinguent selon 3 catégories (i) les concentrations des APP+ majeurs sont multipliées par 10 à 1000 et atteignent un pic entre 24 et 48 h suite à un stimulus inflammatoire (ii) les concentrations des APP+ intermédiaires sont multipliées par 5 à 10 et leur pic se situe du 2ème au 3ème jour après le stimulus inflammatoire (iii) les concentrations des APP+ mineures sont multipliées par deux lors d'un processus inflammatoire.

2. Modifications physiologiques et métaboliques lors de douleur chez les mammifères

Chez les carnivores domestiques, plusieurs études montrent (i) une augmentation des taux plasmatiques d'adrénaline, de noradrénaline et de la cortisolémie suite à des interventions chirurgicales comme l'onyxectomie (Benson et al., 1991) et l'ovario-hystérectomie (Smith et al., 1996) chez le chat et des chirurgies orthopédiques et thoraciques chez le chien (Hendrix et al., 1996 ; Popilskis et al., 1991 ; Pibarot et al., 1997) (ii) une diminution de ces concentrations avec la mise en œuvre d'un traitement analgésique. Chez les carnivores

domestiques, les protéines de phase aigue qui varient le plus dans des situations inflammatoires sont la SAA et la CRP suite à des pathologies infectieuses expérimentales chez le chien. En ce qui concerne les paramètres physiologiques (Fréquence cardiaque FC, fréquence respiratoire FR, pression artérielle PA, la pâleur des muqueuses ou la baisse de l'activité péristaltique) ils sont utilisés davantage en phase péri-opératoire, lorsque l'animal est anesthésié et qu'aucune des modifications comportementales ne peut être observée.

Néanmoins, chez les carnivores domestiques c'est le comportement qui est le principal outil de diagnostic pour reconnaître la douleur en clinique (Holton et *al.*, 2001; Brondani et *al.*, 2011).

Chez le cheval, la douleur induit une activation de l'axe sympathique du SNC ce qui a pour conséquences une augmentation de la fréquence cardiaque (tachycardie) et de fréquence respiratoire (tachypnée). La fréquence cardiaque d'un cheval adulte au repos est comprise entre 25 et 44 battements par minute. La mesure de la fréquence cardiaque peut se faire de manière non-invasive, à l'aide d'un stéthoscope, ou en utilisant des appareils d'enregistrement portables, qui permettent d'obtenir un électrocardiogramme en continu sur une longue période. L'augmentation de la fréquence cardiaque est rapportée lors de douleur aiguë suite à des douleurs orthopédiques ou des laparotomies (Bussieres et *al.*, 2008; Pritchett et *al.*, 2003). Néanmoins, la fréquence cardiaque peut être influencée par de nombreux paramètres comme l'âge, l'activité physique, le comportement du cheval, et le stress. Ce sont donc des paramètres peu spécifiques pour évaluer une douleur. D'autres indicateurs physiologiques sont utilisés chez le cheval mais leur mesure est plus compliquée à mettre en œuvre (prélèvement de sang ou de salive) et plus onéreuse.

L'activation de l'axe sympathique entraîne une augmentation du taux d'adrénaline et de noradrénaline et l'activation de l'axe hypothalamo-hypophysaire implique la sécrétion entre autre de glucocorticoïdes comme le cortisol. Chez le cheval l'APP+ majeure est la SAA, elle est utilisée dans le diagnostic de colique (Dondi et *al.*, 2015) ou lors de pathologies infectieuses (Pepys et *al.*, 1989). La thermographie permet de mesurer la température du corps sur une zone précise et est utilisée pour détecter une douleur musculosquelettique aigue (température du corps est augmentée) ou chronique (température du corps est diminuée).

Chez les ruminants, différents paramètres sont utilisés comme : (i) l'augmentation des concentrations en adrénaline et noradrénaline observables chez le veau lors de l'écornage (ii) la fréquence cardiaque, (Stewart et *al.*, 2008), la fréquence respiratoire, la pression artérielle ou encore la dilatation des pupilles (Hudson et *al.*, 2008). L'activation de l'axe hypothalamo-hypophysaire est également utilisé dans la littérature en particulier le cortisol comme indicateur de douleur et/ou de stress notamment dans le cadre de castration ou d'écornage (Stafford et Mellor, 2005). Ainsi, le taux de cortisol plasmatique peut être multiplié par 11 suite à une castration avec pose d'élastique chez des agneaux (Mellema et *al.*, 2006).

Ces modifications physiologiques induisent des modifications métaboliques. En effet, la stimulation de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien lors d'un événement douloureux, augmente la néoglucogenèse et le catabolisme protéique et lipidique modifiant les concentrations plasmatiques en glucose, lactate et en acides gras non estérifiés (AGNE) (Otto et Short, 1998). Chez les ruminants, L'haptoglobine est utilisée comme indicateur de l'inflammation permettant de mesurer la sévérité de la réponse inflammatoire chez les ruminants lors de pathologies ou suite à des chirurgies. Lors de pathologies respiratoires chez le bovin, la réponse de l'haptoglobine est corrélée à la sévérité des signes cliniques (Heegaard et *al.*, 2000). L'haptoglobine est également utilisée chez le bovin pour diagnostiquer les mammites et les métrites (Murata et *al.*, 2004 ; Petersen et *al.*, 2004 ; Ohtsuka et *al.*, 2001). Dans un contexte chirurgical, comme par exemple suite à une castration par ablation des testicules chez des taurillons, la concentration en haptoglobine 3 jours après l'intervention est 9 fois plus élevée que chez les animaux non opérés mettant ainsi en évidence une inflammation (Earley et Crowe, 2002).

3. Avantages - Inconvénients

Les indicateurs physiologiques sont très sensibles néanmoins ils présentent des inconvénients car (i) il peuvent aussi être activés lorsque l'animal ressent un stress émotionnel ou lorsqu'il est soumis à une activité physique importante (ii) ils ne permettent pas tous d'avoir un résultat instantané (iii) ils ne permettent pas de mettre en évidence les états de douleurs chroniques (iv) leur utilisation sur le terrain n'est pas simple et risque d'être onéreuse (Stafford et *al.*, 2002).

Tableau 6 : Conséquences zootechniques de la douleur chez les ruminants

	Causes douloureuses	Conséquences	Espèces	Références
GMQ	Écornage	Baisse de 1000 g de GMQ (24h après écornage) (avec kétoprofren vs sans kétoprofren)	veaux	Faulkner et Weary 2000
	Castration	Diminution du GMQ (castrés vs non castrés) (entre 0 et 7 jours après la castration)	veaux	Fisher et al., 1996 et 1997
	Écornage	Diminution du GMQ (avec méloxicam vs sans méloxicam)	veaux	Coetzee et al., 2012
Production laitière	Boiterie	Pertes de 80 à 350 kg/lactation	bovin	Fourichon et al., 1999
	Vêlage dystocique	Pertes de 100 à 700 kg/lactation	bovin	Fourichon et al., 1999
	Vêlage dystocique	diminution de 12 % de la PL	bovin	(Cattell and Dobson, 1990)
Reproduction	Boiterie	Réduction du taux de réussite de la première insémination artificielle (17,5 % pour des vaches présentant une boiterie, contre 42, 6% chez des vaches saines)	bovin	Melendez et al.,2003
	Boiterie Dystocie	Augmentation de 6 à 30 jours de l'intervalle vêlage-vêlage	bovin	Fourichon et al., 2000
	Maladies virales (FCO /FA)	Avortement ou mortalité nouveaux nés	ovin caprin	Le Maire 2011
	Electro-éjaculation	diminution marquée des teneurs sanguines en testostérone => diminution des quantités de sperme produite par ces animaux en comparaison de taureaux témoins	taureaux	Welsh & Johnson, 1981
	Chocs électriques répétés	28,5% des animaux n'ont pas de comportement de chaleur en rapport avec une insuffisance hormonale	génisses	Stoebel & Moberg, 1982
	Boiteries au cours des 70 premiers jours postpartum	vaches avec boiteries ont significativement moins de chances d'être gestantes que les non boiteuses	vache laitière	(Bicalho et al., 2007)

C. Modification des performances zootechniques

La douleur peut altérer les performances zootechniques des animaux si sa prise en charge est inexistante ou inadéquate. Ainsi, chez le ruminant, d'une façon générale, la douleur est associée à une diminution des capacités d'ingestion et une augmentation du catabolisme protéique et lipidique au détriment de l'anabolisme entraînant une baisse de production laitière ou de viande (mesuré par le gain de poids) (Le Neindre et *al.*, 2009) (Tableau 6).

Dans la littérature, l'impact de diverses pathologies sur les pertes zootechniques est assez bien démontré, en particulier en élevage laitier. En effet, les boiteries ou les déplacements de caillette, qui sont connues pour être très douloureuses, diminuent la production laitière de 0.3 à 2.5 kg/jour (Fournichon et *al.*, 1999). Les animaux atteints de boiterie présentent en effet une réduction de l'ingestion, de la production laitière et de la fertilité. Les vêlages difficiles (vêlage dystocique, de douleur élevée), induisent une diminution de 12 % de la production laitière (Cattell et Dobson, 1990). La présence de kystes ovariens, les rétentions placentaires, les métrites ou les boiteries sont associées à des retards de reproduction allant de 6 à 30 jours (Fournichon et *al.*, 2000).

Les boiteries selon leur degré de sévérité, diminuent l'ingestion de 3% à 16%, diminuent la production laitière de 5 à 36%, augmentent l'intervalle vêlage-vêlage et le nombre de vaches réformées, induisant des pertes économiques allant de 5 € à 350 €. Ces impacts sur la reproduction peuvent s'expliquer par la diminution de la sécrétion de LH due aux phénomènes algiques chroniques induisant le blocage de l'ovulation (Dartevelle, 2014) (Figure 18).

Pour l'éleveur, les pertes économiques associées à une maladie se décomposent en (i) coût direct lié à la baisse de la production laitière, à la perte de lait et aux frais vétérinaires (ii) coût indirect liés aux pénalités de paiement du lait et aux pertes de temps (traite sur pot, traitement, surveillance...) lors de la traite (estimées à 4h par mammites jusqu'à sa guérison). Ainsi, Fournichon évaluait en 2001 le coût d'une mammites à 79€/ vache laitière /an. Aujourd'hui, selon l'Institut de l'Élevage, les mammites induirait un coût de 230 €/ vache laitière /an. Toutefois, il est souvent assez complexe d'attribuer précisément l'altération des performances à la maladie ou à l'intervention elle-même ou bien à la douleur associée.

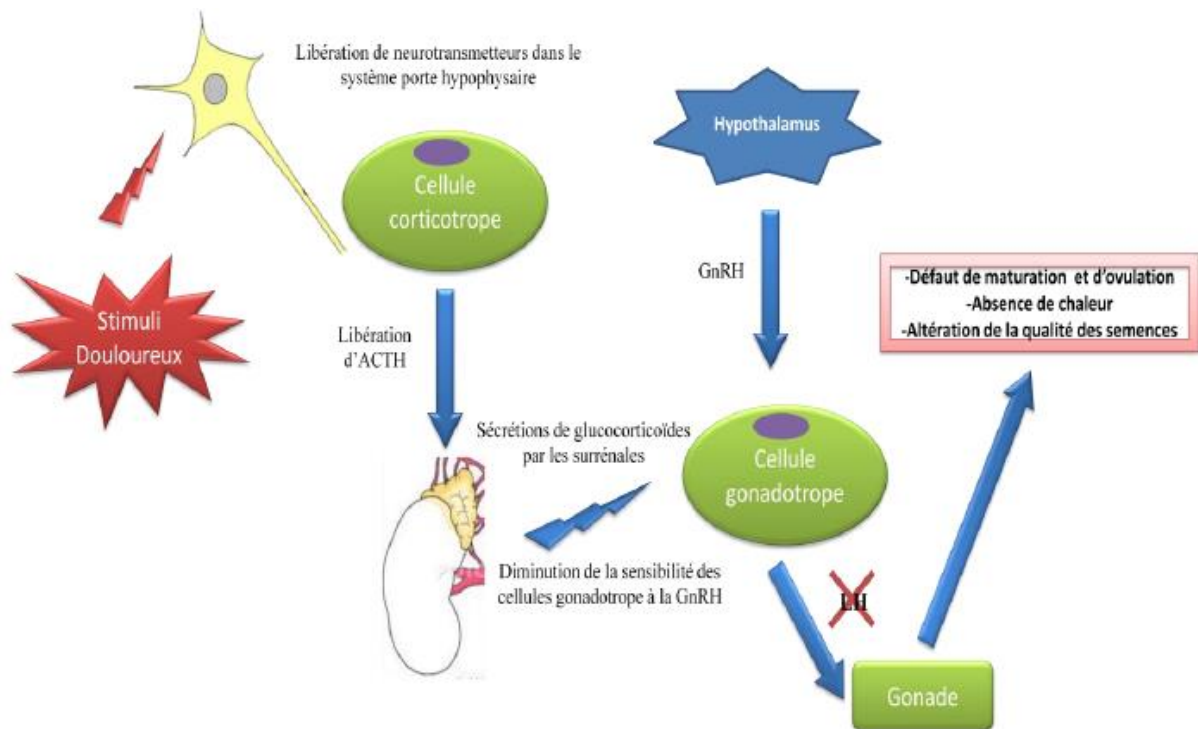


Figure 18 : Mécanismes physiologiques des conséquences de la douleur sur la reproduction (Dartevelle, 2014).

Au cours des processus douloureux, les glucocorticoïdes diminuent la sensibilité des cellules gonadotropes à la GnRH ce qui a pour conséquence une diminution de la sécrétion de LH et donc une altération de la fertilité.

Quelques études se sont intéressées aux liens entre prise en charge de la douleur des animaux et performances. Des études assez anciennes n'avaient pas permis de mettre en évidence de relation douleur-performance. Ainsi, Faulkner (1992) n'a pas mis en évidence d'amélioration du GMQ et/ou de l'ingestion entre les veaux castrés avec un protocole d'analgésie (Butorphanol + Xylazine) et les veaux placebo. Par contre, il montre une diminution du GMQ des veaux castrés par rapport aux veaux non castrés entre 0 et 21 jours. Aucun impact de l'écornage n'a été montré sur la prise alimentaire et le GMQ entre 0 et 7 jours après l'écornage chez des veaux (Grondahl-Nielsen et *al.*, 1999). En revanche, plus récemment, de nouvelles études semblent montrer un effet bénéfique de la prise en charge de la douleur sur les performances zootechniques. Ainsi une anesthésie locale chez le veau lors de castration permet de limiter la diminution du GMQ comparativement à la castration sans prise en charge de la douleur (Earley et Crowe, 2002). De plus, le GMQ mesuré entre 0 et 56 jours chez des veaux âgés de 9 à 14 mois est inférieur lors de castration à l'aide d'une bande par rapport à la castration chirurgicale (Fischer et *al.*, 1996). Enfin, les veaux écornés par coupe de corne avec analgésie (méloxicam) ont un GMQ plus important que les veaux écornés sans analgésie (Coetzee, 2011).

L'altération des performances zootechniques peut être utilisée pour détecter une douleur, néanmoins c'est un indicateur peu sensible pouvant apparaître tardivement par rapport à l'apparition de la douleur. Il est également peu spécifique car les performances zootechniques peuvent être altérées lors d'un stress (Le Neindre et *al.*, 2009) néanmoins il est non invasif et est un bon argument en faveur de la gestion (Bath, 1998).

En résumé :

Il apparaît comme de plus en plus évident, aussi bien pour les éleveurs que chez les vétérinaires, qu'il est éthiquement et économiquement important de considérer la valence antalgique des traitements proposés dans toutes les pathologies ou interventions sensées être douloureuses.

Pour une prise en charge optimisée et adaptée de la douleur chez les animaux de rente, il faut disposer d'outils fiables, applicables sur le terrain et peu coûteux. Nous avons vu au travers les chapitres précédents que la douleur entraînait de nombreuses modifications comportementales, physiologiques et zootechniques, celles-ci pouvant être suivies grâce à de nombreux indicateurs plus ou moins invasifs.

Actuellement, il n'existe pas d'approches consensuelles utilisables chez les animaux dans différentes situations douloureuses qui permettent d'évaluer avec précision différents niveaux de douleur. Les échelles d'évaluation sont très espèces dépendantes et très pathologies ou interventions dépendantes.

Nous allons, dans le chapitre suivant, présenter les différentes échelles ou indicateurs utilisés chez les mammifères en se focalisant plus spécifiquement sur le ruminant.

Chapitre IV.

Evaluation de la douleur chez les mammifères

Figure 19 : Echelle Visuelle Analogique (EVA)

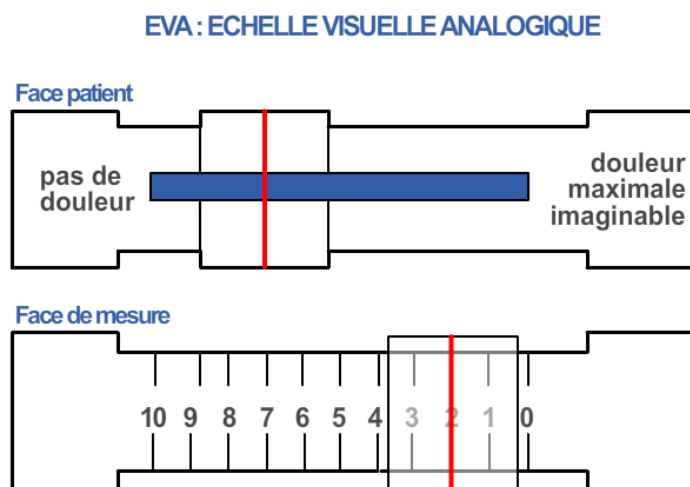
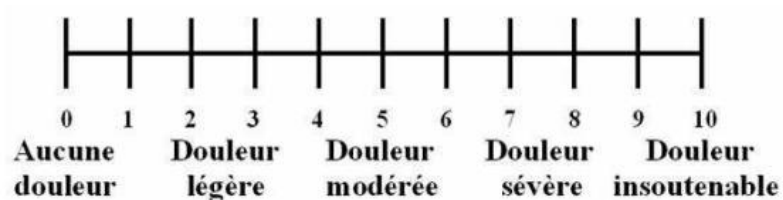


Figure 20 : Echelle Verbale Simple (EVS)

Pour préciser l'importance de votre douleur répondez en entourant la réponse correcte pour chacun des 3 types de douleur :

Douleur au moment présent :	0 absente	1 faible	2 modérée	3 intense	4 extrêmement intense
Douleur habituelle depuis les 8 derniers jours :	0 absente	1 faible	2 modérée	3 intense	4 extrêmement intense
Douleur la plus intense depuis les 8 derniers jours :	0 absente	1 faible	2 modérée	3 intense	4 extrêmement intense

Figure 21 : Echelle Numérique Simple (ENS)



Chapitre IV. Evaluation de la douleur chez les mammifères

En médecine humaine, l'évaluation de la douleur peut être effectuée par une « auto-évaluation » (douleur évaluée par le patient lui-même) sauf en pédiatrie ou en gériatrie. **Le frein principal à une évaluation satisfaisante de la douleur est le défaut de communication. Ainsi pour les personnes âgées et les jeunes enfants non communiquant, tout comme les personnes souffrant d'un quelconque déficit mental, le recours à une « hétéro-évaluation » (douleur évaluée par une autre personne) utilisant des échelles comportementales est indispensable.** Pour l'animal, la douleur ne peut être évaluée que de manière indirecte via une « hétéro-évaluation ».

A. Chez l'homme

1. Les échelles unidimensionnelles d'autoévaluation de la douleur

L'intensité de la douleur peut être évaluée par le patient grâce à différentes échelles unidimensionnelles permettant d'obtenir un score de douleur. Trois types d'échelle de douleur se distinguent: l'Echelle Visuelle Analogique (EVA), l'Echelle Descriptive Simple (EDS), l'Echelle Numérique (EN).

- **L'échelle visuelle analogique (EVA)** (Figure 19) : cette échelle est constituée par (i) une face verso (face du patient) qui comporte une ligne horizontale allant de « pas de douleur » à « douleur maximale imaginable » Le patient déplace le curseur le long de cette ligne pour indiquer son niveau de douleur (ii) une face verso qui permet d'indiquer le niveau de douleur ressenti par le patient. Cette échelle peut se présenter sous sa forme papier ou sous sa forme « mécanique », c'est-à-dire à type de règle, elle est simple d'utilisation et est rapidement expliquée au patient.

- **L'échelle verbale simple (EVS) ou descriptive simple (EDS)** (Figure 20) : c'est un barème numérique reliant différents comportements à différents scores. Elles sont constituées d'une liste de quatre à cinq qualificatifs (pas de douleur, faible, modérée, intense, extrêmement intense) classés dans un ordre croissant d'intensité, auxquels sont attribuées des valeurs numériques. Le patient choisit un qualificatif correspondant à l'intensité de sa douleur.

- **L'échelle numérique (EN)** (Figure 21): contrairement aux deux autres échelles, le patient attribue directement une note à sa douleur permettant également d'évaluer son intensité. Il existe plusieurs types d'échelles numériques, généralement avec une numérotation de 0 à 10 ou de 0 à 100, 0 étant l'absence de douleur et 10 ou 100 la douleur maximale.

2. Les échelles multidimensionnelles

Elles ont été développées en médecine humaine afin d'évaluer la douleur chez les patients communicants ou non communicants (nouveau-né, enfant, adulte, personnes âgées).

Les mécanismes de la douleur étant complexes et impliquant de nombreuses répercussions psychologiques, physiologiques et comportementales, les échelles unidimensionnelles ne permettent pas de prendre en compte ces répercussions.

Il est donc recommandé d'utiliser des échelles multidimensionnelles. Elles correspondent à une compilation d'échelles unidimensionnelles associées à différents descripteurs de la douleur. Elles regroupent des échelles de mots, des tests projectifs, des échelles comportementales et des échelles affectives. Les indicateurs de ces échelles sont associés à une définition précise et détaillée afin d'éviter au maximum toute ambiguïté d'interprétation et à des valeurs numériques permettant de quantifier leur intensité.

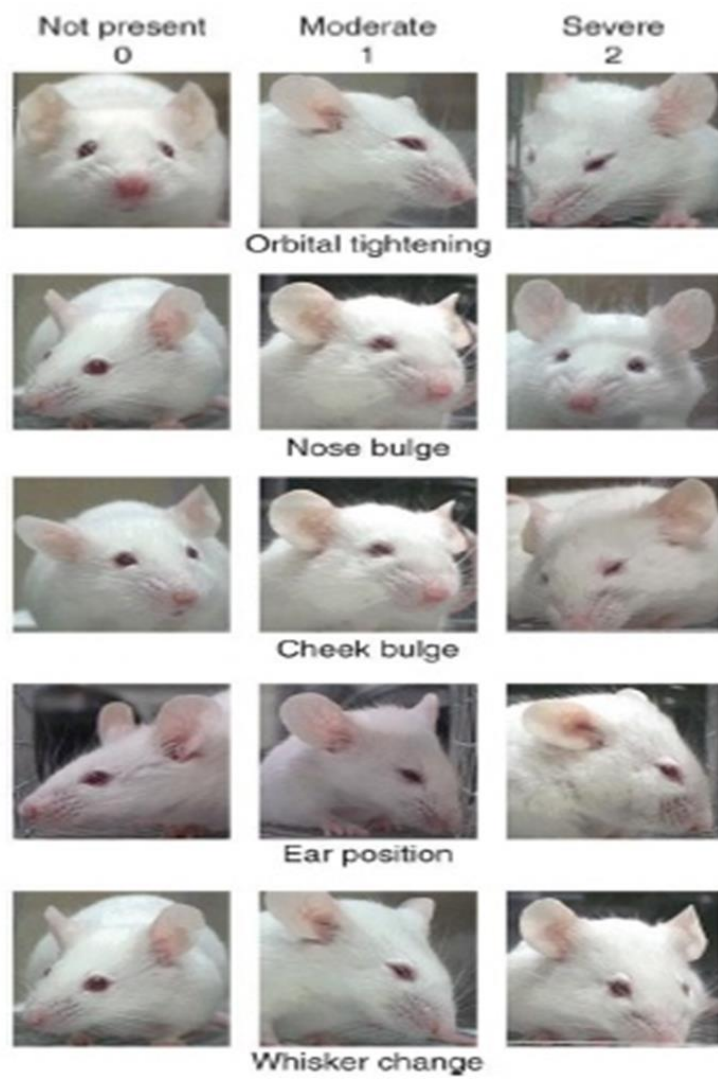
Ces échelles permettent d'aboutir à un score global de douleur, permettant d'adapter la thérapeutique antalgique au niveau de douleur. Pour être le plus sensible possible, ces échelles d'évaluation sont très spécifiques d'une catégorie de personnes et d'un type de douleur ou d'une situation douloureuse précise.

Nous allons retrouver les mêmes difficultés d'évaluation chez l'animal.

B. Chez l'animal

L'évaluation de la douleur chez l'animal ne peut être réalisée que par les propriétaires et /ou le vétérinaire et/ou l'éleveur. Ainsi les échelles développées chez l'homme non communiquant ont servi de modèle en médecine vétérinaire, où l'évaluation du comportement joue un rôle capital dans la reconnaissance de la douleur. La douleur induit dans un premier temps la disparition du comportement normal de l'animal puis l'apparition d'un comportement anormal. Les propriétaires des animaux de compagnies ou les éleveurs sont donc les plus à même de détecter la douleur car ils connaissent bien leurs animaux. Néanmoins, si détecter une modification du comportement de l'animal est relativement facile, évaluer le niveau de douleur ressenti par l'animal est plus difficile. Ainsi, pour palier à cette difficulté différentes échelles de douleur ont été élaborées. Ces échelles comportent des indicateurs comportementaux et/ou physiologiques et permettent (i) d'évaluer le niveau de douleur afin d'adapter le traitement antalgique (ii) de suivre l'évolution de la douleur et

Figure 22 : Echelle comportementale chez la souris « The Mouse Grimace Scale » (Langford et *al.* 2010)



d'estimer l'efficacité des soins en ré- évaluant régulièrement ce score au cours du temps ou après l'administration du traitement.

Après avoir mis en évidence la présence d'une sensation douloureuse, il est important pour le vétérinaire d'évaluer l'intensité de cette douleur afin de mettre en place une thérapeutique adaptée. Pour cela des outils développés chez l'homme et adaptés à l'animal sont à la disposition des vétérinaires comme les échelles unidimensionnelles permettant une estimation globale de l'intensité de la douleur et les échelles multidimensionnelles qui apprécient les différentes composantes de la douleur et permettent d'établir un score de douleur.

1. Echelles comportementales

Les échelles unidimensionnelles développées chez l'homme peuvent être utilisées via l'hétéro-évaluation chez l'animal comme l'échelle descriptive simple, l'échelle visuelle analogique et l'échelle numérique. Néanmoins elles ne sont pas validées pour un usage en médecine vétérinaire et présentent quelques inconvénients comme les biais liés à l'observateur pouvant sur- ou sous-évaluer la douleur ou une variabilité inter-observateurs lorsque plusieurs personnes évaluent un même animal (Holton et *al.*, 2001).

On retrouve dans la littérature des échelles numériques complexes destinées aux propriétaires sous forme de questionnaires qui comportent plusieurs sous-catégories de comportement qui font chacune partie du tableau clinique douloureux. L'utilisateur doit donner un score pour chaque catégorie de comportement. On aboutit alors à un score final qui est la somme des scores donnés dans chaque catégorie.

Chez le chien le questionnaire le Canine Brief Pain Inventory (CBPI) a été validé. Il permet au propriétaire d'évaluer l'intensité et les conséquences de la douleur chronique arthrosique chez leur chien.

Chez les rongeurs et lagomorphes, trois échelles comportementales basées sur les expressions faciales ont été développées pour les souris, les rats et lapins. Pour les souris, l'échelle nommée « Mouse Grimace Scale » est composée de quatre expressions faciales (position des oreilles, nez et paupières) et un faciès douloureux est observé suite à des stimuli nociceptifs de durée modérée (10 minutes à 4h) (Langford et *al.*, 2010) (Figure 22). La méthode a ensuite été adaptée aux rats en créant l'échelle « Rat Grimace Scale » présentant

Figure 23 : Echelle comportementale d'évaluation de la douleur chez le lapin « Rabbit Grimace Scale » (Keating *et al.*, 2012).



Figure 24 : Echelle comportementale d'évaluation de la douleur chez le cheval « Horse Grimace Pain Scale (HGS) » (Dalla Costa et *al.*, 2014).

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

comme différence avec celle établie chez la souris la modification de position des joues. Chez le lapin une grille a également été développée en utilisant comme indicateur la position des paupières, des joues, du nez et des moustaches (Keating et *al.*, 2012) (Figure 23).

Chez le cheval, l'échelle descriptive simple (EDS), qui relie un comportement observé à un score de douleur, a été développé pour évaluer le niveau de douleur lors d'une boiterie (Starshak 1987). Betley (1991) élabore une échelle de cotation numérique, composée de plusieurs indicateurs comportementaux, pour les douleurs liées aux coliques. Dalla Costa (2014) met en évidence la modification de certaines mimiques faciales (échelle de grimace faciale) et leur donne un score suivant leur intensité suite à une castration (Figure 24). Plus le score est élevé, plus le cheval est considéré comme «douloureux ». Ces échelles d'expressions faciales comprennent comme indicateurs la position des oreilles, la fermeture des paupières, la présence d'une tension au-dessus de la zone des yeux (crête osseuse temporelle (rochet et salière) clairement visible), les muscles de la mastication sont tendus, la bouche est tendue et le menton est prononcé, les narines sont tendues et le profil est aplati.

Chez les ruminants, De Oliveira (2014) et Gleerup (2015) établissent des échelles comportementales chez les bovins pour évaluer les douleurs post-opératoires (Figure 25). L'échelle de De Oliveira comporte comme indicateurs : la locomotion, les comportements interactifs avec les congénères, le niveau d'activité et le niveau d'appétit. Concernant l'échelle de Gleerup elle comporte la réaction de l'animal à l'environnement, les positions des oreilles et de la tête, les expressions faciales, les réponses de l'animal à l'approche et la présence d'un dos voûté. Chez le mouton, McLennan en 2016 développe une grille d'expressions faciales qui comporte des indicateurs similaires à ceux retrouvés pour les rongeurs et lagomorphes comme la contraction du muscle des joues, l'ouverture de la paupière, la position des oreilles et du nez. Cependant cette grille présente un nouvel indicateur qui est l'expression du profil de l'animal évaluée à travers la position de la mâchoire et des lèvres (McLennan et *al.*, 2016).

2. Echelle multiparamétrique

Des échelles multiparamétriques comportant à la fois des indicateurs comportementaux et physiologiques (voire zootechniques pour les ruminants) ont été développées chez l'animal

Figure 25 : Echelle comportementale d'évaluation de la douleur post-opératoire chez le bovin
« UNESP-Botucatu unidimensional pain scale » (De Oliveira et *al.*, 2014).

Item	Score/Criterion
Locomotion	• (0) Walking with no obviously abnormal gait. • (1) Walking with restriction, may be with hunched back and/or short steps. • (2) Reluctant to stand up, standing up with difficulty or not walking.
Interactive behaviour	• (0) Active; attention to tactile and/or visual and/or audible environmental stimuli; when near other animals, can interact with and/or accompany the group. • (1) Apathetic; may remain close to other animals, but interacts little when stimulated. • (2) Apathetic; may be isolated or may not accompany the other animals; does not react to tactile, visual and/or audible environmental stimuli.
Activity	• (0) Moves normally. • (1) Restless, moves more than normal or lies down and stands up with frequency. • (2) Moves less frequently in the pasture or only when stimulated.
Appetite	• (0) Normorexia and/or rumination. • (1) Hyporexia. • (2) Anorexia.
Miscellaneous behaviours	• Wagging the tail abruptly and repeatedly. • Licking the surgical wound. • Moves and arches the back when in standing posture. • Kicking/foot stamping. • Hind limbs extended caudally when in standing posture. • Head below the line of spinal column. • Lying down in ventral recumbency with full or partial extension of one or both hind limbs. • Lying down with the head on/close to the ground. • Extends the neck and body forward when lying in ventral recumbency. (0) All of the above described behaviours are absent. (1) Presence of 1 of the behaviours described above. (2) Presence of 2 or more of the behaviours described above.

Figure 26 : Echelle 4Avet multiparamétrique d'évaluation de la douleur post-opératoire chez le chat.



Utiliser la grille multicritère ci-dessous pour détecter et quantifier la douleur



Animal

Propriétaire

Date et heure

:	:	:	:

ÉCHELLE DE DOULEUR				
APPRÉCIATION GLOBALE SUBJECTIVE	Pas de douleur  Douleur intolérable	0 ☐	0 ☐	0 ☐
		1 ☐	1 ☐	1 ☐
		2 ☐	2 ☐	2 ☐
		3 ☐	3 ☐	3 ☐
ATTITUDE GÉNÉRALE	PARMI LES SYMPTÔMES SUIVANTS : • présente des modifications respiratoires • vousse le dos • reste figé en posture antalgique • s'agite, se plaint ou reste prostré au fond de la cage • ne se toilette plus • regarde, mordille ou lèche sa plaie • urine ou défèque sous lui • perd l'appétit - Aucun signe présent - 1 seul présent - 2 à 4 présents - 5 à 8 présents	☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ 0 ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐	☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ 0 ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐	☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ 0 ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐
COMPOTEMENT INTERACTIF	Est attentif et répond aux caresses, à la voix Répond timidement Ne répond pas immédiatement Ne répond pas ou répond de façon agressive	0 ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐	0 ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐	0 ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐
FRÉQUENCE CARDIAQUE Valeur initiale	≤ 10 % augmentation 11-30 % augmentation 31-50 % augmentation > 50 % augmentation ou non évaluable	0 ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐	0 ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐	0 ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐
RÉACTION À LA MANIPULATION DE LA ZONE OPÉATOIRE	Pas de réaction visible ou audible - après 4 manipulations Réaction(s) visible(s) ou audible(s) - à la 4 ^e manipulation - à la 2 ^e et 3 ^e manipulation - à la 1 ^{re} manipulation ou non évaluable	0 ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐	0 ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐	0 ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐
INTENSITÉ DE CETTE RÉACTION	Aucune réponse Répond faiblement, essaye de se soustraire Tourne la tête ou vocalise Tente de fuir ou d'agresser ou non évaluable	0 ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐	0 ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐	0 ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐
SCORE TOTAL	1 à 5 : douleur légère 6 à 10 : douleur modérée 11 à 18 : douleur sévère			

afin d'objectiver l'évaluation de la douleur. Elles permettent d'aider le vétérinaire à reconnaître et traiter la douleur de façon appropriée mais sont aussi de précieux outils de communication auprès des propriétaires, pouvant servir par exemple de justification au coût du traitement analgésique et des soins.

Parmi les grilles les plus courantes chez les **carnivores domestiques**, on trouve

- (i) l'échelle de Colorado State University applicable à la fois chez le chat et le chien (Hellyer et *al.*, 2007).
- (ii) les grilles 4AVet utilisées en postopératoire chez le chien ou le chat et élaborées en 2001 par l'Association vétérinaire pour l'Anesthésie et l'Analgésie Animale (Figure 26).
- (iii) l'échelle de Glasgow (Boland et Poncet, 2010). Il y a également celles développées par Holton et *al.*, 2001; Morton et *al.*, 2005; Brondani et *al.*, 2011 et Rialland et *al.*, 2012.

Chez les rongeurs, les échelles multiparamétriques ont été développées dans le cadre de situations expérimentales afin d'établir les points limites. La première a été conçue par Morton et Griffiths (1985) pour les animaux de laboratoire et adaptée aux divers types d'études réalisés. Lloyd et Wolfensohn ont utilisé l'échelle élaborée par Morton et Griffiths et l'on adaptée pour des études sur l'appareil respiratoire chez le rat. Ensuite, Morton a créé une nouvelle échelle basée sur la présence ou l'absence des critères comportementaux. Cette échelle est conçue exclusivement pour les douleurs chez la souris liées à une ascite (accumulation anormale de liquide dans la cavité péritonéale) contrairement à la première échelle.

Chez le cheval, les échelles multiparamétriques intègrent des indicateurs physiologiques facilement mesurables sur le terrain comme la fréquence cardiaque, respiratoire, la température et les bruits digestifs. Bussièrès (2008) est l'un des premiers à développer et valider une échelle multiparamétrique pour évaluer la douleur orthopédique. Van Loon en 2014 reprend cette échelle et la valide sur des douleurs gastro-intestinales. D'autres échelles sont développées comme par exemple suite à une laparotomie (Graubner et *al.*, 2011), ou suite à une castration chirurgicale (Taffarel et *al.*, 2015).

Figure 27 : Echelle multiparamétrique d'évaluation de la douleur induite par une boiterie chez le bovin (Boreve 2010).

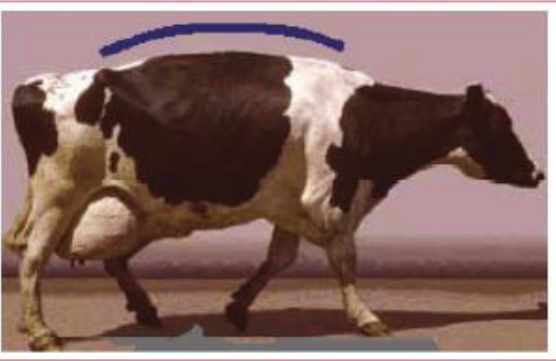
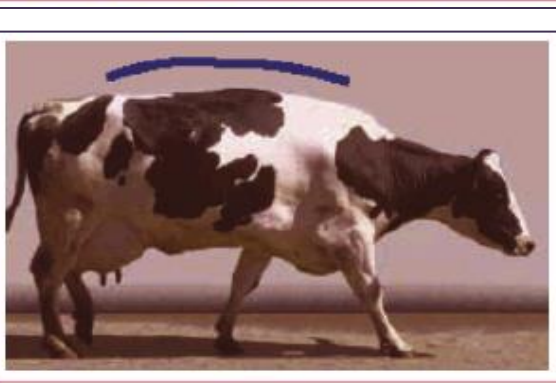
Référence Pas de boiterie	
Palier I Ingestion : - 3 % Production laitière : - 5 %	
Palier II Ingestion : - 7 % Production laitière : - 17 % Intervalle Vêlage Insémination 1 (IVI1) : + 25 jours	
Palier III Ingestion : - 16 % Production laitière : - 36 % Risque de réforme : x 5	

Tableau 7 : Les méthodes statistiques en fonction des méthodologies de métrologies d'après Rialland 2013 (Adapté d'après Nunnally, 1984; Gélinas et al., 2008; Streiner et Normand, 2008)

Type de fiabilité et de validation	Méthodes statistiques
Fidélité entre juges	✓ Coefficient de corrélation intraclasse ¹ ✓ Coefficient Kappa de Cohen² ✓ Coefficient de corrélation³
Fidélité intra-juge	✓ Coefficient de corrélation intraclasse ✓ Coefficient de corrélation³
Test-retest	✓ Coefficient de corrélation
Consistance interne	✓ Coefficient alpha de Cronbach⁴ ✓ Formule 20 de Kuder-Richardson ✓ Corrélation inter-items
Validation du Contenu	✓ Évaluation d'experts
Validité contre critère	✓ Analyse de corrélation
Validation du construit	✓ Analyse factorielle ✓ Analyse de la consistance interne pour les échelles ✓ Analyse de comparaisons de groupes ✓ Analyse de régression ✓ Coefficient de corrélation

¹ Le coefficient de corrélation intra classe peut être estimé à l'aide des méthodes d'estimation des composantes de la variance et propose de mesurer l'homogénéité des observations au sein des classes d'un effet aléatoire par rapport à la dispersion de ces observations entre classes.

² Le coefficient Kappa de Cohen et le coefficient Kappa pondéré sont des exemples de mesures d'accord sur des mesures non linéaires. Le coefficient Kappa propose de chiffrer l'intensité ou la qualité de l'accord réel entre deux ou plusieurs techniques ou jugements qualitatifs appariés.

³ Le coefficient de corrélation (Pearson ou Spearman) propose de mesurer la relation linéaire entre deux séries de mesures indépendantes.

⁴ Le coefficient alpha de Cronbach propose de mesurer la cohérence interne des questions posées lors d'un test (les réponses aux questions portant sur le même sujet devant être corrélées). Le coefficient alpha de Cronbach est conçu pour une généralisation en cas de variables continues ; La formule 20 de Kuder-Richardson (KR-20) est conçue pour des items dichotomiques.

Chez les ruminants, il n'y a pas d'échelle multiparamétrique développée hormis une échelle sur les boiteries chez le bovin développée par le groupe Boreve dans laquelle des indicateurs zootechniques sont associés à des indicateurs comportementaux (Figure 27).

3. Méthodes de validation des échelles

Ces échelles doivent être validées afin de s'assurer qu'elles mesurent exactement ce qu'elles sont censées mesurer. Pour cela on utilise les approches développées en métrologiques qui reposent principalement sur la validité et la fiabilité. Concernant la fiabilité, il en existe différents types:

- **la fidélité inter-observateurs** correspond à la qualité d'un instrument qui donne des scores identiques ou très proches lorsque plusieurs observateurs cotent les mêmes sujets
- **la fidélité intra-observateur** permet d'évaluer l'accord des mesures entre deux ou plusieurs séries de mesures opérées à des périodes différentes par le même observateur
- **la fidélité test-retest** correspond à des résultats à peu près identiques lorsque le test est répété dans le temps à un même sujet dont l'état ne s'est pas modifié entre les deux passations
- **la consistance interne** permet d'évaluer à quel point un item qui compose un instrument est un bon indicateur de la performance des autres items qui composent l'instrument.

Concernant le processus de validation, il permet de décréter qu'un instrument est validé. Comme pour la fidélité différentes validations existent

- **la validité contre critère** correspond à une évaluation du phénomène mesuré à la fois par l'échelle étudiée et par un critère extérieur à celle-ci pris comme référence. Un nombre suffisant de sujets étant évalué de manière indépendante par les deux instruments, on mesure l'intensité du lien statistique existant entre les deux évaluations
- **la validité du construit** correspond à la conception théorique que nous avons du phénomène mesuré par l'échelle nous permettant de faire un certain nombre d'hypothèses. Celles-ci seront ensuite testées expérimentalement
- **la validité de contenu** permet d'évaluer dans quelle mesure les items composant l'échelle sont pertinents et constituent un échantillon représentatif de l'univers de tous les items possibles pouvant décrire le phénomène mesuré Pour chacune de ces méthodes de fiabilité et de validation des méthodes statistiques existent et sont décrites dans (le Tableau 7) (Rialland, 2013).

Objectifs et développement

Objectifs du travail de thèse

Nous avons vu, dans la partie précédente l'importance des attentes sociétales autour des conditions d'élevage des animaux de rente, et sur l'expérimentation animale ainsi que l'évolution réglementaire qui les accompagne. Nous avons également vu que la communauté scientifique n'a commencé que récemment à s'intéresser aux questions de douleur des animaux. Récemment (2009), l'expertise scientifique collective sur les douleurs animales réalisée par l'INRA a identifié des besoins prioritaires en recherche sur la douleur des animaux de rente. Ceux-ci ont pour objectifs :

- d'identifier des critères d'évaluation de la douleur afin de construire et valider des échelles multiparamétriques de mesure de la douleur. En effet, si des indicateurs (physiologiques, lésionnels, comportementaux et zootechniques) sont identifiés, aucune grille multiparamétrique n'a été développée à ce jour.
- d'identifier les sources de douleurs avérées et potentielles en élevage.
- de prévenir et traiter la douleur des animaux d'élevage.
- d'étudier l'impact socio-économique de la prévention et du traitement de la douleur.
- de revoir le dispositif réglementaire et le statut juridique des animaux

Nous avons vu, dans la partie précédente que l'évaluation de la douleur est très complexe chez les mammifères et s'appuie principalement sur les modifications de comportements, du système nerveux autonome (SNA), de l'axe hypothalamo-hypophysaire (AHH). Nous avons également vu que ces indicateurs ne sont pas tous spécifiques d'une douleur et peuvent apparaître en cas de stress. C'est pourquoi, la mise en place d'échelle de douleur combinant plusieurs indicateurs comportementaux et physiologiques et/ou zootechniques (échelle multiparamétrique) permet d'évaluer la douleur de façon plus spécifique et sensible. Contrairement aux animaux de compagnie, il existe peu d'échelle de douleur chez les ruminants. Mon projet de thèse vise à évaluer la douleur ressentie par les animaux de rente dans des situations d'élevage ou expérimentales et à étudier l'efficacité des protocoles de soulagement utilisés. Notre finalité est de mettre à disposition des acteurs de la filière (éleveurs, techniciens et vétérinaires) et des chercheurs, une méthode d'évaluation comportant un panel d'indicateurs fiables permettant d'identifier la présence de douleur chez l'animal. Ces indicateurs pourraient moyennant des ajustements, être utilisés quelle que soit l'espèce et quel que soit le statut de l'animal (âge, sexe,...) dans un but de soulager cette douleur.

Mon projet de thèse comporte cinq objectifs:

- **Objectif 1:** Identifier et décrire les différentes voies pouvant être mobilisées dans un processus douloureux et identifier les indicateurs les plus pertinents et les plus caractéristiques de chacune d'entre elles
- **Objectif 2 :** Proposer une approche intégrative de l'évaluation de la douleur chez les ovins et identifier la meilleure combinaison d'indicateurs, parmi ceux précédemment identifiés, permettant de discriminer différentes situations douloureuses liées à une chirurgie.
- **Objectif 3 :** Appliquer et valider l'approche multiparamétrique dans le cadre d'un autre type de situation douloureuse chez les ovins : la castration
- **Objectif 4 :** Appliquer cette même approche et la valider sur les bovins dans le cadre de maladie d'élevage : la mammite
- **Objectif 5 :** Appliquer l'approche multiparamétrique pour évaluer l'efficacité d'un protocole antalgique actuellement utilisé lors d'intervention expérimentale chez les bovins

Développement du travail de thèse

Pour identifier les indicateurs qui seraient à mobiliser dans différentes situations douloureuses (**Objectif 1**), il nous apparaissait important de faire l'état de l'art concernant les voies mobilisées dans le processus douloureux et de bien en décrire les mécanismes associés. Ce travail permet de répondre au 1^{er} objectif de thèse et a donné lieu à deux synthèses bibliographiques (**Publication 1 et 2, annexe 1 et 2**).

A partir de cette synthèse, nous avons sélectionné, sur l'ensemble des voies modifiées par la douleur, les indicateurs à retenir pour la suite de notre travail en fonction :

- (i) de leur spécificité vis-à-vis des voies mobilisées dans un processus douloureux
- (ii) de leur accessibilité en terme de coût, de complexité de mesure et des moyens analytiques dont nous disposions
- (iii) de leur "applicabilité" terrain et/ou dans différentes espèces de ruminant (bovin, ovin essentiellement).

Suite à ce travail bibliographique, différentes expérimentations et collaborations ont été mises en place afin d'appliquer l'approche multiparamétrique sur différents modèles de douleur dans des situations d'expérimentation ou d'élevage et chez deux espèces de ruminants (ovins et bovins) pour la tester et la valider.

Pour l'**objectif N°2**, nous avons testé les indicateurs des différentes voies dans plusieurs situations potentiellement traumatiques (douleur et/ou stress) pour l'animal afin de vérifier si l'utilisation intégrée des différentes voies permettait de discriminer ces situations. Pour cela nous avons le choix entre deux stratégies : réaliser les expérimentations en élevage ou en station expérimentale. Nous avons choisi d'aborder cette question en privilégiant les situations expérimentales afin d'avoir une maîtrise la plus optimale possible de tous les facteurs interférents (interaction homme-animal, génétique des animaux...), mais surtout d'avoir plus de latitude concernant le choix du modèle traumatique. En effet, nous souhaitions limiter le nombre d'animaux et privilégier une situation de traumatisme liée à une **intervention chirurgicale** induisant potentiellement une douleur par **excès de nociception**, ce type de douleur étant le plus fréquent en élevage. Enfin nous souhaitions privilégier dans un premier temps le **modèle ovin**, de plus petite taille que le bovin et facilitant ainsi les

manipulations et interventions nécessaires pour le suivi de tous les paramètres que nous avons identifiés précédemment. **Le modèle de douleur retenu** a donc été celui de la pose de canules digestives, d'une part parce que cette chirurgie correspondait à nos critères d'inclusion du type de douleur mais aussi parce que ces interventions étaient "programmées" dans le cadre du renouvellement du troupeau expérimental et donc éthiquement plus acceptables. Cette expérimentation s'est déroulée aux Installations Expérimentales du Centre INRA de Clermont-Ferrand/Theix (Unité Expérimentale des Monts d'Auvergne, UEMA) en collaboration avec les équipes Adaptation et Comportement Sociaux (ACS) et Animal Muscle et Viande (AMUVI) de l'UMRH.

Les **objectifs de cette expérimentation** étaient donc :

- d'explorer les changements dans les cinq voies impliquées dans les réponses à la douleur (comportement, inflammation, stress oxydatif, l'axe HHP et le SNA) chez des moutons exposés à différents degrés d'invasivité des procédures chirurgicales
- d'évaluer la capacité d'une analyse multiparamétrique (par l'analyse de sa sensibilité et de sa spécificité) à discriminer ces situations.

Cette expérimentation a été réalisée sur 24 moutons mâles castrés de race Texel âgés de 18 mois. Les animaux étaient répartis en quatre lots de 6 animaux : un lot témoin ne subissant aucune contrainte (lot C), un lot subissant les contraintes liées à l'intervention (mise à jeun, anesthésie générale, soins post-opératoires) (lot Sham), un lot subissant la pose d'une canule digestive (mise à jeun, anesthésie générale, soins post opératoires et canule au niveau du rumen) (lot R) et un lot subissant la pose de 3 canules digestives (mise à jeun, anesthésie générale, soins post opératoires et canules au niveau du rumen, du duodénum et de l'iléon) (lot RDI). Les animaux sham, R et RDI ont reçu une anesthésie générale ainsi qu'une analgésie pendant 4 jours post-opératoires. Notre objectif était de savoir si l'approche multiparamétrique était plus efficace qu'une analyse voie par voie pour discriminer ces différentes situations douloureuses pour l'animal. Les animaux ont été conduits par groupe de 4 (1 animal de chaque traitement) sur une période expérimentale de 4 semaines (deux semaines avant et deux semaines après opération). Durant ces 4 semaines d'expérimentation, différentes mesures ont été faites à savoir des mesures relatives 1) au SNA (fréquence cardiaque et la variabilité cardiaque), 2) à l'axe hypothalamo-hypophysaire (cortisol, glucose et des Acides Gras Non estérifiés (AGNE)) 3) au processus inflammatoire (haptoglobine), 4) au stress oxydant (glutathion, malondialdéhyde, statut en antioxydants (SAO)) 5) au comportement. Les résultats de ces mesures et observations sont présentés dans la **publication**

N°3.

Après avoir testé l'approche multiparamétrique et montré qu'elle permettait une bonne discrimination des différentes situations traumatiques, nous souhaitons répondre au **3^{ème} objectif de la thèse** : évaluer les performances de cette approche sur sa capacité à discriminer plus spécifiquement différentes situations plus ou moins douloureuses sur un autre modèle de douleur chez l'ovin.

Comme précédemment, nous avons choisi de réaliser cette évaluation à partir d'une situation douloureuse par **excès de nociception**, ce type de douleur étant le plus fréquent en élevage par rapport à une douleur neuropathique. Parmi les douleurs par excès de nociception nous avons dû choisir entre un modèle de douleur "expérimental" ou rencontré en élevage. Parmi les situations douloureuses liées à des situations expérimentales, à notre connaissance, aucun modèle n'avait été jusqu'alors proposé et décrit en termes de niveaux de douleur. Il était donc nécessaire de sélectionner un modèle et de le valider en tant que "modèle induisant différents niveaux de douleur". C'est pourquoi nous nous sommes orientés vers un modèle de douleur reconnu en élevage induisant une douleur par excès de nociception et déjà bien décrite dans la littérature. Nous avons choisi la **castration** qui est une pratique courante en élevage et reconnue douloureuse, (Mellema et *al.*, 2006 ; Melches et *al.*, 2007). De plus au sein des Installations Expérimentales du centre INRA de Clermont-Fd/Theix une partie du troupeau **ovin** est castré annuellement pour mettre à disposition des chercheurs des mâles adultes castrés utilisés pour les expérimentations de digestion. Enfin concernant la **technique de castration**, nous avons le choix entre les techniques par pose d'un anneau élastique, ou par écrasement à la pince burdizzo ou enfin par ablation des testicules par approche chirurgicale. La castration par élastique est plus caractéristique de douleurs de type chronique alors que les techniques avec la pince burdizzo ou la méthode chirurgicale induisent des douleurs essentiellement de type aigu (Thuer et *al.*, 2007). Nous souhaitons travailler sur des douleurs aiguës parce que la réalisation d'une expérimentation sur une douleur chronique aurait été incompatible avec le déroulé de la thèse en termes de temps disponible. Le choix entre les techniques par écrasement à la pince ou ablation par une approche chirurgicale a essentiellement été fait sur la "recevabilité" éthique du lot témoin. En effet, nous avons besoin d'un lot témoin ne recevant ni analgésie ni anesthésie (lot le plus douloureux de notre dispositif) ce qui éliminait le modèle de castration par voie chirurgicale, cette intervention ne pouvant être réalisée sans médication, alors que la castration à la pince est potentiellement

réalisable sans médication.

Les **objectifs de cette expérimentation** étaient donc :

- De valider l'approche multiparamétrique sur un modèle de douleur reconnu en élevage
- D'identifier la ou les combinaisons linéaires d'indicateurs, les plus spécifiques et sensibles pour évaluer l'intensité douloureuse.

Nous avons choisi, pour effectuer cette validation, d'induire **différentes intensités douloureuses** via les protocoles analgésiques et anesthésiques : (i) injection de sérum physiologiques sans aucune analgésie ni anesthésie, (ii) une anesthésie locale seule (iii) une anesthésie locale associée à un anti-inflammatoire non stéroïdien. La douleur ressentie par les animaux devait donc être maximale pour le lot ne recevant aucune anesthésie ni analgésie, modérée pour le lot avec une anesthésie locale et légère voir absente pour le lot avec anesthésie et analgésie. Néanmoins bien que les objectifs de cette étude soient d'évaluer la douleur liée à la castration, nous avons veillé à ce que la douleur infligée aux animaux soit éthiquement acceptable en établissant des "points limites" validés par le Comité d'Ethique.

Les indicateurs pris en compte pour définir le point limite étaient :

- absence de reprise de l'alimentation
- absence de rumination
- bruxisme
- halètement
- poils piqués
- animal isolé
- animal avec la tête basse
- animal avec les oreilles basses
- animal avec les paupières fermées
- animal en position de décubitus

Si tous les points limites définis ci-dessus apparaissaient au moins 1 fois (de façon simultanée ou non) et persistaient au-delà de 12 h, les animaux étaient sortis de l'expérimentation et recevaient un AINS (Finadyne (2 ml /kg) en IM) et des dérivés morphiniques (Torbugésic (1ml/100Kg de PV en IV)).

Durant cette expérimentation, 24 ovins mâles âgés de 12 mois, de race Texel ont été utilisés et logés par 3 dans des box de 15 m² leur permettant d'exprimer leur comportement. Dans un 1er temps, afin de minimiser l'effet du stress induit par la manipulation, la contention et les prises

de sang nous avons effectué une habituation à la contention, aux manipulations et aux injections durant 10 jours pour chaque animal. Ensuite, afin d'évaluer l'effet propre des molécules anesthésiques et analgésiques utilisées lors de la castration, en dehors de l'acte douloureux lui-même, les animaux ont reçu, selon le lot dans lequel ils étaient affectés, l'un des trois traitements médicamenteux puis ont été suivis pendant 5 jours au cours desquels des observations comportementales, des mesures de la variabilité de la fréquence cardiaque (Heart Rate Variability HRV) ainsi que des prises de sang étaient effectuées. Après cette semaine appelée « semaine de simulation » les animaux ont eu une semaine dite de « repos » (ou wash out") afin que les molécules anesthésique et analgésique soient éliminées. Suite à cette période de repos, nous avons réalisé les castrations et suivi les animaux avec réalisations des mêmes mesures et observations que pendant la semaine de simulation. Les résultats de cette expérimentation sont présentés dans la **publication N°4**.

Suite à la validation de l'approche multiparamétrique chez l'ovin dans le cadre de douleur de type « intervention de convenance », nous souhaitons poursuivre notre programme en appliquant cette même approche multiparamétrique sur l'espèce bovine, autre espèce modèle de notre projet afin de répondre à **l'objectif 4 du projet de thèse**.

Comme pour l'objectif 3, nous avons privilégié des modèles de douleur rencontrés en élevage. Nous avons le choix entre différentes situations douloureuses décrites dans la littérature parmi lesquelles les boiteries, les mammites, les métrites et les douleurs viscérales liées à des problèmes digestifs revenaient le plus fréquemment. Nous avons eu l'opportunité de collaborer avec des collègues de Theix (J Pires, C. Leroux et al.) et de Tours et Toulouse, (P. Germont, G. Foucras et al.) dont le modèle ou l'objet d'étude est la mammite chez la vache laitière haute productrice. Nous avons pu ainsi initier les premières mesures sur cette pathologie courante en élevage laitier lors d'essais conduits à Theix à l'Unité Expérimentale des Monts d'Auvergne (UEMA) dans le cadre du projet Ruminflame. Cette première expérimentation a permis de préciser les grilles d'évaluation de la douleur et tester la faisabilité des mesures envisagées chez des animaux de grande taille par rapport aux approches développées chez l'ovin. Nous avons pu ensuite participer à une seconde expérimentation réalisée à la Plate-Forme d'Infectiologie Expérimentale de l'INRA de Tours et l'équipe d'interactions Hôtes-Agents Pathogènes de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse. Cette expérimentation s'inscrivait dans le cadre d'un projet Européen nommé KOLimastIR dont les objectifs étaient (i) d'identifier des corrélats immunitaires de la réponse

à l'immunisation avec des colibacilles (*Escherichia coli*) tués, et à évaluer l'effet de cette vaccination sur le déroulement d'une infection mammaire (mammite) induite expérimentalement avec la souche vaccinale d' *Escherichia coli* (ii) de caractériser la réponse inflammatoire et immunitaire des vaches à l'infection, qu'elles soient vaccinées ou non.. Dans cette étude, la **mammite a été induite expérimentalement** en infectant un quartier avec une souche d'*Escherichia coli* environ un mois avant le vêlage chez des vaches Holstein primipares. Les animaux ont été répartis en 3 groupes (i) un groupe témoin de vaches non vaccinées recevant l'adjuvant seul par voie intramusculaire (ii) un groupe de vaches vaccinées deux fois par voie intramusculaire avec des bactéries tuées adjuvées (iii) un groupe de vaches vaccinées une première fois avec le même vaccin puis par voie intra mammaire avec un surnageant de culture bactérienne sans adjuvant. Des observations comportementales ainsi que des prélèvements de sang et de lait ont été mis en place afin d'évaluer les réponses immunitaires, inflammatoires et la douleur ressentie par les animaux. Ces résultats ont permis de définir 4 périodes spécifiques de l'évolution du processus inflammatoire d'une mammite : (i) une phase pré-inoculation (ii) une phase pré-clinique (entre 4h et 8h après l'inoculation) (iii) une phase d'état clinique (entre 12h et 24h après l'inoculation) (iv) une phase de rémission (entre 32h et 80h après l'inoculation). Notre objectif dans cette étude était donc de discriminer les différentes phases définies préalablement et correspondant probablement à des niveaux de douleur différents grâce à notre approche multiparamétrique. Ainsi, nous avons mesuré les différents paramètres appartenant aux voies de la douleur (comportement, axe hypothalamo-hypophysaire, stress oxydant et inflammation), seule la voie correspondant au SNA n'a pas pu être mesurée durant cette expérimentation par manque de capteurs adaptés à ce type d'animaux. En revanche, cette expérimentation a permis de tester deux nouveaux indicateurs potentiellement utilisables en élevage de précision: la température ruminale (pose de bolus ruminal) et la mesure du temps passé couché (pose d'accéléromètres). La validation de l'approche multiparamétrique sur ce modèle de gros ruminant est rapporté dans la **publication N°5** et ne concerne que le groupe "témoin" n'ayant reçu aucune vaccination, la modulation de l'intensité douloureuse par les différents types de vaccination nécessitant de connaître le niveau d'efficacité de ces vaccinations, résultats non disponibles durant notre travail de thèse. Ces premiers travaux nous ont montré qu'il était possible de discriminer différents niveaux de douleurs induits par les différentes phases dans l'installation et de développement de mammite, en utilisant plusieurs voies, comme c'était le cas chez l'ovin. Nous avons enfin souhaité utiliser cette approche multiparamétrique pour évaluer l'efficacité

de protocoles antalgiques chez le bovin.

L'approche multiparamétrique se révélant pertinente chez le bovin pour discriminer différentes situations plus ou moins douloureuses, nous avons souhaité aborder un autre point délicat de l'expérimentation animale, qui était l'évaluation de la prise en charge de la douleur lors d'interventions chirurgicales à des fins expérimentales. Pour répondre à ce dernier objectif de la thèse, nous avons eu l'opportunité de collaborer avec le site des Installations Expérimentales de Méjussiaume du centre INRA de Rennes (J. Lassalas, P. Lamberton, S. Lemosquet et al.). Des vaches laitières porteuses de canules digestives sont régulièrement utilisées en expérimentation et ces interventions chirurgicales sont faites pour répondre aux besoins des chercheurs. C'est dans ce cadre que nous avons collaboré avec cette équipe afin d'évaluer l'efficacité d'un nouveau protocole médicamenteux qu'ils mettaient en place pour la première fois suite à la pose de canules ruminale et duodénale chez 5 vaches laitières de race Holstein. Des observations comportementales ainsi que des prises de sang ont été effectuées afin de mesurer les différentes voies impliquées dans la douleur. Pour les mêmes raisons que celles décrites dans l'objectif 4, la voie du SNA n'a pas pu être évaluée dans cette étude. Les résultats de cette étude sont présentés dans la **publication N°6**.

Résultats

Publication N°3

A multiparametric approach to discriminate pain experienced by sheep during experimental surgeries**M. Faure, V. Paulmier A. Boissy, A. de la Foye, A. de Boyer des Roches, D. Durand****ANIMAL***Soumis pour publication le 02 janvier 2017*

Résumé : Les situations traumatiques chez les animaux induisent des réponses à la douleur, exprimées par des modifications comportementales et physiologiques telles que l'inflammation, le stress oxydatif, l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HPA) et le système nerveux autonome (SNA). Comme certains de ces systèmes peuvent également être activés en situations de stress émotionnel et/ou physique, leur utilisation comme un moyen d'évaluer la réponse de la douleur est difficile. Nous avons cherché à explorer (i) les changements dans les cinq voies impliquées dans les réponses à la douleur (comportement, inflammation, stress oxydatif, l'axe HHP et le SNA) chez des moutons exposés à différents degrés d'invasivité des procédures chirurgicales (ii) d'évaluer la capacité d'une analyse multiparamétrique (par l'analyse de sa sensibilité et de sa spécificité) à discriminer ces situations. Nous avons utilisé 24 moutons adultes répartis en quatre traitements: le traitement **Contrôle** (C) n'ayant pas de jeûne, pas d'anesthésie générale ni de chirurgie, le traitement **Sham** (S) ayant un jeûne pré-opératoire, une anesthésie générale mais sans chirurgie, le traitement **Rumen** (R) ayant le jeûne pré-opératoire, l'anesthésie générale et une opération consistant à poser une canule au niveau du rumen et le traitement **Rumen-Duodéal-Iléon** (RDI) ayant le jeûne pré-opératoire, l'anesthésie générale et une opération consistant à poser trois canules au niveau du rumen, du duodénum et de l'iléon. On a mesuré les réponses des moutons pendant cinq jours après la chirurgie. Les résultats, pour chaque voie (comportementale et physiologique) prise indépendamment, permettent de discriminer les traitements avec une sensibilité (Se) allant de 0 à 100% et une spécificité (Sp) allant de 17 à 100%. L'analyse multiparamétrique recueillant les informations des cinq voies a permis d'améliorer l'efficacité de la discrimination entre les traitements (Se, 50-100%, Sp, 88-100%) et a fourni des informations supplémentaires sur la contribution relative de chaque voie à la réponse globale des moutons. Cette réponse repose principalement sur l'inflammation (corrélation absolue pour l'haptoglobine, 0,89), l'axe hypothalamo-hypophysaire (cortisol, 0,85), le comportement et dans une moindre mesure sur le stress oxydatif (NO, 0,64; GSH / GSSG, -0,57) et ANS (Fréquence cardiaque, 0,50). Par conséquent, l'approche multiparamétrique semble être un outil prometteur pour discriminer différents degrés d'invasivité liés à des interventions chirurgicales.

A multiparametric approach to discriminate pain experienced by sheep during experimental surgeries

M. FAURE^{1, 2}, V. PAULMIER¹ A. BOISSY^{1,2}, A. DE LA FOYE^{1,2}, A. DE BOYER DES ROCHES^{2,1†}, D.DURAND^{1, 2*†}

¹ *INRA, UMR 1213 Herbivores, F-63122 Saint-Genès-Champanelle, France*

² *Université de Lyon - VetAgro Sup, UMR 1213 Herbivores, F-69280 Marcy l'Etoile, France*

† Equally contributing authors

* Corresponding author. Tel.: + 33 (0)473624227.
E-mail address: denys.durand@inra.fr

Short title: Assessment of pain in sheep

Abstract

Traumatic situations in animals induce pain responses, expressed through behavioural and physiological pathways such as inflammation, oxidative stress, hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPA), and autonomic nervous system (ANS). As some of these systems can also be activated during excitement and situations with a positive valence, their use as a means to assess pain response is difficult. We aimed to explore i) how these five aforementioned pathways change in sheep exposed to various degrees of invasiveness of surgical procedures and ii) whether a multiparametric analysis that combines information from these five pathways enhances the discrimination between these situations, and estimates the relative importance of these pathways in the pain response. We used 24 adult sheep split into four treatments: Control (C, no fasting, no anaesthesia, no surgery), Sham (S, fasting, anaesthesia, no surgery), Rumen Canulation (R, fasting, anaesthesia, rumen cannulation), and Rumen-Duodenal-Ileum cannulation (RDI, fasting, anaesthesia, cannulation of the rumen, duodenum and ileum). Sheep' responses were measured for five days after surgery. When considering each behavioural or physiological pathway independently, discrimination between treatments was acceptable, its sensitivity (Se) ranging from 0 to 100%, and its specificity (Sp) ranging from 17 to 100%. The multiparametric analysis gathering information from the five pathways enhanced the effectiveness of discrimination between treatments (Se, 50-100%; Sp, 88-100%), and gave additional information on the relative contribution of each pathway to the global sheep response. Sheep global response was higher when exposed to a surgery, and increased with the surgery invasiveness. This response relied mostly on Inflammation (absolute correlation for haptoglobin, 0.89), HPA (cortisol, 0.85), behaviour and to a lower extent on oxidative stress (NO, 0.64; GSH/GSSG, -0.57) and ANS (Heart rate, 0.50). Therefore the multiparametric approach seems to be a promising tool to discriminate between different degrees of invasiveness of surgical procedures.

Key words: pain, stress, surgery, ruminant, multiparametric approach

Implications

Better identifying pain is a challenge for scientists and stakeholders in animal production. Here, we demonstrate that a multivariate analysis combining behavioural and physiological

indicators is more effective to detect pain in sheep exposed to surgeries with various degrees of invasiveness, than analyses only based on behaviour or physiology.

Introduction

For husbandry reasons, ruminants, such as most farm animals, may be exposed to traumatic events (e.g. castration, dehorning caesarean ...) that cause stress or pain. 'Pain' is defined as "an aversive sensory experience that elicits protective motor actions, results in learned avoidance and may modify species-specific traits of behaviour, including social behaviour" (Molony and Kent, 1997). The term "stress" is defined as "the nonspecific response of the body to any demand made upon it due to a common emotional experience" (Veissier and Boissy, 2007). Because of the absence of a verbal report, the emotional experiences of animals are generally assessed through the following two expressive components: the behavioural component and the physiological component (including activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis, activation of the autonomic nervous system (ANS), inflammation and oxidative stress) (Prunier *et al.*, 2013). Collectively, these components constitute five responses to pain. In ruminants, various behavioural measurements can be used to assess pain, such as teeth grinding, feeding behaviour and social interactions (Rialland *et al.*, 2014). HPA activity, through the measurement of cortisol concentration, has been used to assess pain induced by challenges, such as dehorning (Stafford and Mellor, 2005) or castration (Lonardi *et al.*, 2015). Changes in ANS activity in response to orthopaedic pain (Bussi res *et al.*, 2008) or post-abdominal surgical pain (Graubner *et al.*, 2011) can be evaluated through the measurement of heart rate and heart rate variability (HRV). The intensity of the inflammatory response (through the measurement of cytokines and acute phase proteins) can be used to assess the presence and/or intensity of pain associated with castration (Earley and Crowe, 2002). Oxidative stress, which is reflected in an imbalance of oxidant and antioxidant substances in the body, is observed in numerous painful diseases (e.g. mastitis, respiratory and joint disease (Lykkesfeldt and Svendsen, 2007). More precisely Peroxynitrite and reactive oxygen precursor are critically important in the development of pain of several etiologies. Oxidative stress is therefore an emerging field that deserves to be investigated in pain assessment (Salvemini *et al.*, 2011). Despite the use of a large variety of behavioural and physiological indicators, the assessment of pain is difficult because these indicators are not pain-specific. For instance, animal handling induces an

increase in cortisol concentrations and heart rate (GrØndahl-Nielsen *et al.*, 1999). Moreover, many of these indicators are used indiscriminately to evaluate the stress or pain experiences. The use of behavioural indicators to assess pain is further complicated by the fact that ruminants, such as most prey species, express very few signs of pain, sickness or weakness to avoid attracting the attention of predators (Vinuela-Fernandez *et al.*, 2007). Therefore, there is a need to assess the validity of pain indicators in ruminants by studying their sensitivity (the proportion of painful animals that test positive) and specificity (the proportion of pain-free animals that test negative) in traumatic situations.

Previous studies on how sheep experience pain are generally based on one or two types of indicators (see above). To our knowledge the combination of information from various indicators has not been explored, although it would increase the chance of detecting and assessing the intensity of pain experienced by the animals (Prunier *et al.*, 2013). Discriminant analysis is a multivariate technique that has been used in cellular biology and genetics (e.g. (Kanehisa, 1988)) to compare individuals belonging to several groups and to describe how groups differ in terms of variables (Perrière and Thioulouse, 2003). The good results obtained in cellular biology convinced us to apply this method to sheep response to surgical procedures.

The first objective was to explore changes in five pathways involved in pain responses (behaviour, inflammation, oxidative stress, the HPA axis, and the ANS) in sheep exposed to three degrees of invasiveness of surgical procedures, namely Sham (fasting, anaesthesia, but no surgery), gastrointestinal cannulation (fasting, anaesthesia, rumen cannulation), and Rumen-Duodenal-Ileum (fasting, anaesthesia, cannulation of the rumen, duodenum and ileum). The second objective was to evaluate the ability of a multiparametric analysis (through analysis of its sensitivity and specificity) to discriminate between these situations. Timeline responses are highly variable between pathways (e.g. earlier behavioural response than physiological response (Prunier *et al.*, 2013)), within pathways (e.g. earlier GSH/GSSG response than MDA response and also may vary between individuals (Prunier *et al.*, 2013)). We therefore chose to study the integrated response of sheep on a 5 days period rather than the time course of the responses.

Materials and methods

Animals and Housing

Twenty-four castrated Texel male sheep (18 months old, 54 ± 3 kg (mean $\pm$ SD) bodyweight) were used. The number of animals to recruit per treatment was calculated according to (Röhrig et al., 2010). We identified first the two most cited indirect indicators of pain from all indicators measured in pain studies (Prunier *et al.*, 2013): cortisol and haptoglobin. For those two indicators, we then used our unpublished results from all follow-up measurements after surgical interventions (rumen, duodenal and/or ileal cannulae on sheep and cattle (Durand, person. com), to calculate the required number of animals, haptoglobin concentrations varying from 0.05 to more than 1.00 mg/mL (with associated CV from 15 to 50 %), cortisol concentrations varying from 5 to 25 ng/mL (with CV associated from 20 to 35%). All animals were housed under the same conditions (individual pen on sawdust allowing visual contact between sheep). Sheep received water *ad libitum* and an individual diet based on hay and INRA concentrate (80 % and 20 % fresh matter, respectively) to satisfy their nutrient requirements and intake capacity. Feed ration was given twice per day at 8:00, and 19:00.

Study design and treatments

After two weeks of housing adaptation, the animals were randomly split into the following 4 groups: A Control group (no fasting, no anaesthesia and no surgery, C: n=6), a Sham group (fasting, anaesthesia but no surgery, S: n=6), a Rumen group (fasting, anaesthesia and rumen cannulation, R: n=6), and a Rumen-Duodenal-Ileum group (fasting, anaesthesia and cannulation of the rumen, duodenum and ileum, RDI: n=5). All animal procedures were approved by the Regional Ethics Committee for Experiments on Animals (CEMEA-Auvergne; CE9-09, CE9-10, CE9-13). All animals that underwent surgery were used subsequently in different experimental studies of cannulated sheep (CE 0149701).

Preparation of the animals and surgeries

To prepare S, R and RDI animals for general anaesthesia, eating was restricted for two days prior to surgery (day 2 before surgery, 50% of basal diet; day 1 before surgery, no food and no water). On the day of surgery (day 0), thirty minutes before leaving the sheepfold, animals received 2.5 mg/kg of glycopyrrolate bromide (ROBINUL®, 0.20 mg/mL, VETOQUINOL), which has an anti-muscarinic action. Upon arrival in the operating room, 20 mL intravenous sodium thiopental (NESDONAL®, 1 g, MERIAL) were injected via jugular vein to induce anaesthesia. Then, anaesthesia was maintained during surgery with an oxygen/isoflurane mixture using an endotracheal tube. For 30 to 45 min, S animals were given no further treatment. Ruminal cannulation was realized through a laparotomy of 60 mm on the left flank

about 50-70 mm below the backbone. After partial exteriorization of the rumen and incision of the rumen wall, a silicone rubber cannula (50 mm internal diameter) was implanted and exteriorized through the initial incision. Duodenal and ileal cannulation were realized through a second laparotomy (about 100 mm) on the right flank just above the floating ribs. T-shaped cannulas (silicone rubber, 17 mm internal diameter) were implanted in the proximal duodenum (about 70 mm downstream from the pylorus) and in the distal ileum (about 150 mm upstream of the ileocaecal junction). Cannulas were exteriorized through two round incisions (20 mm diameter) on the right flank between the initial incision and the backbone.

After surgery, all animals were kept in individual pens until fully awake. Within 1 hour after the end of surgery, all animals were returned to their home pen. All S, R and RDI animals received the following injections: (i) 3 mL/day flunixin meglumine (FINADYNE®, 50 mg, Intervet), an anti-inflammatory, by intramuscular injection in the neck on the day of surgery and for 4 days post-surgery; (ii) 3 mL/day marbofloxacin (MARBOCYL®, 20 mg, VETOQUINOL), an antibiotic, by intramuscular injection in the neck on the day of surgery and for 4 days post-surgery; and (iii) 6 mL sodium salt clanobutine (BYKAHEPAR®, 100.07 mg/mL, INTERVET), a pro-digestive, by intramuscular injection in the neck for 4 days post-surgery. During the post-operative period, the hay intake of S, R and RDI animals was progressively increased to 15 %, 25 %, 50 %, 75 % and 100 % of their initial hay intake (on days 1, 2, 3, 4 and 5 post-surgery, respectively), but without any INRA concentrate.

Behavioural observations

Behavioural observations were conducted by scan sampling (Martin and Bateson, 2013) every day (days 0, 1, 2, 3, 4 and 5) by observers trained to observe animal behaviour. On day 0, sheep were observed twice after surgery (one scan observation per sheep from 13:30 to 13:45, and one scan observation per sheep from 19:00 to 19:15). On days 1, 2, 3 and 4, sheep were observed three times (one scan observation per sheep from 10:15 to 10:30, one scan observation per sheep from 13:30 to 13:45, and one scan observation per sheep from 19:00 to 19:15). Sheep were observed twice on day 5 (one scan observation per sheep from 10:15 to 10:30, and one scan observation per sheep from 19:00 to 19:15). At each time point, the presence/absence of each behaviour defined in Table 1 was recorded for each sheep. Sheep response to food distribution (Table 1) was observed twice per day on days 0, 1, 2, 3, 4 and 5, at the time of feed ration distribution in the morning (8:00) and in the evening (19:00).

Physiological measurements

Four blood samples were collected from each sheep by venipuncture from the jugular vein to determine physiological variables at 07:00 (just before a meal) on days 0, 1, 3 and 5. Blood samples were collected into Vacutainer® tubes containing EDTA-Na₂ (2 tubes, 10 mL each) or lithium heparin (2 tubes, 10 mL each).

Hypothalamo-Pituitary-Adrenal axis

Measuring HPA axis activity is the standard approach to the study of stress and welfare in farm animals. The plasma concentration of cortisol was determined by radioimmunoassay (Boissy and Bouissou, 1994).

Inflammation. Plasma haptoglobin concentrations were determined by immunoprecipitation (Auboiron *et al.*, 1990).

Autonomous Nervous System. Heart rate variability (HRV) was calculated in four sheep from each treatment group (S, C, R, RDI) on days 1, 3 and 5 from electrocardiogram (ECG) recordings. Three electrodes (HP 40489E, Hewlett Packard, USA) were held in place by an elastic belt strapped around the thorax. One electrode was placed between the shoulder blades, and the two other electrodes were placed on the sternum. The three electrodes were connected to a PowerLab System (ADInstruments, UK) associated with a computer for ECG monitoring and recording with ADInstruments Chart software. For the four groups, ECG recordings began simultaneously at 12:00 and lasted for 5 hours. HRV measurements were made during three distinct 15-minute phases, representing diurnal phases without any human intervention (e.g., care, food, blood samples). Heart rate variability (HRV) was measured by determining the constantly changing temporal distance between consecutive heartbeats (R–R intervals). The root mean square of successive R–R intervals (RMSSD) is a measure of the distance between consecutive heartbeats (R–R intervals). The ratio LF/HF provides a measure of sympatho-vagal balance, with the high-frequency band (HF) reflecting vagal control and the low-frequency band (LF) reflecting both vagal and sympathetic control.

Oxidative stress. High performance liquid chromatography (HPLC) was used to measure plasma concentrations of oxidised and reduced glutathione (GSH and GSSG, respectively) (Martin and White, 1991). Plasma malondialdehyde (MDA) concentration was determined by

colorimetric assay (Gobert *et al.*, 2009). Measurement of total antioxidant status (TAS) was based on the absorbance of the ABTS+ cation (Gobert *et al.*, 2009). Plasma nitric oxide (NO) concentration was determined using a fluorometric assay kit (Item No. 780051, Cayman Chemical Company).

Statistical analyses

Discrete analysis of the five pathways. For behavioural responses, the average number of behavioural observations for each sheep was calculated as a percentage from day 0 to day 5. For physiological measurements, the integrated response for each animal and each indicator was calculated from the area under the curve (AUC) between day 0 and day 5. This integrative variable was used for all further analyses. Because sample sizes were small (n=6 sheep per treatment group) and measurements followed non-normal distributions, we used non-parametric analyses to compare treatment effects. Treatment effects were compared using the Kruskal-Wallis test. Pairwise group comparisons were made using Dunn's post hoc test. For all analyses, statistical significance was set at $P < 0.05$; P values between 0.05 and 0.1 were considered trends towards significance.

Multiparametric analysis. Six factorial discriminant analyses (FDA) were performed. Discriminant analysis highlights the variables on which the q groups differ and identifies at most $q-1$ linear combinations of variables that best discriminate between the groups ((Lebart *et al.*, 1995). Four treatments were compared: Control (no fasting, no anaesthesia, no surgery), Sham (fasting, anaesthesia, no surgery), Rumen cannulation (fasting, anaesthesia, rumen cannulation), and Rumen-Duodenal-Ileum cannulation (fasting, anaesthesia, cannulation of the rumen, duodenum and ileum). The discriminant functions are of the form : $Di = d_{i1}Z_1 + d_{i2}Z_2 + \dots + d_{ip}Z_p$; where D_i is the score on the discriminant function I ; d 's are weighting coefficients, and Z_s are the values of the p discriminant variables used in the discriminant analysis. Five FDA was performed, one on each pathway (i.e. behaviour, inflammation, oxidative stress, HPA and SNA). In addition, one FDA was performed using all behavioural and physiological (inflammation, oxidative stress, HPA and SNA) measures together. To interpret the discriminant components of each FDA, we took into account variables with a correlation of absolute value higher than 0.4 with at least one axis. Each FDA was followed by cross validation to estimate the performance of the model (Arlot and Celisse, 2010). Cross validation enables to calculate the probability for each animal to be accurately classified in the

right treatment group. The performance of the multiparametric analysis was estimated by its sensitivity (percentage of sheep correctly predicted to belong to a treatment; $Se = \text{True Positive} / \text{True Positive} + \text{False Negative}$) and specificity (percentage of sheep correctly predicted not to belong to a treatment; $Sp = \text{True Negative} / \text{True Negative} + \text{False Positive}$). Se and Sp were calculated after a leave-one-out analysis performed after each FDA. All analyses were performed using XLSTAT 2015 (Microsoft Excel). Significance threshold was set at $P = 0.05$ and a trend was considered when $0.05 < P < 0.1$.

Results

Discrete analysis of the response from individual pathways. Detailed responses day by day and for each experimental treatment (C, S, R and RDI sheep) are provided in Supplementary Materials.

Discrete analysis of the integrated response from individual pathways.

Integrated response for each treatment is described in Table 2. FDA performed for each pathway is described in Table 3, and its cross validation is detailed in Table 4.

Behavioural patterns. There was a gradient in the expression of behaviours from C sheep to S, R and RDI sheep (Table 2). Compared to C and S sheep, the RDI sheep were less alert ($P < 0.05$), and showed more antalgic postures ($P < 0.05$), lowered head and teeth grinding ($P < 0.05$) and clinical signs ($P < 0.05$). A similar but less pronounced pattern ($P < 0.10$) was observed in the R sheep: They were more alert than RDI sheep ($P < 0.05$) but similar to C and S sheep ($P > 0.05$), they also showed less antalgic postures and lowered less their head than RDI sheep ($P < 0.05$) but similar to C and S sheep ($P > 0.05$) (Table 2). The R and RDI sheep were not correctly classified by FDA into their original groups, leading to a sensitivity of 16 % and 67 % and a specificity of 67% and 100 % respectively (Table 4).

Inflammation

Haptoglobin concentrations were significantly increased in R and RDI sheep (22-fold and 37-fold, respectively; $P < 0.005$) compared with the S sheep. Among the RDI sheep one RDI animal was classified as R sheep leading to a sensitivity of 80 % and a specificity of 93%. The R sheep were not correctly classified into their original groups, leading to a sensitivity of 50 % and a specificity of 94% (Table 4).

Hypothalamic-Pituitary-Adrenal axis. Cortisol concentrations were significantly increased (4-fold) in the RDI sheep compared to C and S sheep ($P < 0.05$). R sheep also had an increase in cortisol concentrations, but not significantly different from C sheep ($P < 0.10$) or S sheep ($P > 0.05$) (Table 2). The RDI sheep were correctly classified into their original groups, leading to a sensitivity of 100 % and a specificity of 89% but the R sheep were not correctly classified into their original groups, leading to a sensitivity of 17 % and a specificity of 88% (Table 4).

Autonomous Nervous System. LF/HF ratios and RMSSD levels were not significantly different between the four experimental groups; only the RDI sheep presented a higher heart rate (+ 22 %, $P < 0.05$) compared with the S sheep (Table 2). The R and RDI sheep were not correctly classified into their original groups, leading to a sensitivity of 0 % and 40 % and a specificity of 76% and 83 % respectively (Table 4).

Oxidative stress. Graded changes in the concentrations of oxidative stress indicators (GSH/GSSG and NO) were observed, and correlated with the degree of invasiveness of surgical procedures. The RDI sheep had the lowest ratio of GSH/GSSG and the highest concentration of NO (Table 2). No change was observed for MDA and TAS ($P > 0.05$; Table 2). The R and RDI sheep were not correctly classified into their original groups, leading to a sensitivity of 17 % and 40 % and a specificity of 65% and 89 % respectively (Table 4).

Performance of the Multiparametric approach.

We compared the response from sheep of the four treatments (C, S, R and RDI) during the postoperative period by FDA using all behavioural and physiological (inflammation, oxidative stress, HPA and SNA) measures together (Figure 1). Axis 1 and 2 accounted for 98.8 % and 1.19% respectively of the variance explained by the model. Axis 1 was explained primarily by haptoglobin concentration (absolute correlation, 0.89), cortisol concentration (0.85), antalgic postures (0.85), Head position and teeth grinding (0.73), alertness (-0.69) clinical signs (0.67), NO (0.64), GSH/GSSG (-0.57) and Heart rate (0.50) (Table 3). This axis opposed RDI sheep to C and S sheep, with R sheep being intermediate. Figure 1 suggests that the higher the cortisol concentration, the haptoglobin concentration, the antalgic postures, the lowered head position, the heart rate and the lower the alertness and GSH/GSSG, the higher the chance of belonging to the RDI treatment. After cross-validation, RDI sheep were correctly classified into their original treatment group, leading to a sensitivity of 100 % and a

specificity of 100 %. Among the R sheep, one R sheep was classified as S sheep leading to a sensitivity of 83 % and a specificity of 100 %. Among the S sheep, three S sheep were classified as C sheep leading to a sensitivity of 50 % and a specificity of 88 %. Among the C sheep, one C sheep was classified as S sheep leading to a sensitivity of 83 % and a specificity of 100% (Table 4).

Discussion

This study describes the global response of five pain related pathways following exposure of sheep to three degrees of invasiveness of surgical procedures, namely Sham (fasting, anaesthesia, but no surgery, 'S'), Rumen-gastrointestinal cannulation (fasting, anaesthesia, rumen cannulation, 'R'), and Rumen-Duodenal-Ileum cannulation (fasting, anaesthesia, cannulation of the rumen, duodenum and ileum, 'RDI'). This study also explores the ability of a multiparametric factorial discriminant analysis, which combines information from these pathways, to discriminate between the responses to these experimental situations. Analysis of individual pathways provided acceptable discrimination between the four experimental situations, but that remained partial. In contrast, the multiparametric analysis gathering information from all pathways enhanced the discrimination between different experimental situations by describing how sheep differ in terms of variables.

Discrete analysis of individual pathways involved in stress and pain in different post-traumatic situations. The Sham (S) group was subjected to fasting, transport, anaesthesia, administration of medicine and taking of blood samples. The concentrations of cortisol in groups C and S were similar, confirming that 5 to 7 days of food restriction in ruminants does not alter cortisol concentrations (Fisher *et al.*, 2002). Behaviour, inflammation, oxidative stress and ANS responses were not affected by fasting nor anaesthesia. The absence of an oxidative stress response was surprising in S sheep because NO concentrations typically increase following stress and anaesthesia (Gadek-Michalska *et al.*, 2005). However, post-operative injection of NSAIDs may have decreased the activity of NOS, the enzyme required for NO synthesis. Overall, exposure of sheep to fasting and anaesthesia alone (group S) did not seem to induce significant stress.

Surgical implantation of a rumen cannula (R group) induced an inflammatory response but no changes in behaviour, HPA axis, ANS activity or oxidative stress compared with the S group on the 5-days period. Rialland *et al.* (2014) also reported an increase in inflammatory

response in cattle following a rumenotomy. The limited responses of the other pathways was surprising: sheep show behavioural and physiological response following painful events (Kent *et al.*, 1993). Since most behavioural changes were observed on Day 0 in R group, the lack of response could be due to the integrative analysis across the 5 days post-surgery. It could also be due to the post-operative injection of NSAIDs. NSAID administration may have (i) Reduced oxidative stress because flunixin is known to decrease the synthesis of enzymes essential to the production of nitric oxide during inflammation ; (ii) Inhibited COX enzyme activity, resulting in reduced synthesis of prostaglandins, key mediators of stress-induced corticotropin releasing hormone secretion (Gadek-Michalska *et al.*, 2005); and (iii) Inhibited noradrenaline synthesis, a neurotransmitter that is essential to ANS function (Güllner, 1983). However, R sheep showed more clinical signs than C sheep. Therefore, despite the post-operative administration of NSAIDs, sheep in the R group did experience some apparent discomfort and/or pain.

Implantation of cannulas in the rumen and in the intestines (RDI group) resulted in an increase in haptoglobin concentration, oxidative stress, and pain-related behavioural responses: sheep were less alert and expressed more antalgic postures. This could be explained by the seriousness of the surgery: In humans, open surgery induces more oxidative stress than a simple laparoscopy (Ruzic *et al.*, 2005). The implantation of 2 cannulas in the intestines increased tension in the mesentery, and presumably increased pain (Payne and Poulton, 1923). Activation of HPA axis and of ANS activity was also increased in RDI sheep: these sheep had higher cortisol concentrations and cardiac frequency than the S group, a finding that is consistent with studies on other painful situations (e.g. dehorning: Stafford and Mellor (2005)). The implantation of three cannulas resulted in changes in all pathways, suggesting that post-operative administration of NSAIDs to treat inflammation was not sufficient to limit the pain felt by RDI sheep. Although an antalgic effect of flunixin on visceral pain has been described in horses (Valverde and Gunkel, 2005), the visceral pain felt by RDI sheep did not appear to be sufficiently alleviated by NSAID administration.

The extent of the response to pain varied with the intensity of the experimental situation: one pathway was affected in group S, three pathways were affected in group R and five pathways were affected in group RDI. However, analysis of each pathway on its own provided acceptable but partial discrimination between these experimental situations, as shown by the sensitivity and specificity of detection when considering only behaviour (Se, 0-67%, Sp, 67-

100%), Inflammation (Se, 0-83%, Sp, 88-100%), HPA axis (Se, 0-100%, Sp, 82-91%), ANS (Se, 0-50 %, Sp, 71-83%) or Oxidative stress (Se, 17-50%, Sp, 65-100%).

Multiparametric analysis of pain responses. We tested the ability of a multiparametric factorial discriminant analysis (FDA), gathering information from five pathways, to enhance the discrimination between sheep responses to these experimental situations. The FDA showed that sheep differed in terms of variables from five pathways when they experienced a more or less invasive surgery (RDI and R sheep) or no surgery at all (C and S) sheep. Surgery induced a higher inflammation (i.e. haptoglobin), hypothalamic–pituitary–adrenal axis activation (i.e., elevated cortisol concentrations), changes in behaviour (i.e. increased antalgic postures, lowered head position and/or teeth grinding, clinical signs and lower alertness) and increased oxidative stress (i.e. increased NO production and a lower GSH/GSSG ratio). These changes increased along with the surgery invasiveness. These results are consistent with those reported in the literature; visceral surgery or castration has been reported to increase inflammation, hypothalamic–pituitary–adrenal axis activation and behaviour pathways (Earley and Crowe, 2002, Rialland et al., 2014). The multiparametric approach performed well for this discrimination, as reflected by the high level of sensitivity (83% for R sheep and 100% for RDI sheep). The multiparametric analysis also gave information on the relative contribution of each pathway to the global sheep response. Input from all pathways, and especially from Inflammation, HPA axis and Behaviour, was necessary to better identify animals belonging to the R and RDI groups, showing the complexity of assessment in different surgical situations.

Conclusion

The discrete analysis of the individual pathways provided acceptable discrimination between the four experimental situations (C, S, R and RDI). The multiparametric analysis, which combines information from the five pathways involved in pain, enhanced the effectiveness in discriminating between the experimental situations, with high sensitivity and specificity to detect R and RDI animals. Moreover, the multiparametric analysis provided additional information, on the relative contribution of each pathway to the global sheep response. The response patterns were found to vary depending on the severity of the surgical procedure. Therefore the multiparametric approach seems to be a promising tool to discriminate between different degrees of invasiveness of surgical procedures. In the future, it will be interesting to validate this multiparametric approach in other pain-inducing situations or in other species.

Acknowledgements

The authors wish to acknowledge André Guittard, Michel Fabre, Sebastien Alcouffe, Philippe Gaydier and Daniel Thomas for their excellent technical assistance during the experiments, and Agnès Thomas, Anne-Sophie Bage, Hervé Chandèze, Eric Delval, Stéphane Andanson and Christine Ravel for their assistance with the laboratory analyses. The authors wish to acknowledge American Journal Experts for their editorial support.

References

- Arlot S and Celisse A 2010. A survey of cross-validation procedures for model selection. 40-79.
- Auboiron S, Sparrow DA, Beaubatie L, Bauchart D, Sparrow JT, Laplaud PM and Chapman MJ 1990. Characterization and amino-terminal sequence of apolipoprotein AI from plasma high density lipoproteins in the preruminant calf, *Bos spp.* *Biochem Biophys Res Commun* 166, 833-839.
- Boissy A and Bouissou MF 1994. Effects of androgen treatment on behavioral and physiological responses of heifers to fear-eliciting situations. *Hormones and Behavior* 28, 66-83.
- Bussièrès G, Jacques C, Lainay O, Beauchamp G, Leblond A, Cadoré JL, Desmaizières LM, Cuvelliez SG and Troncy E 2008. Development of a composite orthopaedic pain scale in horses. *Research in Veterinary Science* 85, 294-306.
- Earley B and Crowe MA 2002. Effects of ketoprofen alone or in combination with local anesthesia during the castration of bull calves on plasma cortisol, immunological, and inflammatory responses. *J Anim Sci* 80, 1044-1052.
- Fisher AD, Verkerk GA, Morrow CJ and Matthews LR 2002. The effects of feed restriction and lying deprivation on pituitary–adrenal axis regulation in lactating cows. *Livestock Production Science* 73, 255-263.
- Gadek-Michalska A, Spycka J and Bugajski J 2005. Psychosocial stress affects the involvement of prostaglandins and nitric oxide in the lipopolysaccharide-induced hypothalamic-pituitary-adrenal response. *J Physiol Pharmacol* 56, 287-298.
- Gobert M, Martin B, Ferlay A, Chilliard Y, Graulet B, Pradel P, Bauchart D and Durand D 2009. Plant polyphenols associated with vitamin E can reduce plasma lipoperoxidation in dairy cows given n-3 polyunsaturated fatty acids. *Journal of Dairy Science* 92, 6095-6104.
- Graubner C, Gerber V, Doherr M and Spadavecchia C 2011. Clinical application and reliability of a post abdominal surgery pain assessment scale (PASPAS) in horses. *The Veterinary Journal* 188, 178-183.
- Grøndahl-Nielsen C, Simonsen HB, Damkjær Lund J and Hesselholt M 1999. Behavioural, Endocrine and Cardiac Responses in Young Calves Undergoing Dehorning Without and With Use of Sedation and Analgesia. *The Veterinary Journal* 158, 14-20.
- Guesgen MJ, Beausoleil NJ, Minot EO, Stewart M, Stafford KJ and Morel PCH 2016. Lambs show changes in ear posture when experiencing pain. *Animal Welfare* 25, 171-177.
- Güllner H-G 1983. Prostaglandin actions on the adrenergic nervous system. *Klinische Wochenschrift* 61, 533-540.
- Kanehisa M 1988. A multivariate analysis method for discriminating protein secondary structural segments. *Protein Eng* 2, 87-92.
- Kent JE, Molony V and Robertson IS 1993. Changes in plasma cortisol concentration in lambs of three ages after three methods of castration and tail docking. *Research in Veterinary Science* 55, 246-251.
- Lebart L, Piron M and Morineau A 1995. Statistique exploratoire multidimensionnelle. In (ed. Dunod).

- Lonardi C, Scollo A, Normando S, Brscic M and Gottardo F 2015. Can novel methods be useful for pain assessment of castrated piglets? *animal* 9, 871-877.
- Lykkesfeldt J and Svendsen O 2007. Oxidants and antioxidants in disease: Oxidative stress in farm animals. *The Veterinary Journal* 173, 502-511.
- Martin P and Bateson P 2013. *Measuring behaviour: an introductory guide*. Cambridge University Press.
- Melches S, Mellema SC, Doherr MG, Wechsler B and Steiner A 2007. Castration of lambs: A welfare comparison of different castration techniques in lambs over 10 weeks of age. *The Veterinary Journal* 173, 554-563.
- Molony V and Kent JE 1997. Assessment of acute pain in farm animals using behavioral and physiological measurements. *J Anim Sci* 75, 266-272.
- Payne WW and Poulton EP 1923. Visceral pain in the upper alimentary tract. *Quarterly journal of Medicine* 65, 53-80.
- Perrière G and Thioulouse J 2003. Use of correspondence discriminant analysis to predict the subcellular location of bacterial proteins. *Computer Methods and Programs in Biomedicine* 70, 99-105.
- Prunier A, Mounier L, Le Neindre P, Leterrier C, Mormede P, Paulmier V, Prunet P, Terlouw C and Guatteo R 2013. Identifying and monitoring pain in farm animals: a review. *animal* 7, 998-1010.
- Rialland P, Otis C, de Courval ML, Mulon PY, Harvey D, Bichot S, Gauvin D, Livingston A, Beaudry F, Hélie P, Frank D, del Castillo JRE and Troncy E 2014. Assessing experimental visceral pain in dairy cattle: A pilot, prospective, blinded, randomized, and controlled study focusing on spinal pain proteomics. *Journal of Dairy Science* 97, 2118-2134.
- Röhrig B, du Prel J-B, Wachtlin D, Kwiecien R and Blettner M 2010. Sample size calculation in clinical trials. *Deutsches Arzteblatt* 107, 552-556.
- Ruzic B, Tomaskovic I, Trnski D, Kraus O, Bekavac-Beslin M and Vrkic N 2005. Systemic stress responses in patients undergoing surgery for benign prostatic hyperplasia. *BJU Int* 95, 77-80.
- Salvemini D, Little JW, Doyle T and Neumann WL 2011. Roles of reactive oxygen and nitrogen species in pain. *Free Radic Biol Med* 51, 951-966.
- Stafford KJ and Mellor DJ 2005. Dehorning and disbudding distress and its alleviation in calves. *The Veterinary Journal* 169, 337-349.
- Valverde A and Gunkel CI 2005. Pain management in horses and farm animals. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* 15, 295-307.
- Veissier I and Boissy A 2007. Stress and welfare: two complementary concepts that are intrinsically related to the animal's point of view. *Physiol Behav* 92, 429-433.
- Vinuela-Fernandez I, Jones E, Welsh EM and Fleetwood-Walker SM 2007. Pain mechanisms and their implication for the management of pain in farm and companion animals. *Vet J* 174, 227-239.

Table 1: *Behaviours recorded in sheep during the days after experimental surgery.*

Behaviour	Definition
Alertness	The sheep is quiet but the head is raised, turns to observers and both ears are positioned forward of the perpendicular (Guesgen <i>et al.</i> , 2016)
Antalgic postures	Arched back : The sheep's head is below its shoulder height and the line of spinal column is arched Standing with the body leaning against a wall Lying with hind legs stretched : the sheep's body is resting in contact with the floor (on the right or left side) and its hind legs are stretched (Molony and Kent, 1997, Melches <i>et al.</i>, 2007)
Clinical signs	The sheep's eyes are sunken into their orbits Panting : open-mouth and / or rapid breathing Hair raised : the sheep's wool is raised on the head Colic : repeated attempts to lie down
Abnormal feeding	Response to food distribution: sheep does not eat at the time of distribution of the feed ration
Head position and/or teeth grinding	Head position : the sheep is standing and his head is oriented to a corner of the stall Teeth : grinding the teeth

Table 2: Effect of treatments (C, S, R and RDI) on behavioural responses (alertness, antalgic postures, clinical signs, abnormal feeding and head position and teeth grinding) and on AUC physiological variables of inflammation, Hypothalamo-Pituitary-Adrenal axis, Autonomous nervous system and oxidative stress in Texel sheep; median [1st quartile -3rd quartile] and P values for treatment effect.

	Treatment								
	C		S		R		RDI		P-Value
Behaviour									
Alertness (%)	90.6 ^a	[81.2 – 100]	87.5 ^a	[82.8 – 87.5]	78.1 ^a	[70.3 – 85.9]	59.4 ^b	[46.8 – 67.2]	0.006
Antalgic postures (%)	0.00 ^a	[0.00 – 0.00]	0.00 ^a	[0.00 – 0.00]	0.00 ^a	[0.00 – 4.69]	12.5 ^b	[12.5 – 12.5]	0.001
Clinical signs (%)	0.00 ^a	[0.00 – 0.00]	0.00 ^{ab}	[0.00 – 0.00]	2.34 ^{bc}	[1.56 – 3.12]	6.25 ^c	[4.54 – 17.9]	0.001
Abnormal feeding (%)	0.00 ^a	[0.00 – 34.1]	4.54 ^{ab}	[0.00 – 36.4]	27.8 ^{ab}	[4.55 – 36.7]	47.3 ^b	[37.2 – 68.2]	0.106
Head position and/or teeth grinding (%)	0.00 ^a	[0.00 – 2.34]	1.56 ^a	[0.00 – 3.12]	1.56 ^a	[0.00 – 5.47]	10.9 ^b	[7.03 – 12.5]	0.006
Inflammation									
Haptoglobin (mg.d/mL) ¹	0.04 ^a	[0.01 – 0.04]	0.03 ^a	[0.01 – 0.04]	1.93 ^b	[1.79 – 2.65]	3.91 ^b	[2.86 – 4.15]	0.0007
Hypothalamo - Pituitary - Adrenal axis									
Cortisol (ng.d/mL) ¹	31.6 ^{a,A}	[22.6 - 32.9]	26.5 ^a	[24.3 – 51.5]	53.3 ^{ab,B}	[37.9 – 122]	154 ^b	[142 - 160]	0.006
Autonomous Nervous System									
Heart rate (bpm.d) ¹	370 ^{ab}	[354 – 397]	339 ^a	[324 – 358]	363 ^{ab}	[341 – 386]	425 ^b	[423 – 450]	0.137
LF/HF ²	6.35	[4.57 – 9.17]	3.80	[3.73 – 5.42]	6.21	[4.98 – 9.83]	8.58	[5.19 – 11.1]	0.433
RMSSD (s 10 ⁻³ .d) ¹	325 ^A	[229 – 442]	341	[327 – 353]	311	[181 – 404]	94.4 ^B	[90.4 – 198]	0.356
Oxidative stress									
MDA (µg.d/mL) ¹	0.77	[0.70 – 0.80]	0.76	[0.66 – 0.90]	0.82	[0.77 – 0.94]	0.86	[0.79 – 0.92]	0.467
TAS (mmol.d/L) ¹	5.85	[5.81 – 5.87]	5.8	[5.68 – 5.88]	5.81	[5.69 – 5.88]	5.64	[5.60 – 5.66]	0.622
NO (µmol.d/mL) ¹	166 ^{a, A}	[135 – 193]	212 ^{abAC}	[198 – 255]	212 ^{ab,BC}	[184 – 226]	265 ^{b,D}	[259 – 268]	0.026
GSH/GSSG ³	3.78 ^a	[3.09 – 4.94]	3.46 ^a	[3.22 – 4.81]	2.80 ^{ab}	[1.65 – 3.26]	0.99 ^b	[0.95 – 1.78]	0.066

C = Control: no fasting, no anaesthesia, no surgery (n = 6); S = Sham: fasting, anaesthesia, but no surgery (n = 6); R = fasting, anaesthesia, rumen cannulation (n=6); RDI = fasting, anaesthesia, cannulation of the rumen, duodenum and ileum (n = 5). Different superscripts within a row indicate a significant (P < 0.05) difference between treatments (Dunn test); Different capital superscripts within a row indicate a trend (0.05 < P < 0.10) difference between treatments (Dunn test).

bpm: beat per minute

¹ Area under the curve from day 0 to day 5 after treatments

² LF and HF are expressed in ms², but their ratio does not include unit.

³ GSH and GSSG are expressed in, nmole/mL but their ratio does not include unit.

Table 3: Factorial discriminant analysis (FDA) performed on each pathway (behaviour, inflammation, hypothalamo –pituitary - adrenal axis, autonomous nervous system and oxidative stress) and on all pathways in C, S, R and RDI Texel sheep. The proportion of variance explained by the components (axes) and correlation of each variable to the components is given.

FDA on Behaviour	Axis 1	Axis 2	Axis 3
Proportion of total variance explained by axis	99.1%	0.87%	0.03%
Correlation of each variable to the axes :			
Alertness	-0.80	0.29	0.42
Antalgic postures	0.92	0.01	-0.23
Head position and/or teeth grinding	0.78	0.02	0.60
Clinical signs	0.68	0.05	-0.50
Abnormal Feeding	0.62	-0.02	-0.27
FDA on Inflammation	Axis 1	-	-
Proportion of total variance explained by axis	100%	-	-
Correlation of each variable to the axes :			
Haptoglobin	1	-	-
FDA on Hypothalamo –Pituitary - Adrenal axis	Axis 1	-	-
Proportion of total variance explained by axis	100%		-
Correlation of each variable to the axes :			
Cortisol	1	-	-
FDA on Autonomous Nervous System	Axis 1	Axis 2	Axis 3
Proportion of total variance explained by axis	85.0%	14.7%	0.4%
Correlation of each variable to the axes :			
Heart rate	0.85	0.51	0.16
LH/HF	0.27	-0.01	0.96
RMSSD	-0.62	0.42	-0.66
FDA on Oxidative stress	Axis 1	Axis 2	Axis 3
Proportion of total variance explained by axis	96.1%	3.1%	0.8%
Correlation of each variable to the axes :			
MDA	-0.37	0.81	-0.19
TAS	0.32	0.45	0.07
NO	-0.80	-0.12	0.57
GSH/GSSG	0.69	-0.05	0.70
FDA on all pathways (Behaviour, Inflammation, Hypothalamo - Pituitary - Adrenal axis, Autonomous Nervous System, Oxidative stress)	Axis 1	Axis 2	Axis 3
Proportion of total variance explained by axis	98.8%	1.19%	0.01%
Correlation of each variable to the axes :			
Haptoglobin	0.89	0.44	-0.14
Cortisol	0.85	-0.07	0.52
LH/HF	0.23	-0.17	0.55
Heart rate	0.50	-0.03	0.24
RMSSD	-0.40	0.18	-0.58
MDA	0.35	0.22	0.10
TAS	-0.23	-0.37	0.11
NO	0.64	-0.15	-0.29
GSH/GSSG	-0.57	-0.07	0.13
Alertness	-0.69	0.39	-0.02
Antalgic postures	0.85	-0.48	-0.22
Head position and/or teeth grinding	0.73	0.08	0.14
Clinical signs	0.67	-0.61	0.15
Abnormal feeding	0.43	-0.07	0.15

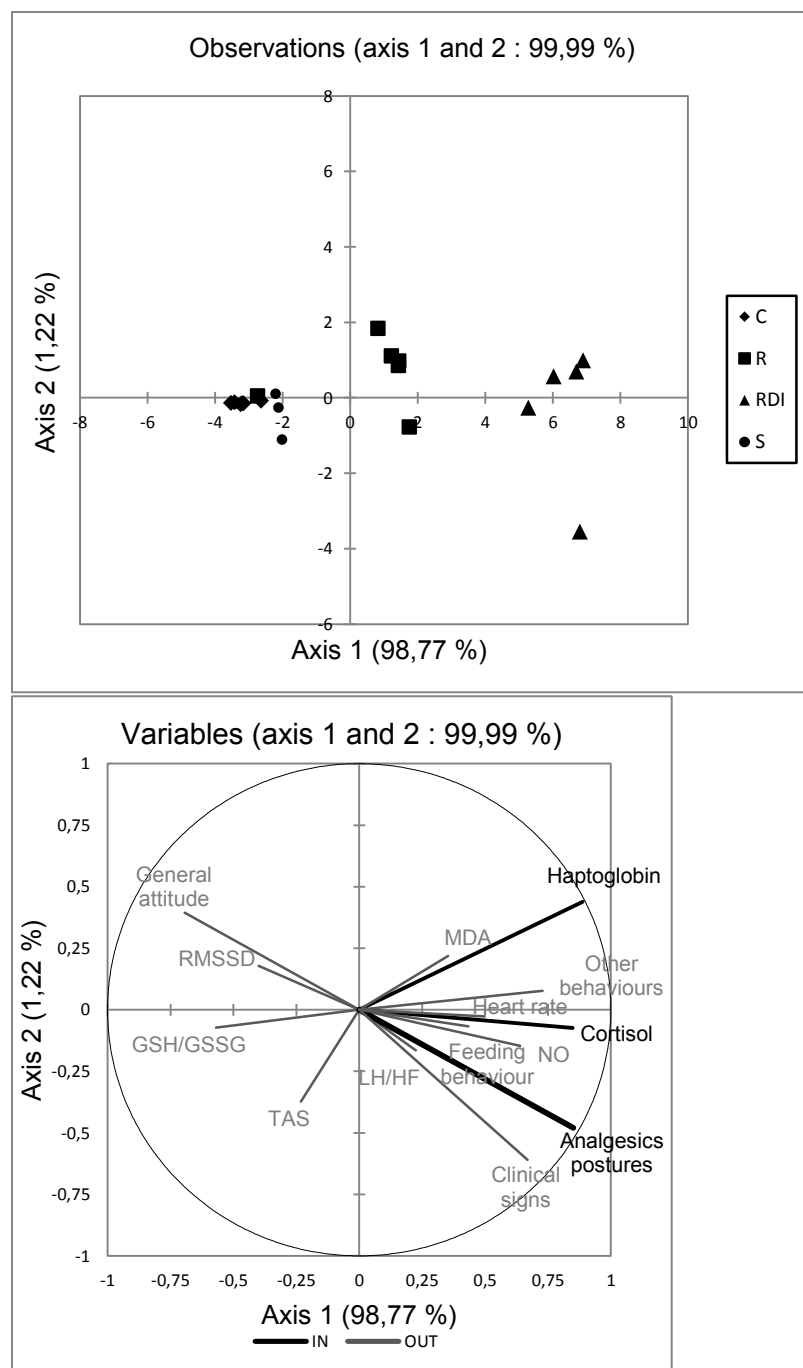
C = Control: no fasting, no anaesthesia, no surgery (n = 6); S = sham: fasting, anaesthesia, but no surgery (n = 6); R = fasting, anaesthesia, rumen cannulation (n=6); RDI = fasting, anaesthesia, cannulation of the rumen, duodenum and ileum (n = 5).

Table 4: Cross validation, Sensitivity and Specificity of the Factorial Discriminant Analyses (FDA) performed on each pathway (behaviour, inflammation, hypothalamo – pituitary - adrenal axis, autonomous nervous system and oxidative stress) and on all pathways in C, S, R and RDI Texel sheep.

	From \ Towards	C	S	R	RDI	Sensitivity (%)	Specificity (%)
FDA on Behaviour	C	3	2	1	0	50	83
	S	3	0	3	0	0	72
	R	2	3	1	0	16	67
	RDI	0	0	2	4	67	100
FDA on Inflammation	C	5	1	0	0	83	100
	S	6	0	0	0	0	88
	R	0	1	3	2	50	94
	RDI	0	0	1	4	80	89
FDA on Hypothalamo – Pituitary - Adrenal axis	C	5	1	0	0	83	91
	S	4	0	2	0	0	82
	R	1	2	1	2	17	88
	RDI	0	0	0	5	100	89
FDA on Autonomous Nervous System	C	2	2	1	1	33	72
	S	1	3	2	0	50	71
	R	2	2	0	2	0	76
	RDI	1	1	1	2	40	83
FDA on Oxidative stress	C	3	2	1	0	50	100
	S	2	2	2	0	33	71
	R	0	3	1	2	17	65
	RDI	0	0	3	2	40	89
FDA on all pathways (Behaviour, Inflammation, Hypothalamo – Pituitary - Adrenal axis, Autonomous Nervous System, Oxidative stress)	C	5	1	0	0	83	100
	S	3	3	0	0	50	88
	R	0	1	5	0	83	100
	RDI	0	0	0	5	100	100

C = Control: no fasting, no anaesthesia, no surgery (n = 6); S = sham: fasting, anaesthesia, but no surgery (n = 6); R = fasting, anaesthesia, rumen cannulation (n=6); RDI = fasting, anaesthesia, cannulation of the rumen, duodenum and ileum (n = 5).

Figure 1. Factorial map of the two discriminant axes of the analysis on four treatments of sheep: Control (C, no fasting, no anaesthesia, no surgery, n = 6), Sham (S, fasting, anaesthesia, but no surgery, n = 6); Rumen (R, fasting, anaesthesia, rumen cannulation, n=6), and Rumen Duodenum Ileum group (RDI, fasting, anaesthesia, cannulation of the rumen, duodenum and ileum, n = 5). The map on the left side represents the variables kept in final model, and the map on the right side represents the individuals.



Publication N°4**A multiparametric approach to discriminate various more or less painful situations and to assess the effectiveness of multimodal analgesia following castration in sheep****M. Faure, A. de Boyer des Roches, A. de la Foye, D. Durand***The Veterinary Journal en préparation*

Résumé : La castration des ruminants est reconnue comme une procédure douloureuse. La méthode de castration via la pince burdizzo est connue pour induire des douleurs par excès de nociception. Cette étude a pour objectif de discriminer des situations plus ou moins douloureuses après la castration de Burdizzo chez le mouton en utilisant une approche multiparamétrique. L'étude a été faite sur vingt-quatre moutons Texel séparés en trois traitements définis selon l'intensité douloureuse. Cette intensité douloureuse a été expérimentalement modulée via des protocoles médicamenteux différents : les ovins du traitement Burd étaient castrés sans aucune anesthésie ni analgésie, les ovins du traitement Burd+LA recevaient une anesthésie locale et les ovins du traitement Burd+LA+NSAID recevaient une anesthésie locale et un anti-inflammatoire non stéroïdien (AINS). Quelle que soit la période, l'approche multiparamétrique a distingué les trois traitements avec une bonne performance. En P1 (période où l'anesthésie locale était efficace), les moutons Burd sont expliqués par l'axe hypothalamo-hypophyso (AHH), l'inflammation et les réponses comportementales. En P2 (période pendant laquelle les AINS sont efficaces) et en P3 (période pendant laquelle les molécules n'agissent plus) les moutons Burd + LA montrent des réponses plus élevées que les moutons Burd + LA + NSAID tandis que ceux du Burd sont intermédiaires. Ces résultats ont permis de montrer que (i) l'approche multiparamétrique pouvait discriminer plusieurs situations plus ou moins douloureuses (ii) l'anesthésie locale seule est moins efficace que l'analgésie multimodale pour soulager la douleur chez le mouton.

Original Article

A multiparametric approach to discriminate various more or less painful situations and to assess the effectiveness of multimodal analgesia following castration in sheep

M. FAURE^{a,b}, A. DE BOYER DES ROCHES^{a,b}, A. DE LA FOYE^{a,b}, D.DURAND^{a,b,*}

^a INRA, UMR 1213 Herbivores, F-63122 Saint-Genès-Champanelle, France

^b Université de Lyon - VetAgro Sup, UMR 1213 Herbivores, F-69280 Marcy l'Etoile, France

* Corresponding author. Tel.: 0473624227

E-mail address: denys.durand@clermont.inra.fr

Abstract

Castration of ruminants induces pain. There is a lack of knowledge on the effects of local anaesthesia and/or non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) on the pain induced by castration in sheep. This study aimed to discriminate more or less painful situations after Burdizzo castration in sheep using a multiparametric approach. Twenty-four male Texel sheep were Burdizzo-castrated receiving: physiological serum (Burd), local anaesthesia (Burd+LA), local anaesthesia and a NSAID (Burd+LA+NSAID) . Regardless of the period, the multiparametric approach discriminated the three treatments with good performance. In P1 (period when local anaesthesia was effective), Burd sheep showed the highest hypothalamic–pituitary–adrenal axis (HPA), inflammation and behaviour responses; Burd+LA sheep had high levels of HPA axis and inflammation responses; and Burd+LA+NSAID sheep had higher body temperatures. In P2 (periods when the NSAIDs were effective) and P3 (phase when drug action was completed), Burd+LA sheep showed the highest responses, Burd+LA+NSAID sheep showed the lowest responses while the Burd group showed intermediate responses. Our results showed that (i) a multiparametric approach could discriminate various more or less painful situations (ii) local anaesthesia alone was less effective than multimodal analgesia to alleviate pain in sheep.

Keywords: multimodal analgesia, pain assessment, sheep, castration, multiparametric approach

INTRODUCTION

In commercial farms, the castration of ruminants is a routine practice used to improve meat quality and reduce aggression and sexual activity (Stilwell et al., 2008). Castration can be performed by surgical removal of the testicles with rubber rings or a Burdizzo clamp. Burdizzo castration induces skin damage in subcutaneous tissues and spermatic cords, an increase in the activity of afferent nerves in the spermatic cord and a lowering of mechanoreceptors, causing acute somatic and visceral pain (Mellema et al., 2006). Burdizzo clamp castration was chosen in this study because it induces both somatic and visceral pain. The inflammatory phase then arises from the tissue damage causing pain (Coetzee, 2013). Administering analgesic compounds before castration mitigates the inflammatory phase (Coetzee, 2013). In lambs, local anaesthesia with lidocaine reduced the pain response for 120 min after the Burdizzo castration (Mellema et al., 2006). Local anaesthesia also induces an inflammatory response in the days following the castration (Ting et al., 2003). Therefore, effective analgesia requires a multimodal approach combining several compounds that act on different receptor targets along the nociceptive pathway (Coetzee, 2013). In cattle, multimodal analgesia is more effective at reducing pain than anaesthesia alone during a Burdizzo castration (Stafford et al, 2002).

An assessment of pain levels helps evaluate the efficiency of a drug protocol. In ruminants, studies on pain and drug efficiency following castration have relied on the assessment of different pathways: behaviour (e.g., abnormal standing or lying, Robertson et al., 1994); the stress response of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis (HPA) (e.g., cortisol release (Mellema et al., 2006)); the autonomous nervous system (SNA) (e.g., an increase in heart rate (Pieler et al., 2013)); oxidative stress (e.g., total antioxidant status (Ting et al., 2003)); and inflammation (e.g., haptoglobin, (Earley and Crown 2002)). Some indicators are very specific and sensitive to pain (behavioural changes), whereas others are more generally

related to stressful situations (HPA axis and SNA); however, combining various types of indicators increases the chance of detecting and evaluating pain intensity (Prunier et al., 2013).

This study was designed to discriminate more or less painful situations after Burdizzo castrations in sheep, and we hypothesized that a multiparametric approach, combining several indicators, is efficient at discriminating various more or less painful situations and assessing drug protocol effectiveness. Painful situations were modulated by the following 3 combinations of drugs: no pain killers, local anaesthesia, and local anaesthesia and NSAIDs.

MATERIALS AND METHODS

Animals, housing and diets

This experiment was carried out with the approval of the Regional Ethics Committee for Experiments on Animals CEMEA Auvergne (CE....). Twenty-four male Texel sheep (12 months old, 54.2 ± 0.35 kg) were used. The sheep were housed in threes in shaving-bedded pens measuring 3×5 m. The sheep received water ad libitum and a diet based on hay (80 %) and concentrate (20 %) to fulfil their requirements and intake capacity.

Treatments and study design (figure 1)

Twenty-four sheep were Burdizzo-castrated, and local anaesthesia (LA) and non-steroidal anti-inflammatory (NSAID) treatments were replaced with physiological serum (Burd, $n = 8$), LA only (Burd+LA, $n = 8$) or a combination of LA and NSAID (Burd+LA+NSAID, $n = 8$). To allocate sheep to the various treatments, we designed eight blocks of three sheep and, then, within each block, the sheep were randomly allocated to one of the three treatments. Two weeks before the castration, sheep were habituated to the housing conditions and handling for blood sampling and to the sitting position for castration.

Drug protocol and castration

The scrotal necks of Burd, Burd+LA and Burd+LA+NSAID sheep were disinfected with a diluted povidone iodine solution (Betadine, Provet AG). Then, 2.5 mL of lidocaine hydrochloride (Lidocaine HCl 2 %, 20 mg/mL, BIMEDA) were injected into each spermatic cord, and 5 mL were injected subcutaneously around the scrotal neck. Burd sheep received 10 mL of physiological saline (0.9 % NaCl) injected in a manner similar to the Burd+LA and Burd+LA+NSAID groups. After administration of the drugs, the sheep were maintained in a normal position. Ten minutes after these injections, the sheep were again placed in the sitting position for the castration. Each spermatic cord and associated scrotal tissue were crushed once for 1 min with a Burdizzo clamp (50 cm, Provet AG). During the castration, the Burd+LA+NSAID sheep received 2 mL of NSAID (flunixin meglumine, FINADYNE®, 50 mg, INTERVET). Burd and Burd+LA sheep received 2 mL of physiological saline.

Periods of observations

Behavioural observations and physiological measurements were performed for 78 hours. The experimental period was divided into 3 periods based on the duration of the drug effects. The first period (P1) corresponded to the local anaesthesia effects, lasted for two hours after the castration. The second period (P2) corresponded to NSAID effects, began 2 hours after the castration and lasted for 36 hours after the castration. The third period (P3), from 48 hours to 78 hours after the castration, corresponded to the phase during which the drug action was finished.

Measurements of behavioural responses

Behavioural observations were conducted by seven blind observers trained to observe animal behaviour. Behavioural observation recordings were made with an application

“EvaDoul”, which was developed by the INRA research team and installed on a digital tablet (ASUS France). The ethogram is described in Table 1.

Physiological measurements

For each animal, blood samples were collected by venepuncture from the jugular vein to determine physiological parameters. Blood samples were collected in vacutainer tubes containing Na₂-EDTA (2 tubes of 10 mL) or lithium heparin (2 tubes of 10 mL). Rectal temperature was measured, and the concentrations of plasma haptoglobin and Serum amyloid A (SAA) were determined by immunoprecipitation (Auboiron et al., 1990) using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (catalogue No. TP 802, Tridelta Development Limited). The concentration of plasma cortisol, non-esterified fatty acids (NEFA) and glucose were determined by a radioimmunoassay method (Boissy et al., 1994) and enzymatic and colorimetric methods, respectively (Trinder et al., 1969; Scislowski and al., 2005). Heart rates were recorded for three sheep in each group by monitoring the electrocardiogram (ECG). For each animal, the records began simultaneously at 1 h before castration and continued until 78 h after castration. Heart rate measurements were determined in phases of 15 minutes or 30 minutes, representing diurnal phases without any human intervention (care, food, blood samples, etc.). Heart rate variability (HRV) was measured by determining R–R intervals (Stubsj  en et al., 2015), RMSSD (Von Borell et al., 2007) and the ratio LF/HF (Despr  s et al., 2003). Glutathione plasma concentrations (reduced forms, GSH and oxidized forms, GSSG), vitamin A and E and nitric oxide (NO) were measured by high performance liquid chromatography (HPLC) (Martin et al., 1991), HPLC-UV spectrophotometry (Scislowski et al., 2005) and a fluorometric assay kit (item NO. 780051, Cayman Chemical Company), respectively.

Statistical analyses

We established behavioural categories from several behavioural observations (e.g., “facial expression” gathered "Upper-lip curl" and "Nose wrinkling"). Each behavioural item was assigned a weight, which was multiplied by its frequency of observation in each phase and sheep, leading to weighted scores. Within a behavioural category, for each phase and sheep, the weighted scores were summed and divided by the maximum reachable weighted score, leading to a final composite score of 0 to 100 percent. For the physiological measurements, we calculated the mean concentration by period. For each period, we performed a factorial discriminant analysis (FDA) to statistically discriminate the three treatments. We conducted the analysis using all behavioural and physiological (inflammation, oxidative stress, HPA and SNA) measures. To identify linear combinations of variables that best discriminate the three treatments, we simplified the full model by a backward stepwise elimination of variables as follows: the threshold to maintain or remove a variable from the final model was set to $P = 0.05$. To interpret the discriminant components of each FDA, we focused on the variables with a correlation of an absolute value with the axis higher than 0.3. Finally, we estimated the performances of the final predictive model by conducting a leave-one-out cross-validation. The number of sheep correctly classified after the cross-validation allowed us to calculate the performances of the final model as follows: the accuracy ($Ac = (\text{True Positive} + \text{True Negative}) / (\text{True Negative} + \text{False Negative} + \text{True Positive} + \text{False Positive})$), the sensitivity (percentage of sheep correctly predicted to feel pain; $Se = \text{True Positive} / \text{True Positive} + \text{False Negative}$) and specificity (percentage of sheep correctly predicted not to feel pain; $Sp = \text{True Negative} / \text{True Negative} + \text{False Positive}$). All analyses were performed using XLSTAT 2015.

RESULTS

The discrimination of the 3 groups (Burd, Burd+LA, Burd+LA+NSAID) was tested during the P1 period (i.e., the action of local anaesthesia) (Figure 2). Twelve indicators were used in the final model (Table 2). Axes 1 and 2 contributed to 84.8 % and 15.2 % of the variance explained by the model, respectively. Axis 1 was mostly explained (correlation of each variable to the component) by body temperature (0.49), haptoglobin (-0.45), NEFAs (-0.44) and cortisol (-0.43). This axis opposed Burd+LA sheep to Burd+LA+NSAID sheep, with Burd sheep being intermediate. Axis 2 was mostly explained by abnormal activities (0.60), glucose (0.51), cortisol (0.45) and SAA (0.32). Axis 2 opposed Burd sheep to Burd+LA and Burd+LA+NSAID sheep. Figure 2 suggests that the higher the temperature and the lower the haptoglobin, NEFAs and cortisol levels, the higher the chance of belonging to the Burd+LA+NSAID group and the lower the chance of belonging to the Burd + LA group. Furthermore, the Burd group was characterized by a combination of higher levels of abnormal activities, glucose, cortisol and SAA. After the cross-validation, the Burd+LA sheep and Burd+LA+NSAID sheep were all correctly classified into their original groups, leading to an accuracy of 95 %, a sensitivity of 100 % and a specificity of 100 % for both treatments. Among the seven Burd sheep, two Burd animals were classified as Burd+LA and Burd+LA+NSAID. This led to an accuracy of 90 %, a sensitivity of 71 % and a specificity of 100 % (Table 3).

The Burd, Burd+LA and Burd+LA+NSAID groups were discriminated by FDA during the P2 period (i.e., duration of NSAID action) (Figure 3). Axis 1 gathered information regarding 17 indicators and contributed to 100 % of the variance explained by the model (Table 4). Axis 1 was mainly explained by glucose (-0.58), NEFAs (-0.39), abnormal activities (-0.51), clinical signs (-0.34) and body temperature (0.41). This axis opposed Burd+LA sheep to Burd+LA+NSAID sheep with Burd sheep being intermediate. The higher

the temperature and the lower the glucose, NEFAs levels, abnormal activities and clinical signs, the higher the chance of belonging to the Burd+LA+NSAID group and the lower the chance of belonging to the Burd+LA group (Figure 3). After the cross-validation, all sheep were correctly classified in their original groups, leading to an accuracy, sensitivity and specificity of 100 % in all cases (Table 5).

The Burd, Burd+LA and Burd+LA+NSAID groups were discriminated by FDA during the P3 period during which the actions of the analgesia were over (Figure 4). Axis 1 gathered information regarding 14 indicators and contributed to 99.7 % of the variance explained by the model (Table 6). Axis 1 was mainly explained by abnormal activities (0.29), haptoglobin (0.68), glucose (0.45), vitamin A (-0.31), and heart rate (0.38). Axis 1 opposed Burd+LA sheep to Burd+LA+NSAID sheep, and Burd sheep were, once again, intermediate. Figure 4 suggests that the higher the level of vitamin A and the lower the abnormal activities, haptoglobin, glucose and heart rate, the higher the chance of belonging to the Burd+LA + NSAID group and the lower the chance of belonging to the Burd + LA group. After the cross-validation, the sheep from all three groups were correctly classified, leading to an accuracy, sensitivity and specificity of 100 % in all cases (Table 7).

DISCUSSION

This study used a multiparametric analysis combining information regarding five pathways (behaviour, the HPA axis, inflammation, oxidative stress and autonomic nervous system pathways) to discriminate three more or less painful situations in sheep after castration and assess the effectiveness of pain-relief drug protocols. The multiparametric approach allowed us to correctly classify the sheep for the 3 periods. All pathways were relevant to discriminating the different groups. Behaviour, inflammation and the HPA axis played the

most important roles in this discrimination. The multimodal analgesia combining local anaesthesia and NSAIDs was more effective at relieving pain compared to local anaesthesia alone.

During the action of local anaesthesia (P1 period, i.e., 0 to 2 h after castration), the three groups were well discriminated (90 %–95 % for accuracy). This discrimination mainly relied on the HPA axis and inflammatory responses (Axis 1) and behaviour (Axis 2). Analgesic administration (local anaesthesia in Burd+LA or multimodal analgesia in Burd+LA+NSAID) reduced pain expression in animals as follow: Burd sheep had higher inflammatory and HPA axis responses. They also tended to express more abnormal activities than the Burd+LA and Burd+LA+NSAID sheep. These results confirm that analgesic administration is needed when castrating sheep (Mellema, et al, 2006 ; Melches et al, 2007). Compared to local anaesthesia (Burd+LA), multimodal analgesia (Burd+LA+NSAID) limited the HPA axis and inflammatory responses more, confirming previous reports by Ting et al. (2003). As previously reported (Mellema et al., 2006; Melches et al., 2007), acute pain responses during Burdizzo castration are not completely abolished by local anaesthesia. NSAID treatment may have inhibited COX enzyme activity, reducing the synthesis of prostaglandins, which are key mediators of stress-induced corticotropin-releasing hormone secretion and inflammatory processes (Gadek-Michalska et al.; 2005). Therefore, during the first two hours after castration, the multiparametric approach allowed us to discriminate the three groups of sheep. According to the results, we can assume that the group that feel the strongest pain is the Burd group, whereas the Burd+LA+NSAID group did not appear to feel pain and the Burd+LA group appeared to feel pain intermediate between the other two groups. A multimodal analgesia showed the greatest efficiency at relieving pain.

During the P2 period (i.e., NSAIDs effects: from T+2h to T+36h), the multiparametric approach performed well in the discrimination of the Burd group vs the Burd+LA group vs the Burd+LA+NSAID group on axis 1 with an Ac, Se and Sp of 100 %. This discrimination between Burd+LA and Burd+LA+NSAID groups relied essentially on behaviour, the HPA axis and inflammatory responses: Burd+LA sheep showed the highest responses, Burd+LA+NSAID the lowest, while Burd group was intermediate. Unlike local anaesthesia, multimodal analgesia appeared to have limited the HPA axis and inflammatory responses more, confirming studies by Earley and Crowe (2002) and Ting et al. (2003) in cattle. Nevertheless, unlike in the P1 period, Burd+LA sheep expressed the most behavioural changes (abnormal activities, clinical signs and typical facial expressions) and appeared, therefore, to feel pain the most. These results are surprising because we would have expected the Burd group to express the most behavioural changes. However, Ting et al., 2003 and Fisher et al. 1996 showed that an injection of local anaesthesia exacerbates inflammatory reactions compared to Burdizzo castration alone. Additionally, pain responses due to dehorning may increase once lidocaine concentrations decline (Stafford and Mellor, 2005). Therefore, our results suggest that local anaesthesia alone increased pain and distress in sheep between 2 and 36 hours post castration compared to Burd and Burd+LA+NSAID sheep.

During the P3 period (i.e., no drug effects: from T+48h to T+78h), the multiparametric approach performed well in the discrimination of the 3 groups on axis 1 with a Se and a Sp of 100 %. This excellent discrimination between Burd+LA and Burd+LA+NSAID groups relied on the responses of all pathways. Again, Burd+LA sheep showed the highest responses, Burd+LA+NSAID the lowest, and responses by the Burd group were intermediate. Akin to the P1 and P2 periods, multimodal analgesia (Burd+LA+NSAID) limited the activation of the five pathways more. The Burd+LA group expressed the most behavioural changes (abnormal activities) and showed higher inflammation, HPA axis, oxidative stress and autonomic

nervous system responses. Our results suggest the pain felt by the Burd+LA group in the P2 period was still present in P3. Thus, local anaesthesia alone seems to increase pain and distress in sheep between 48 and 78 hours post Burdizzo castration compared to multimodal analgesia and no treatment. Our findings support previous studies in calves (Fisher, 1996; Ting et al., 2003) in which local anaesthetics administered in the scrotum and spermatic cords before Burdizzo castration induced long-term inflammatory response compared to Burdizzo castration alone.

Regardless of the period, the multiparametric approach discriminated the three treatments with good performances. Whereas selected indicators varied from one period to another, the five pathways (behaviour, the HPA axis, SNA, oxidative stress, inflammation) were selected at each period. This demonstrates all pathways brought information that contributed to our discrimination. Nevertheless, three pathways (behaviour, the HPA axis and inflammation) contributed the most to the discrimination, confirming the necessity of using these pathways to assess pain (Prunier et al, 2013). Our results confirm the importance of using all responses to assess pain because pain responses have limitations. For instance, (i) cortisol secretion can be produced by the stress caused by pain or by handling (Stewart et al., 2008); (ii) uncastrated calves can also flee in response to handling but not pain (Stewart et al., 2008); and (iii) heart rate and oxidative stress can be affected by physical or emotional stress (Anil et al., 2002) and (iv) inflammatory indicators vary with age (Ting et al., 2005).

Conclusion

The multiparametric approach, combining information from five pathways, showed good performances to discriminate three more or less painful situations in sheep. The

relevance of the indicators depended on the time period observed after surgery. These results endorse the strength of the multiparametric approach to assessing pain. Local anaesthesia is effective at relieving pain but only during its time of action. The combination of local anaesthetic and NSAIDs was effective up to three days after castration. The present study provides helpful information for veterinarians and farmers to refine pain alleviation methods during castration, to better detect pain after castration in sheep, and thus to enhance animal welfare.

Conflict of interest statement

None of the authors has any financial or personal relationships that could inappropriately influence or bias the content of the paper.

Acknowledgements

We thank Denis Roux, Pascal Faure, Maxime Navech, Yoan Thomas, André Guittard, Sebastien Alcouffe, Bernard Mallet, Simon Collange and Julien Mongiat for their excellent technical assistance during the experiments, and Agnès Thomas, Anne-Sophie Bage, Hervé Chandèze, Eric Delval, Stéphane Andanson and Christine Ravel for their assistance with the laboratory analyses. The authors wish to acknowledge American Journal Experts for their editorial support.

References

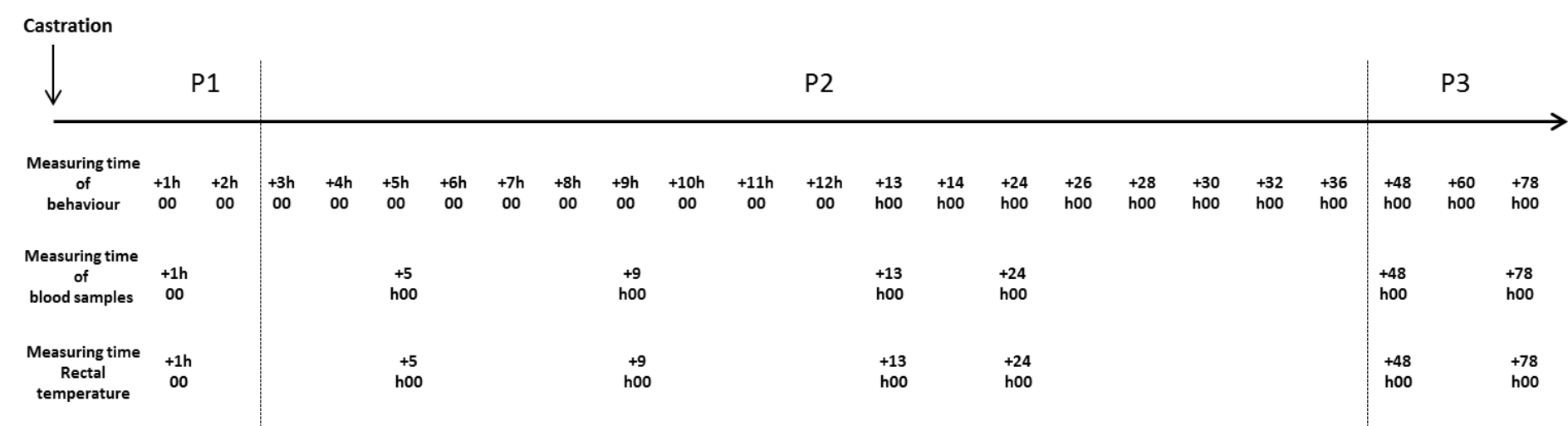
- Anil, SS, Anil, L., Deen, J., 2002. Challenges of pain assessment in domestic animals. *Veterinary News from Medical News Today* 220, 313-319.
- Auboirn, S., Sparrow, DA, Beaubatie, L., Bauchart, D., 1990. Characterization and amino-terminal sequence of apolipoprotein AI from plasma high density lipoproteins in the preruminant calf, *Bos Spp.* *Biochememical Biophysical Research Communications* 166, 833-839.
- Boissy, A., and Bouissou, MF, 1994. Effects of androgen treatment on behavioural and physiological responses of heifers to fear-eliciting situations. *Hormones and Behaviour* 28, 66-83.
- Coetzee, JF, 2013. A Review of Analgesic Compounds Used in Food Animals in the United States. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 29(1):11-28.
- Earley, B., and Crowe, MA, 2002. Effects of ketoprofen alone or in combination with local anesthesia during the castration of bull calves on plasma cortisol, immunological and inflammatory responses. *Journal of Animal Science* 80, 1044-1052.
- Fisher, AD, Crowe, MA, Alonso de la Varga, ME, Enright, WJ, 1996. Effect of castration method and the provision of local anesthesia on plasma cortisol, scrotal circumference, growth, and feed intake of bull calves. *Journal of Animal Science* 74, 2336-2343.
- Gadek-Michalska, A., Spyrka, J., Bugajki, J., 2005. Psychosocial stress affects the involvement of prostaglandins and nitric oxide in the lipopolysaccharide induced hypothalamic-pituitary-adrenal response *Journal of Physiology and Pharmacology* 56 2, 287-298.
- Guesgen, MJ, Beausoleil, NJ, Minot, EO, Stewart, M., Stafford, KJ, Morel, PCH, 2016. Lambs show changes in ear posture when experiencing pain. *Animal Welfare* 25, 171-177.
- Martin, J., White, H., 1991. Fluorimetric determination of oxidized and reduced glutathione in cells and tissues by high performance liquid chromatography following derivatization with dansyl chloride. *Journal of Chromatography* 568, 219-225.
- Mellema, SC, Doherr, MG, Wechsler, B., Thueer, S., Steiner, A., 2006. Influence of local anaesthesia on pain and distress induced by two bloodless castration methods in young lambs. *The Veterinary Journal* 172, 274-283.
- Melches, S., Mellema, SC, Doherr, MG, Wechsler, B., Steiner, A., 2007. Castration of lambs: A welfare comparison of different castration techniques in lambs over 10 weeks of age. *The Veterinary Journal* 173, 554-563.
- Molony V., Kent J.E., 1997. Assessment of acute pain in farm animals using behavioral and physiological measurements. *J. Anim. Sci.*, 75, 266-272.
- Molony, V., Kent, JE, McKendrick, IJ, 2002. Validation of a method for assessment of an acute pain in lambs. *Applied Animal Behaviour Science* 76, 215-238.

- Pieler, D., Peinhopf, W., Becher, AC, Aurich, JE, Rose-Meierhöfer, S., Erber, R., Möstl, E., Aurich, C., 2013. Physiological and behavioral stress parameters in calves in response to partial scrotal resection, orchidectomy, and Burdizzo castration to partial scrotal resection, orchidectomy, and Burdizzo castration. *Journal of Dairy Science* 96, 6378-6389.
- Prunier, A., Mounier, L., Le Neindre, P., Leterrier, C., Mormède, P., Paulmier, V., Prunet, P., Terlouw, C., Guatteo, R., 2013. Identifying and monitoring pain in farm animals: a review. *Animal* 7, 998-1010.
- Robertson, IS, Kent, JE, Molony, V., 1994. Effect of different methods of castration on behaviour and plasma cortisol in calves of three ages. *Research in Veterinary Science* 56, 8-17.
- Scislowski, V., Bauchart, D., Gruffat, D., Laplaud, PM, Durand, D., 2005. Effects of dietary n-6 or n-3 polyunsaturated fatty acids protected or not against ruminal hydrogenation on plasma lipids, and their susceptibility to peroxidation in fattening steers. *Journal of Animal Science* 82, 2162-2174.
- Stafford, KJ, Mellor, DJ, Todd, SE, Bruce, RA, Ward, RN, 2002. Effects of local anaesthesia or local anaesthesia plus a non-steroidal anti-inflammatory drug on the acute cortisol response of calves to five different methods of castration. *Research in Veterinary Science* 73, 61-70.
- Stafford, KJ, Mellor, DJ, 2005. Dehorning and disbudding distress and its alleviation in calves. *The Veterinary Journal* 169, 337-349.
- Stewart, M., Stafford, KJ, Dowling, SK, Schaefer, AL, Webster, JR, 2008. Eye temperature and heart rate variability of calves disbudded with or without local anaesthetic. *Physiology and Behaviour* 93, 78-797.
- Stilwell, G., Lima, M., Broom, DM, 2008. Effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on long-term pain in calves castrated by use of external clamping technique following epidural anesthesia. *American Journal of Veterinary Research* 69 (6), 744-750.
- Ting, STL, Earley, B., Crowe, MA, 2003. Effect of repeated ketoprofen administration during surgical castration of bulls on cortisol, immunological function, feed intake, growth and behaviour. *Journal of Animal Science* 81, 1253-1264.
- Ting, STL, Earley, B., Veissier, I., Gupta, S., Crowe, MA, 2005. Effects of age of Holstein-Friesian calves on plasma cortisol, acute phase proteins, immunological function, scrotal measurements and growth in response to burdizzo castration. *Animal Science Journal* 80, 377-386.
- Trinder, P., 1969. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Annals of Clinical Biochemistry* 6, 24.

Table 1: Description of the behaviour recorded in sheep.

Behaviour Category	Behaviour description	Weight Score	Composite score per behaviour category*	
General attitude	Isolated : sheep one meter away from its closer penmate	1		
	Apathetic : sheep does not respond to any stimulus of the environment	1	Min	Max
	Head in a corner : The sheep is standing and his head is oriented towards a corner of the pen	1	= 0	= 4
	Head below withers	1		
Position of the ears (Guesgen et al., 2016)	Ears forwards: both ears are positioned forward of the perpendicular. This is often also associated with the ear auricles facing forward	0	0	
	Ears backward: both ears are positioned backward of the perpendicular. The ear auricles are not visible from the front	0.5	0.5	
	Ears plane: both ears are perpendicular to the head-rump axis. This is often also associated with the ear auricle facing down	1	1	
Position of the Eyelid	Opened	0	0	
	Semi-opened	0.5	0.5	
	Closed	1	1	
Facial expressions	Upper-lip curl. Curling of either the upper or both lips away from the teeth (Molony et al, 2002)	1	Min	Max
	Nose wrinkling	1	= 0	= 2
Standing postures (Molony et al, 2012)	Normal standing: standing, walking, eating, or investigating with no apparent abnormalities	0	Min	Max
	Standing unsteadily, sometimes the body leaning against a wall	1	= 0	= 2
	Arched back. Standing still with the back arched	1		
Lying postures (Molony et al, 2012)	Sternal recumbency with the legs tucked in and the head down, either round to one side or directly in front or head up	0	0	
	Sternal recumbency with the hind limbs partially or fully extended, or with the lamb keeping the scrotal region off the ground	0.5	0.5	
	lateral recumbency with one shoulder on the ground, with extension of the hind limbs (Molony and Kent 1997)	1	1	
Postures of the legs	Normal posture of the legs	0		
	Standing with leg held in suspension	1	Min	Max
	Standing with the hindlegs stretched back (Robertson 1994)	1	= 0	= 1
	Standing with the forelimbs or hindlimbs are bring closer	1		
Clinical signs	The sheep's eyes are sunken into their orbits	1	Min	Max
	Hair raised : the sheep's hairs are raised on the head	1	= 0	= 3
	Panting : rapid breathing	1		
Abnormal activities	Grinding the teeth	1		
	Vocalization	1	Min	Max
	Trampling	1	= 0	= 4
	Stereotypy	1		

Figure 1: study design



P1: The first period corresponded to local anesthesia effects: it started at 0h00 and lasted two hours after castration.

P2: The second period corresponded to NSAIDs and effects: it started 2 hours after castration and lasted 36 hours after castration.

P3: The third period from 48h to 78h corresponded to the phase during which the action of drug action was finished.

Figure 2: Factorial Discriminant Analysis (FDA) on physiological and behavioral indicators measured between 0 to 2 after castration (Period P1) in sheep castrated with burdizzo without pain killer (Burd, n=8), or under local anaesthesia (Burd+LA, n=8) and or under local anaesthesia and NSAID (Burd+LA+NSAID, n=8).

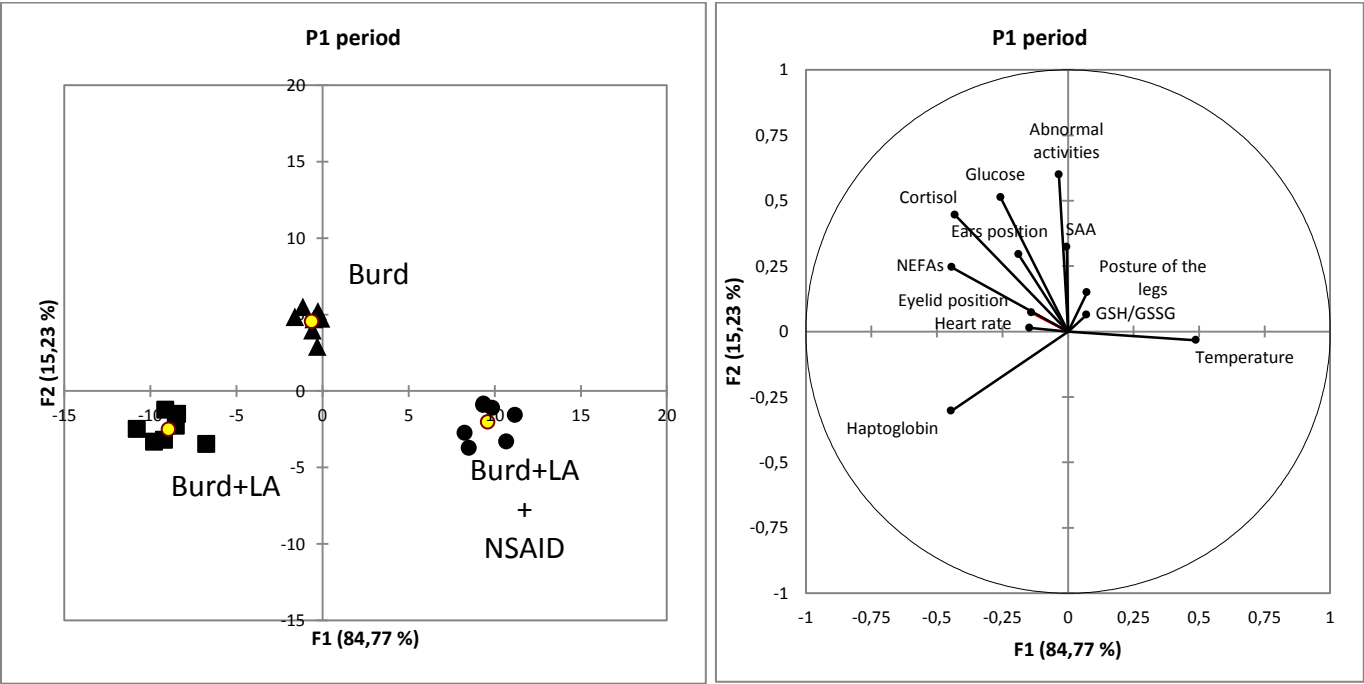


Table 2: Factor Discriminant Analysis (FDA) on physiological and behavioral indicators at P1 period: for each component considered, we give the proportion of variance explained by the component, and correlation of each variable to the component ¹

Factor Discriminant Analysis	Component 1	Component 2
Proportion of total variance explained by component	84,8	15,2
Correlation of each variable to components:		
Ear position	-0,19	0,29
Eyelid position	-0,14	0,07
Posture of the legs	0,07	0,15
Abnormal activities	-0,03	0,60
Haptoglobin	-0,44	-0,30
SAA	-0,00	0,32
Temperature	0,49	-0,03
Glucose	-0,26	0,51
NEFA's	-0,44	0,25
Cortisol	-0,43	0,44
Heart rate	-0,15	0,01
GSH/GSSG	0,07	0,06

1. Bold represents variables that contribute most to the component

Table 3. Cross validation of the Factorial Discriminant Analysis (FDA) on physiological and behavioral indicators during P1 for sheep castrated with burdizzo without pain killer (Burd), sheep castrated with burdizzo under local anaesthesia (Burd+LA) and sheep castrated with burdizzo under local anaesthesia and NSAID (Burd+LA+NSAID): Accuracy, Sensitivity and Specificity

From \ toward	Burd	Burd +LA	Burd +LA +NSAID	Accuracy (%)	Sensitivity (%)	Specificity (%)
Burd	5	1	1	90	71	100
Burd+LA	0	7	0	95	100	100
Burd+LA+NSAID	0	0	7	95	100	100

Figure 3 : Factorial Discriminant Analysis (FDA) on physiological and behavioral indicators during P2 for sheep castrated with burdizzo without pain killer (Burd), sheep castrated with burdizzo under local anaesthesia (Burd+LA) and sheep castrated with burdizzo under local anaesthesia and NSAID (Burd+LA+NSAID)

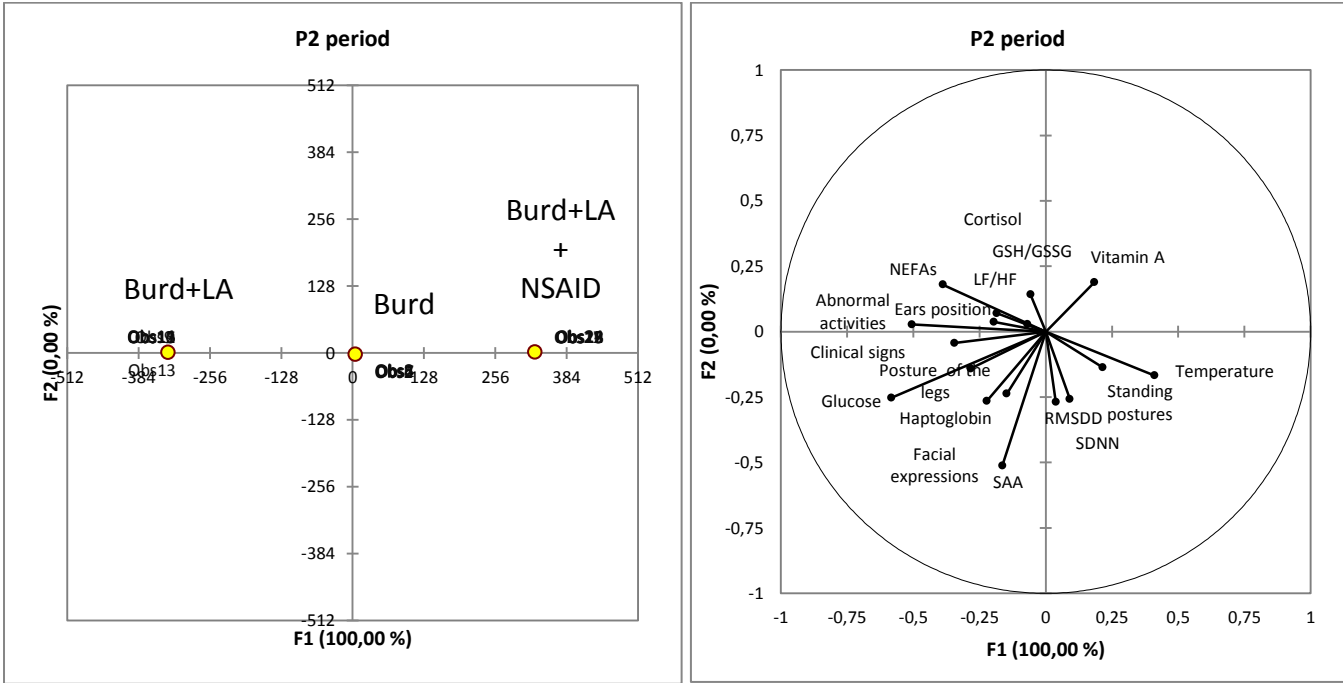


Table 4. Cross validation of the Factorial Discriminant Analysis (FDA) on physiological and behavioral indicators during P2 for sheep castrated with burdizzo without pain killer (Burd), sheep castrated with burdizzo under local anaesthesia (Burd+LA) and sheep castrated with burdizzo under local anaesthesia and NSAID (Burd+LA+NSAID): Accuracy, Sensitivity and Specificity.

From \ toward	Burd	Burd +LA	Burd +LA +NSAID	Accuracy (%)	Sensitivity (%)	Specificity (%)
Burd	7	0	0	100	100	100
Burd+LA	0	7	0	100	100	100
Burd+LA+NSAID	0	0	7	100	100	100

Table 5. Final Factor Discriminant Analysis (FDA) on physiological and behavioral indicators at P2 period: for each component considered, we give the proportion of variance explained by the component, and correlation of each variable to the component¹.

Factor Discriminant Analysis	Component 1
Proportion of total variance explained by component	99,9 %
Correlation of each variable to components:	
Ears position	-0,18
Facial expressions	-0,28
Standing postures	0,21
Posture of the legs	-0,15
Clinical signs	-0,34
Abnormal activities	-0,51
Haptoglobin	-0,22
SAA	-0,16
Temperature	0,41
Glucose	-0,58
NEFA's	-0,39
Cortisol	-0,20
SDNN	0,04
RMSDD	0,09
LF/HF	-0,06
GSH/GSSG	-0,07
Vitamin A	0,18

1. Bold represents variables that contribute most to the component

Figure 4 : Factorial Discriminant Analysis (FDA) on physiological and behavioral indicators during P3 for sheep castrated with burdizzo without pain killer (Burd), sheep castrated with burdizzo under local anaesthesia (Burd+LA) and sheep castrated with burdizzo under local anaesthesia and NSAID (Burd+LA+NSAID).

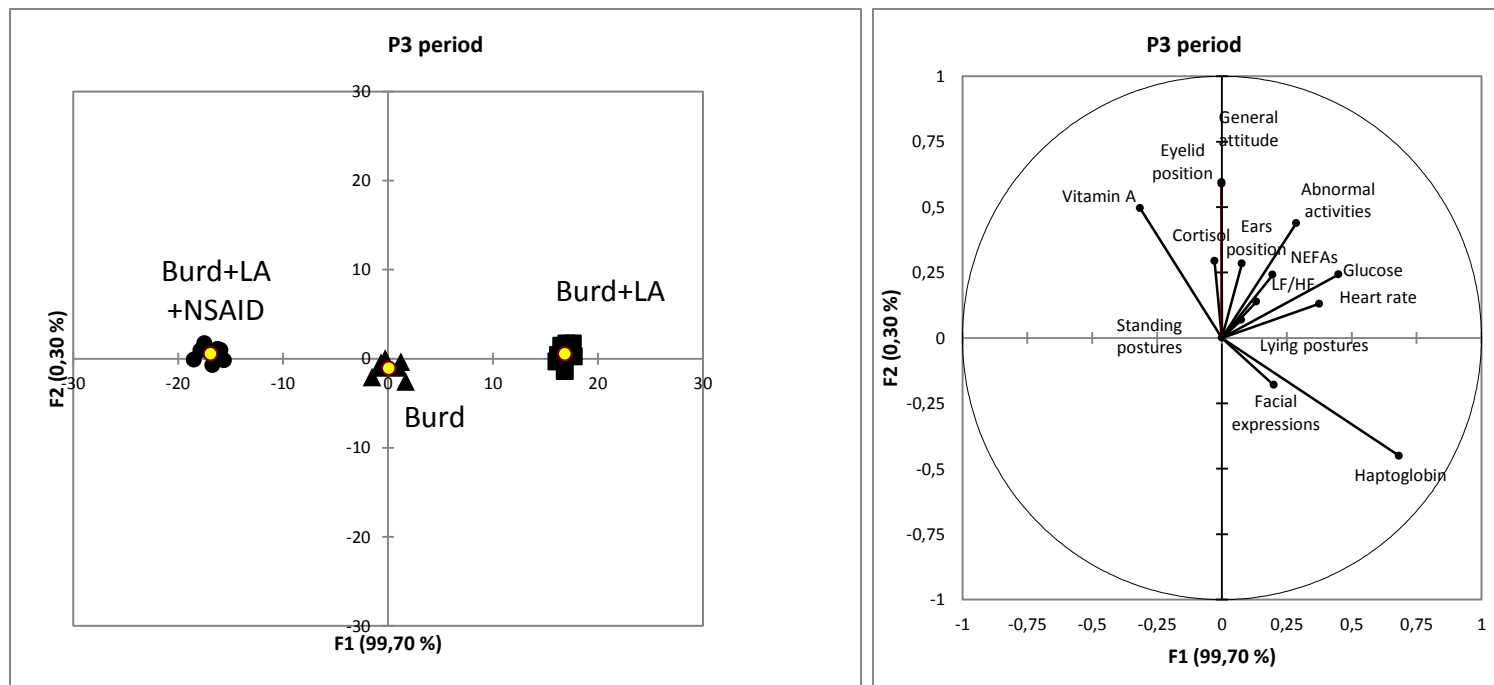


Table 6. Cross validation of the Factorial Discriminant Analysis (FDA) on physiological and behavioral indicators during P3 for sheep castrated with burdizzo without pain killer (Burd), sheep castrated with burdizzo under local anaesthesia (Burd+LA) and sheep castrated with burdizzo under local anaesthesia and NSAID (Burd+LA+NSAID): Accuracy, Sensitivity and Specificity.

From \ toward	Burd	Burd +LA	Burd +LA +NSAID	Accuracy (%)	Sensitivity (%)	Specificity (%)
Burd	7	0	0	100	100	100
Burd+LA	0	7	0	100	100	100
Burd+LA+NSAID	0	0	7	100	100	100

1 Table 7. Final Factor Discriminant Analysis (FDA) on physiological and behavioral indicators
 2 at P3 period: for each component considered, we give the proportion of variance explained by
 3 the component, and correlation of each variable to the component¹

Factor Discriminant Analysis	Component 1
Proportion of total variance explained by component	99,9 %
Correlation of each variable to components:	
Abnormal attitude	-0,00
Ears position	0,08
Eyelid position	-0,00
Facial expressions	0,20
Lying postures	0,07
Standing postures	0,00
Abnormal activities	0,29
Haptoglobin	0,68
Glucose	0,45
NEFA's	0,20
Cortisol	-0,03
Heart rate	0,37
LF/HF	0,13
Vitamin A	-0,31

4 1. Bold represents variables that contribute most to the component

5

Publication N°5

Pain assessment in dairy cows during Escherichia coli mastitis : a pilot study

Alice de Boyer des Roches, Marion Faure, Alexandra Lussert, Denys Durand, and Gilles Foucras

The Journal Dairy Sciences soumission février 2017

Résumé : La mammite est l'une des maladies les plus fréquentes dans l'industrie laitière et a été identifiée comme un problème majeur de bien-être. La douleur pendant la mammite est généralement évaluée par le comportement, tandis qu'une combinaison de divers indicateurs augmenterait les chances de détecter et d'évaluer l'intensité de la douleur. Le but de cette étude était d'évaluer la douleur ressentie par les vaches après l'induction expérimentale d'une mammite via l'inoculation d'*Escherichia coli* (*E. coli*). Six vaches Holstein-Friesian ont reçu une inoculation de 1 ml de suspension bactérienne de la souche *E. coli* P4 dans le pis. Les phases de la maladie ont été caractérisées par la croissance bactériologique et le nombre de cellules somatiques (CSC). Les réponses enregistrées des vaches à la pathologie ont été l'observation directe du comportement, la mesure de la température ruminale via des bolus, les indicateurs d'inflammation, de stress et de stress oxydatif. Parmi toutes les données enregistrées, les variables qui ont le plus contribué à la discrimination des phases de la mammite ont été obtenues par une analyse factorielle discriminative (FDA). Nous avons identifié trois phases, discriminées par la FDA avec de bonnes performances. Six indicateurs ont été retenus dans le modèle final: l'attitude générale des vaches, le temps passé couché, l'haptoglobine, la serum amyloïde A (SAA), les niveaux de cortisol et la température corporelle centrale. En phase 1 (0h à 8h après l'inoculation), le lait contenait 47×10^6 cfu / ml d'*E. Coli* et $158,3 \times 10^3$ SCC / mL. Les vaches étaient moins attentives à leur environnement (score médian, 0,63) et passaient plus de temps couché (72,5%). En phase 2 (12 h à 24 h après l'inoculation), le lait contenait $19,6 \times 10^6$ cfu / ml d'*E. Coli* et $45,5 \times 10^6$ SCC / mL. Les vaches étaient moins attentives à leur environnement (score de 0,54), avaient un taux élevé de cortisol plasmatique (31,3 ng / ml), SAA (100,3 µg / mL) et la température centrale (40,3°C). Au stade 3 (32 h à 80 h après l'inoculation), le lait contenait $1,9 \times 10^6$ cfu / mL d'*E. Coli* et $22,9 \times 10^6$ SCC / mL. Les vaches avaient des niveaux élevés d'haptoglobine (0,57 mg / mL) et de SAA (269 µg / mL), mais ne présentaient pas de changements de comportement. Les vaches laitières ont affiché des changements comportementaux, inflammatoires et un niveau de stress après l'inoculation de *E. coli* dans le quartier. Nos résultats suggèrent que les vaches souffrent d'inconfort à la phase pré-clinique (phase 1), de douleur à la phase aiguë (phase 2), mais pas d'inconfort ni de douleur à la phase de rémission (phase 3). Bien que de plus grandes études contrôlées soient nécessaires pour confirmer nos résultats, ces connaissances peuvent être utiles pour la détection précoce de la mammite à *E. coli* et pour l'inclusion d'un traitement de soulagement de la douleur pendant la mammite chez les vaches laitières.

Pain assessment during bovine mastitis

Title

Pain assessment in dairy cows during *Escherichia coli* mastitis : a pilot study

Alice de Boyer des Roches^{*1}, Marion Faure*, Alexandra Lussert†, Denys Durand*, and Gilles Foucras†

***UMR1213 Herbivores, INRA, VetAgro Sup, Clermont université, université de Lyon, F-63122 Saint-Genès-Champanelle, France**

† INRA-ENVT, UMR1225, Interactions Hôtes Agents Pathogènes, F-31300 Toulouse, France

¹Corresponding author:

Alice de Boyer des Roches

UMR 1213 Herbivores INRA-VetAgro Sup – Campus Vétérinaire de Lyon, 1 av. Bourgelat, F-69280 Marcy-l’Etoile, France.

Phone: + 33 4 78 87 27 87

Fax: + 33 4 78 87 27 81

alice.deboyordesroches@vetagro-sup.fr

Interpretative summary

Bovine mastitis is one of the most commonly occurring diseases and is pinpointed as a major welfare problem. In this study, we assessed the pain experienced by six cows after experimental inframammary challenge with *Escherichia coli* (*E. coli*); Cows' behavior and physiological responses were monitored. Our results suggest that the level of pain experienced by cow varies according to the disease phase: cows seemed to experience discomfort at pre-clinical phase, pain at acute phase, but not discomfort nor pain at remission phase. These results can help for early *E. coli* mastitis detection, and inclusion of pain-relief treatment in dairy cows.

ABSTRACT

Bovine mastitis is one of the most commonly occurring diseases in the dairy industry and has been pinpointed as a major welfare problem. Pain during mastitis is generally assessed through behavior, while a combination of various indicators would increase the chance of detecting and assessing the pain intensity. The aim of this study was to assess pain experienced by cows after experimental inframammary (mastitis) challenge with *Escherichia coli* (*E. coli*).

Six Holstein-Friesian cows received an inoculation of 1mL of bacterial suspension of *E. coli* strain P4 in the udder. Phases of the disease were characterized by bacteriological growth and Somatic cell counts (SCC). Cows' response to the challenge was monitored by direct behavioral observation, data loggers, rumen bolus, and indicators of inflammation, stress and oxidative stress. Among all data recorded, variables that contributed the most to mastitis phases discrimination were obtained by Factorial Discriminant Analysis (FDA).

We identified three phases, discriminated by the FDA with good performances. Six indicators were kept in final model: cows' attitude towards surroundings, time spent lying, haptoglobin, SAA, cortisol levels and central body temperature. At Phase 1 (0h to 8h post inoculation), milk contained 47×10^6 cfu / mL *E. coli*, and 158.3×10^3 SCC / mL. Inflammation indicators remained at baseline levels. Cows were less attentive towards their surroundings (median score, 0.63) and spent more time lying (72.5%). At Phase 2 (12 h to 24 h post inoculation), milk contained 19.6×10^6 cfu / mL *E. coli* and 45.5×10^6 SCC / mL. Cows were less attentive towards their surroundings (score, 0.54), had high plasma cortisol (31.3 ng / ml), SAA (100.3 μ g / mL) and central temperature (40.3°C) levels. At Phase 3 (32 h to 80 h post inoculation), milk contained 1.9×10^6 cfu / mL *E. coli*, and 22.9×10^6 SCC / mL. Cows had high levels of Haptoglobin (0.57 mg / mL) and SAA (269 μ g / mL) but did not show behavioral changes.

Dairy cows displayed behavioral, inflammatory and stress level changes after *E. coli* inoculation in the udder. Our results suggest cows experience discomfort at pre-clinical phase (Phase 1), pain at acute phase (Phase 2), but not discomfort nor pain at remission phase (Phase 3). Although larger controlled studies are needed to confirm our findings, this knowledge can be useful for early *E. coli* mastitis detection, and for inclusion of pain-relief treatment during mastitis in dairy cows.

KEYWORDS

Dairy cow, mastitis, pain, multiparametric analysis, *Escherichia coli*

INTRODUCTION

Bovine mastitis is recognized as one of the most commonly occurring diseases in the worldwide dairy industry (Bradley, 2002). It is the cause of the major antibiotic use in the dairy industry (Royster and Wagner, 2015) and has adverse effects on the economics of milk production due to losses and expenditure (Hogeveen et al., 2011). Mastitis is defined as an inflammation of the mammary gland, commonly associated with inframammary infection which triggers an immune response. Infections caused by *Escherichia coli* (*E. coli*) are typically associated with a fast and more dramatic immune response (Schukken et al., 2011): this leads to an influx of white blood cells, measured as an elevated somatic cell count (SCC).

Mastitis has been pinpointed as one of the major problems affecting the welfare in dairy cows (European Food Safety Authority, 2009, Leslie and Petersson-Wolfe, 2012). During mastitis, the concomitant inflammation of the udder, increased inframammary pressure, and increased external pressure (e.g. from an adjacent limb on a swollen udder), is believed to induce pain (Fitzpatrick et al., 2000, Leslie and Petersson-Wolfe, 2012). Recently, UK cattle practitioners scored pain associated with acute *Escherichia coli* mastitis at 7 on a 0 – 10 value scale (Huxley and Whay, 2006). Unfortunately, the management of painful conditions in cattle is still too rarely considered in practice (Hudson et al., 2008), although treating the pain experienced by cows during clinical mastitis results in a lower SCC, and a reduced risk of removal from the herd (culling) (McDougall et al., 2009). One reason for the inconsistency of pain relief for cattle is the difficulty for its assessment (Flecknell, 2008, Huxley and Whay, 2006).

Numerous methodologies have been employed to assess or quantify the levels of pain experienced by farm animals (Prunier et al., 2013). Studies on pain mainly measure the animals' pain responses to a noxious stimulus through recording the incidence of clearly defined pattern of behaviors (e.g. abnormal standing or lying, (Fogsgaard et al., 2015, Fogsgaard et al., 2012), changes in levels of stress response (e.g. hypothalamus-pituitary-adrenal (HPA) axis such as cortisol release (Hopster et al., 1998) or autonomous nervous system (SNA) such as heart-rate increase (Fitzpatrick et al., 2000)), or in levels of biochemical markers of oxidative stress (Salvemini et al., 2011, Sharma et al., 2016) and inflammation (e.g. haptoglobin and serum amyloid A (SAA) (Eckersall et al., 2001). Unfortunately, it is not possible to allocate a 'pain score' on the basis of changes on one of these indicators because most of them are not specific and/or not sensitive. For instance, HPA axis and SNA activity are related to stressful situations (Molony and Kent, 1997, Prunier et al., 2013). Changes in activity may result from pain (Theurer et al., 2012) and also be an early sign of sickness (Veissier et al., 1989). Previous studies on how cows experience pain during

mastitis generally focused on one or two types of indicators (e.g. (Fogsgaard et al., 2012)), but did not, to our knowledge combine the information of various types of indicators. Such combination would increase the chance of detecting and assessing the intensity of pain (Faure et al., 2014, Faure et al., in revision, Prunier et al., 2013). Moreover, while the severity of mastitis is well described in scientific studies (Schukken et al., 2011), knowledge is still lacking on the level of pain experienced by cows according to the phase of the disease (e.g. pre-clinical, status and remission).

The aim of this study was to assess pain experienced by cows during *Escherichia coli* mastitis. We hypothesize that i) the pain experienced by cows varied according to the timeline of the *Escherichia coli* mastitis, and ii) a multiparametric approach combining several indicators, already tested in experimental surgery conditions (Faure et al., 2014, Faure et al., in revision), was efficient to discriminate these pain levels during mastitis.

MATERIALS AND METHODS

This experiment was carried out with approval by the Val de Loire Ethics Committee for Experiments on Animals (France), DGRI's agreement APAFIS#813-2015061109103810v2. Animal studies were compliant with all applicable provisions established by the European Directive 2010/63/UE.

Animals, Housing and Feeding

The study was conducted at the INRA animal facility (PFIE, Nouzilly France).

Six Holstein-Friesian heifers were used. They were part of a larger study on the effect of local immunization on the response of dairy cows to *Escherichia coli* mastitis (Herry et al., Submitted). The six heifers used in the current study were involved as control treatment in the above-mentioned study, that used a total of 18 animals (6 animals as controls, 6 animals as treatment 1 and 6 animals as treatment 2). Detailed information can be found in Herry et al (submitted). Here we describe only the information relative to the 6 animals used in the current study.

The six heifers were purchased in two commercial farms at about 1 year of age and were then raised together in the same loose housing deep-bedded barn at INRA PFIE and fed a diet covering the dietary requirements at each physiological stage (Agabriel, 2010) and received water ad libitum. At 15 month-old, they were synchronized and inseminated. Two months before the anticipated date of calving, the heifers were allocated into two similarly housed and

fed groups, based on the expected date of calving. One month before the anticipated date of calving, ration was progressively changed from a hay-based ration with concentrate to a diet based on corn silage, hay, soybean meal and concentrate that met the dietary requirements for the transition dairy cow and early lactation (Agabriel, 2010), and received water ad libitum. During the pre-calving period, heifers' mineral status (Selenium, zinc and copper) was assessed and belonged to reference range. In the post-calving method and throughout the experiment, the animals were milked twice a day (at 0800 and 1600) by experienced stockmen in a milking parlor adjacent to the barn. Forestripping, pre and post dipping were implemented.

Experimental Design

The experiment was a longitudinal study, with the individual dairy cow being his own control, examining the effects of experimental *E. coli* infection. For practical reasons, the six cows were split into 2 successive blocks of 3 individuals each.

Experimental Induction of Escherichia coli Mastitis

As control treatment in the study from Herry et al. (submitted), the six cows received intramuscular injection in the upper part of caudal neck of 2mL Montanide adjuvant injection using 21G needles, at three months and 1 month before calving.

The *E. coli* strain P4 was used for the intramammary challenge. Strain P4 is classified as O32:H37, ECOR Phylogenetic group A, and multilocus sequence type ST10 (Blum et al., 2012). This strain has been isolated from a case of acute bovine mastitis and use in experimentally induced udder infection (e.g. (Bannerman et al., 2004)). Detailed description of *E.coli* preparation is given in Herry et al. (submitted).

Cows were challenged at 44 to 56 (average 49) days in milk. Before challenge, all quarters were checked for the absence of intramammary infections by performing bacteriological analysis and SCC measurement on milk. Preferably, a hind quarter was challenged with the other hind quarter and the front quarter serving as within cow controls. Inoculated quarters were free of infection: their milk has less than 50,000 cells per mL and were exempt of viable bacteria. One quarter of each cow was challenged by infusion of 1 mL of the bacterial suspension (1000 cfu/mL). Portions of the inoculum suspension used to challenge the cows were returned to the laboratory to verify its purity and the viability of the micro-organisms. This suspension was plated on blood agar, incubated at 37°C, and counted to verify the actual cfu/mL that was used for inoculation. The results were 1040 cfu for the first wave and 750 cfu for the second wave of inoculation. Inoculation was performed just after complete milking of

the gland, and 8 h before the next milking. Complete milkings subsequent to inoculation took place twice a day, at 8, 16, 32, 40, 56, 64, 80, 104 h post infection.

Data Collection

Milk samples, behavioral observations and physiological measurements were performed at regular intervals from 42 h before *E. coli* inoculation up to 80 hours post inoculation (Figure 1) by two experimental veterinarians unaware of the cows group allocation nor of the timeline of the mastitis challenge.

Milk Leukocytes, bacterial count and Phases of Mastitis.

Bacteriological examinations were conducted over 80 h post inoculation of *E. coli* (Figure 1). Milk samples were collected aseptically in sterile vials for microbiological culture, total and differential somatic cell count (SCC) (Figure 1). Only the inoculated quarters were sampled and the samples were immediately transported on ice to the laboratory. SCC were determined from these samples using a cell counter (Fossomatic model 90; Foss Food Technology, Hillerød, Denmark) (Bougarn et al., 2010). Foremilk samples from infected glands which had high cell numbers were diluted 1:10 in PBS before analysis.

Bacteriological analysis was performed throughout the experiment by plating 50 μ L of tenfold dilutions of foremilk samples over sheep blood-esculin agar, overnight incubation at 37°C, and *E. coli* colonies enumeration.

Based on the increase of the bacteria population in milk, and the SCC in milk, (Schukken et al., 2011), the observational period was divided into phases reflecting the severity of mastitis.

Behavior Evaluation Scheme. The behavior evaluation scheme was based on pain behaviors selected from the literature (de Oliveira et al., 2014, Fogsgaard et al., 2015, Fogsgaard et al., 2012, Glerup et al., 2015, Hudson et al., 2008, Mølgaard et al., 2012, Molony and Kent, 1997, Prunier et al., 2013, Siivonen et al., 2011). The behaviors included in the evaluation scheme are described in Table 1. Based on the scientific literature, all behaviors were weighted and graduated in levels as some behaviors are considered more pain-specific than others (Table 1, e.g. ‘absence of rumination’ had a score of 1). Behavioral observations were conducted by scan sampling (Martin and Bateson, 2013) at 13 time-points (Figure 1) by one blind observer trained to observe animal behavior. Behavioral observations recording was made with an application “EvaDoul” developed by INRA research team (M. Faure, INRA, Saint-Genes-Champanelle, France, personal communication) installed on a digital tablet (ASUS France).

Lying Behavior Monitoring. Lying behavior was monitored with data loggers (Hobo Pendant G Data Logger, Onset Computer Corp., Pocasset, MA) attached to the medial side of the hind leg of each cow by using Vet Wrap. They were fixed in a position such that the x-axis was parallel to the ground, the y axis was perpendicular to the ground pointing upwards and the z-axis was parallel to the ground pointing away from the sagittal plane (Cyples et al., 2012, Ito et al., 2009). The loggers recorded the g-force on the x, y, and z axes at 1-min intervals from 48h pre inoculation up to 80h post inoculation. The data loggers were removed from the cows after 80h post inoculation, and the data were downloaded using Onset HOBOWare software (Onset Computer Corporation), which converted the g-force readings into degrees of tilt. These data were exported into Microsoft Excel. Data selection was made to keep Lying/standing position of the cows only when cows were undisturbed by humans (Figure 1). This information was used to determine whether the cow was standing or lying. A macro was subsequently used to calculate the percentage of undisturbed time spent lying.

Physiological Measurements. Blood samples were collected by veinupuncture from jugular vein to determine physiological parameters at regular intervals from 42 h before *E. coli* inoculation up to 80 hours post inoculation (Figure 1). Blood samples were collected into vacutainer tubes containing Na₂-EDTA (2 tubes of 10 mL) or lithium heparin (2 tubes of 10 mL).

Inflammation: Haptoglobin assay, SAA assay, Central Temperature. Haptoglobin and Serum amyloid A (SAA) plasma concentration were determined by immunoprecipitation (Auboirion et al., 1990) and by Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) kit (catalogue No. TP 802, Tridelata Development Limited). Central body temperature was monitored every 30 minutes using a bolus (Thermobolus, Medria Elevage, France) inserted into the rumen of each cow at the beginning of the study.

Hypothalamo-Pituitary-Adrenal Axis. Measuring HPA axis activity is the standard approach to the study of stress and welfare in farm animals. Plasma cortisol concentration was determined by radioimmunoassay (Boissy and Bouissou, 1994).

Oxidative Stress. High performance liquid chromatography (HPLC) was used to measure plasma concentrations of oxidised and reduced glutathione (GSH and GSSG, respectively)(Martin and White, 1991).

Statistical analyses

For behavioral data recorded through the behavior evaluation scheme, we established behavioral categories (i.e. “item” in table 1) that gathered several behavioral criterion (e.g. the item ‘miscellaneous abnormal behaviors’ gathered ‘normorexia and/or rumination’, ‘foot stamping’, ‘hyporexia or anorexia’ and ‘absence of rumination’). For each cow at each phase and each criterion, we multiplied its frequency of observation by its initial score, leading to a weighted score. Then, within each behavioral item we first summed up all weighted scores for each cow at each phase and then divided it by the maximum reachable weighted score. Hence, the final composite score for each behavioral item was expressed on a 0 - 1 value scale.

For all indicators (Haptoglobin, SAA, Cortisol, GSH/GSSG ratio, behavioral item score, lying behavior monitoring, central temperature), we calculated for each phase and each cow the mean value, and used it for further analyses.

We performed a Factorial Discriminant Analysis (FDA) to statistically discriminate the phases of mastitis disease. Discriminant analysis highlights the variables on which the q groups differ and identifies at most q-1 linear combinations of variables that discriminate at best the groups (Lebart et al., 1995). We ran the analysis using all behavioral and physiological (inflammation, oxidative stress, HPA) measures. To identify linear combinations of variables that discriminate at best the phases, we simplified the full model by backward stepwise elimination of variables: the threshold to keep or to drop off a variable in the final model was set to $P = 0.05$. To interpret the discriminant components (axes) of each FDA, we focused on variables with a correlation of absolute value with the axis higher than 0.3. We estimated the performances of the final predictive model by running a leave-one-out cross-validation (Arlot and Celisse, 2010). This multiparametric analytical approach enabled to calculate the probability for each animal to belong to each period. The number of cows correctly classified after cross-validation allowed us to calculate the performances of the final model: the accuracy ($Ac = (\text{True Positive} + \text{True Negative}) / (\text{True Negative} + \text{False Negative} + \text{True Positive} + \text{False Positive})$), the sensitivity (percentage of cows correctly predicted to feel pain; $Se = \text{True Positive} / (\text{True Positive} + \text{False Negative})$) and specificity (percentage of cows correctly predicted not to feel pain; $Sp = \text{True Negative} / (\text{True Negative} + \text{False Positive})$). Finally, we compared cows’ responses between periods, taking into account the variables from the final model (see above). Because sample size was small ($n=6$ cows) and variables followed non-normal distribution, non-parametric Friedman and post hoc Dunn tests were used. We fixed significance threshold at $P = 0.05$, and a trend was considered when $0.05 < P < 0.10$. All analyses were performed using XLSTAT 2015.

RESULTS

Response to E. coli Inoculation and Determination of Mastitis Phases

All cows included in the data set tested positively for *E. coli* bacteria. The dose of *E. coli* used resulted in acute clinical mastitis, confirmed by the variation in number of *E. coli* in milk and milk SCC during the observation period (Figure 2). From the cows' response to *E. coli* inoculation in the udder, we identified four main phases of mastitis: Phase 0 corresponded to times before inoculation, Phase 1 gathered T 0h, +4h and T+8h, Phase 2 gathered T+12 to T+24, Phase 3 gathered T+32 to T+80.

At Phase 0, cows had (median) 0 (min – max, 0 – 0) cfu / mL *E. coli* count in milk and 14.5×10^3 SCC / mL (min-max, $8 - 37 \times 10^3$ SCC / mL) (Figure 3). Compared to baseline, there was a significant increase of *E. coli* count at Phase 1 (median, 47; min – max, $2.1 - 222.0 \times 10^6$ cfu / mL), then a decrease at Phase 2 (19.8; min – max, $1.7 - 123.6 \times 10^6$ cfu / mL) and at Phase 3 (1.9; min – max, $0.3 - 38.3 \times 10^6$ cfu / mL) (Figure 3). A significant increase of SCC was observed at Phase 2 (median, 45.5, min – max, $21.3 - 79.9 \times 10^6$ SCC / mL) and phase 3 (median, 22.9, min – max, $18.5 - 25.4 \times 10^6$ SCC / mL) but not at phase 1 ($158.3, 34.5 - 604.0 \times 10^3$ SCC / mL), compared to baseline levels ($14.5 \times 10^3, 8 \times 10^3 - 37 \times 10^3$ SCC / mL) (Figure 3).

Discrimination of Pain Experienced by Cows during Phases of Mastitis

Discrimination of the four phases was tested, and six indicators were kept in final model (Table 2 and Figure 4). Axis 1, 2 and 3 contributed respectively to 52.1%, 44.6 % and 3.3 % of the variance explained by the model. Axis 1 was mostly explained (correlation of each variable to the component) by cortisol (0.75), cow's attention and head position (0.33), and central body temperature (0.73). This Axis opposed cows during Phases 0 and 1 to cows during Phase 2, cows during Phase 3 being intermediate. Axis 2 was mostly explained by haptoglobin (-0.91) and SAA (-0.74). Axis 2 opposed cows during Phase 3 to other phases. Axis 3 was mostly explained by the time spent lying (-0.85). Figure 4 suggests that (i) the lower the level of the indicators the higher the chance for the cow to belong to Phase 0; ii) the higher the time spent lying, the higher the chance for the cow to belong to Phase 1; iii) the higher the central temperature, cortisol and score for attention and head position, the higher the chance for the cow to belong to Phase 2; (ii) the higher the Haptoglobin and SAA the higher the chance for the cow to belong to Phase 3. After cross validation, all cows correctly classified in their original Phase, leading to an accuracy of 100%, a sensitivity of 100% and a specificity of 100% (Table 3).

These results were confirmed by univariate analyses (Figure 5). During Phase 0, cows had low levels for all variables. Compared to Phase 0: cows at phase 1 spent more time lying ($P < 0.05$), were less attentive towards their surroundings and had lower head position ($P < 0.05$), and showed a small (but non statistically significant) increase in cortisol level ($P = 0.06$). Compared to Phase 0, cows at phase 2 were less attentive towards their surroundings and had lower head position ($P < 0.05$); they also had higher cortisol, SAA and central temperature levels ($P < 0.05$). Finally, cows at phase 3 had higher Haptoglobin and SAA levels than during Phase 0 ($P < 0.05$) but showed no changes in their behaviour, nor in cortisol and central temperature levels. Data on all indicators are detailed in supplementary materials.

DISCUSSION

The scientific literature on pain associated with mastitis is been increasing during the last decade, but generally one or two types of indicators are explored at a time (e.g. behavior, clinical signs, inflammation and so on). To our knowledge, this study is the first to give a more extensive overview of the whole pain response of the animal to a challenge caused by inoculation of *E. coli* in the udder, taking into account all pathways (behavior, inflammation, stress response, oxidative stress). This study is also the first to define the timeline of behavioral and physiological observation according to the ones of *E. coli* growth in the udder and cows immune response (SCC). However, this study was undertaken on a small number of dairy cows. The findings must therefore be considered gingerly: they raise hypotheses to be tested in larger controlled studies.

The short and medium term effects of *E. coli* inoculation in the udder were assessed using both immediate and less immediate indicators. Variations in plasma cortisol and behavior are widely used as indicators of stress in studies on painful procedures such as dehorning or castration (Coetzee, 2013, GrØndahl-Nielsen et al., 1999, Millman, 2013), and during mastitis (Hopster et al., 1998, Leslie and Petersson-Wolfe, 2012). In these studies, cortisol concentration increased between two and five times as high as the control situation, reflecting high stress level induced by pain. In our study, we used these indicators alongside less immediate indicators of inflammation (Eckersall et al., 2001) and oxidative stress (Salvemini et al., 2011, Sharma et al., 2016) to have a comprehensive overview of the pain experienced by cows.

Before inoculation baseline levels of plasma cortisol, haptoglobin, SAA and central body temperature corresponded to the values reported in the literature (Eckersall et al., 2001,

Hopster et al., 1998, Wenz et al., 2001). The cows did not expressed particular behavioral sign of pain (Weary et al., 2006), and they spent 50% of their time lying, which is in agreement with previously published studies on healthy cattle lying behaviour (Ito et al., 2009, Jensen et al., 2005, Siivonen et al., 2011). Hence, before inoculation, the six animals did not seem to experience any kind of pain or discomfort.

Inoculation of *E. coli* provoked a rapid increase of the bacteria population in milk within 8 hours post-inoculation. This was followed, 12 to 24 hours post-inoculation, by a steep increase in SCC due to fast migrating of white blood cells that inhibit bacterial growth through phagocytosis and killing. This resulted in a decrease of the *E. coli* population that reached baseline levels from 32 to 80 hours post inoculation. Although inter-individual variations were observed, the *E. coli* development and the immune response indices profiles of the six cows in our study following mastitis fitted with typical global pattern described in the literature (Schukken et al., 2011). Since the severity of the mastitis disease correlates strongly with *E. coli* count in milk (Schukken et al., 2011), we could propose to identify the phases in the study as follow: baseline (phase 0), pre-clinical phase (0h – 8h post-inoculation, phase 1), acute phase (12h – 24h post-inoculation, phase 2) and remission phase (32h – 80h post-inoculation, phase 3).

For the first 8 hours post-inoculation (Phase 1, pre-clinical phase), *E. coli* population increased in milk. Simultaneously, SCC and inflammation indicators (haptoglobin, SAA and central body temperature) remained at baseline levels, and a very small increase in plasma cortisol level ($P = 0.06$) was also observed, illustrating a start of stress response in the animals. Cows expressed behavioural changes: they were less attentive towards their surroundings and spent more time lying. Opposite findings were described after a LPS challenge (Cyples et al., 2012, Siivonen et al., 2011), that nevertheless do not reflect on-farm conditions because, unlike our experimental procedure, LPS models do not involve alive bacteria. . Our findings reflect the typical decrease in activity described in sick animals (Hart, 1988, Veissier et al., 1989). In addition, cows were less attentive towards the surroundings and lowered their head. These behavior has been described in cattle in several painful situations (for a review: Weary et al., 2006). Our findings are also consistent to those from Gleeup et al. (2015)'s study that included two mastitic cows in their sample. Hence, during the development of *E. coli* in the udder, we may suggest that the dairy cows seemed to experience some discomfort. Pain is a stressor that provokes a biological stress response (Viñuela-Fernández et al., 2011). Here, behavioural changes were not associated with stress

response, suggesting that cows did not experience pain during the pre-clinical phase of mastitis.

During the mastitis acute phase (12 and 24 hours post inoculation, Phase 2), we observed a decrease of *E. coli* population and an increase of SCC. Cows had high levels of SAA and increased central body temperature, signs of an inflammatory response (Eckersall et al., 2001, Schukken et al., 2011). This reflected the immune response of the cows: white blood cells inhibited bacterial growth through phagocytosis (Schukken et al., 2011). Cows kept displaying behavioural changes : they were less attentive towards their surroundings. Cows had higher cortisol level. Few literature is available on cortisol levels during mastitis. The cortisol response magnitude observed here (35 ng / ml) in response to *E. coli* inoculation was higher than ones reported in studies on mastitis (25 ng/ml) (Hopster et al., 1998), during rumenocentesis without anaesthesia (14.5 ng / ml) (Mialon et al., 2012), or disbudding of calves without anaesthesia (4.5 ng / ml)(Caray et al., 2015). Our results probably suggest that cows experienced a high level of stress, a start of inflammatory response, and displayed behavioural changes. Therefore, it would seem that the acute phase of mastitis was associated with cows experiencing pain.

The remission Phase (32 to 80 hours post inoculation, Phase 3) was characterized by *E. coli* count close to baseline level and high SCC, still lower than at Phase 2. Simultaneously, cows had high levels of haptoglobin and SAA. They did not display behavioral or stress responses: these indicators (behavior and cortisol) were back at their baseline level. It seems therefore that although cows were still in an inflammatory stage (Eckersall et al., 2001, Schukken et al., 2011), it would seem that the remission phase of mastitis was not associated with cows experiencing discomfort.

Finally, the animals were fit with technologies for precision livestock farming: data loggers and rumen bolus. We found that the time spent lying was associated with *E. coli* population growth and central temperature was associated with the start of immune response. Although additional studies with a larger number of animals are needed, our results suggest that automated lying behavior and central temperature recordings could be precious on farm tools to early detect mastitis, and the associated pain and discomfort in cattle.

CONCLUSIONS

The present study showed behavioral, inflammatory and stress level changes in dairy cows after *E. coli* inoculation in the udder, indicating that the cows seemed to experience pain during this period. From *E. coli* count in milk and SCC four phases of the disease could be characterized: before inoculation, pre-clinical, acute and remission. The multiparametric approach showed good performances to discriminate these phases. Behavior, inflammation and the HPA axis played the most important part in this discrimination, confirming that combination of indicators increases the chance of detecting and assessing the intensity of pain (Faure et al., 2014, Faure et al., in revision, Prunier et al., 2013).. Cows seemed to experience discomfort during the pre-clinical phase, then pain during the acute phase of the disease. The remission phase did not seem to induce any discomfort in the animals. Pain has always negative effects on animal welfare. Therefore, when pre-clinical and acute phase of mastitis are detected in dairy cows, inclusion of pain-relief treatment should be considered.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work has been supported by the project KOLimastIR of the Animal Health and Welfare (ANIHWA) Era-Net (www.anihwa.eu). The authors gratefully acknowledge Robert G lineau, Olivier Boulesteix, Anne Pinard and Pascal Lallier for excellent animal husbandry.

Table 1. Description of behaviors evaluated in the behavior evaluation scheme.

Item	Score / Criterion	Maximum Score
General attitude : Attention towards the surrounding and head position	• (0) Cow is active or attentive, and has its head at or above the line of spinal column • (0.5) Cow is not active, does not look at the observer • (1) Cow avoids eye contact, is not active, not sleeping and not ruminating, • (1) Cow's head is below the line of spinal column	2
Eyelid position	• (0) Open eyes, attentive look • (0.5) Semi-open eyes and neutral look • (1) Closed eyes	1
Ear position	• (0) Both ears forward or one ear forward or back and the other moving back and forth • (1) Ears lower than spinal column, with an increased distance between ears and the opening facing downwards	1
Facial expression	• (0) Attentive or neutral look with no furrows above nostrils • (1) Strained look with furrows above nostrils	1
Standing posture	• (0) Normal standing: standing, walking, eating, or investigating with no apparent abnormalities • (1) Standing unsteadily, sometimes the body leaning against a wall, or back arched standing, or standing with weight shifting on hind legs	2
Limbs posture	• (0) Normal posture of the legs • (1) Standing with hind limbs extended caudally, or a leg held in suspension, or forelegs and hind legs brought closer	1
Lying position	• (0) Normal sternal lying down • (0.5) Lying down in sternal recumbency with the hindlimbs partially or fully extended • (1) Lying down in lateral recumbency with one shoulder on the ground with full or partial extension of one or both hind limbs	1
abnormal activity	• Teeth grinding • (1) Foot stamping • (1) Absence of rumination	3
Tail position	• (0) Normal position of the tail • (0.5) Central part of the tail is slightly pressed against udder base • (1) Central part of the tail is pressed against the udder base	1
Clinical signs	• (0) Normal eyes, smooth hair coat, No shivering • (1) Presence of : Eyes sunken into their orbits • (1) Obviously erect hair coat • (1) Shivering of the muscles • (1) Shivering • (1) Panting	5

Table 2. Factor Discriminant Analysis (FDA) on physiological and behavioral indicators from 6 Holstein-Friesian cows inoculated with E. coli: proportion of variance explained by each component, and correlation of each variable to the component ^{1,2}

FDA	Axis 1	Axis 2	Axis 3
Eigenvalue	45.3	38.8	2.85
Proportion of total variance explained by component (%)	52.1	44.6	3.30
Contribution of each variable to components:			
Behavior			
Score Attention and head position*	0.33	0.22	-0.50
Score Eyelid position	0.19	-0.04	-0.40
Score Ear position	0.34	0.03	-0.38
Score Facial Expression	0.00	0.00	0.00
Score Standing posture	0.00	0.00	0.00
Score Limb posture	0.15	-0.27	0.08
Score Lying position	-0.13	0.07	-0.35
Score miscellaneous abnormal behaviors	0.28	-0.06	-0.02
Score Tail position	0.60	0.26	0.20
Score Clinical signs	0.60	-0.41	0.17
Time Lying (% total undisturbed time)*	-0.11	-0.13	-0.85
Inflammation			
Haptoglobine (mg/ml)*	0.38	-0.91	-0.01
SAA (µg/ml)*	0.63	-0.74	0.06
Central Temperature (°C)*	0.73	0.61	0.30
HPA			
Cortisol (ng/ml)*	0.75	0.52	-0.12
Oxydative stress			
GSH/GSSG ratio	0.10	-0.32	0.11

¹ Bold represents variables that contribute most to the component.

² ‘*’ represents variables kept in final FDA model

Table 3. Cross validation of the Factorial Discriminant Analysis (FDA) on physiological and behavioral indicators from 6 Holstein-Friesian cows inoculated with *E. coli* at Phase 0 (before inoculation), Phase 1 (0 h to 8 h post inoculation), Phase 2 (12 h to 24 h post inoculation), and Phase 3 (32 h to 80 h post inoculation): Accuracy, Sensitivity and Specificity of the FDA analysis.

From \ Towards	Phase 0	Phase 1	Phase 2	Phase 3	Accuracy (%)	Sensitivity (%)	Specificity (%)
Phase 0	6	0	0	0	100	100	100
Phase 1	0	6	0	0	100	100	100
Phase 2	0	0	6	0	100	100	100
Phase 3	0	0	0	6	100	100	100

Figure 1. Experimental protocol for investigating the effects of inoculation of *E. coli* in the udder of six Holstein-Friesian cows on milk indicators, physiological indicators and behavioral indicators.

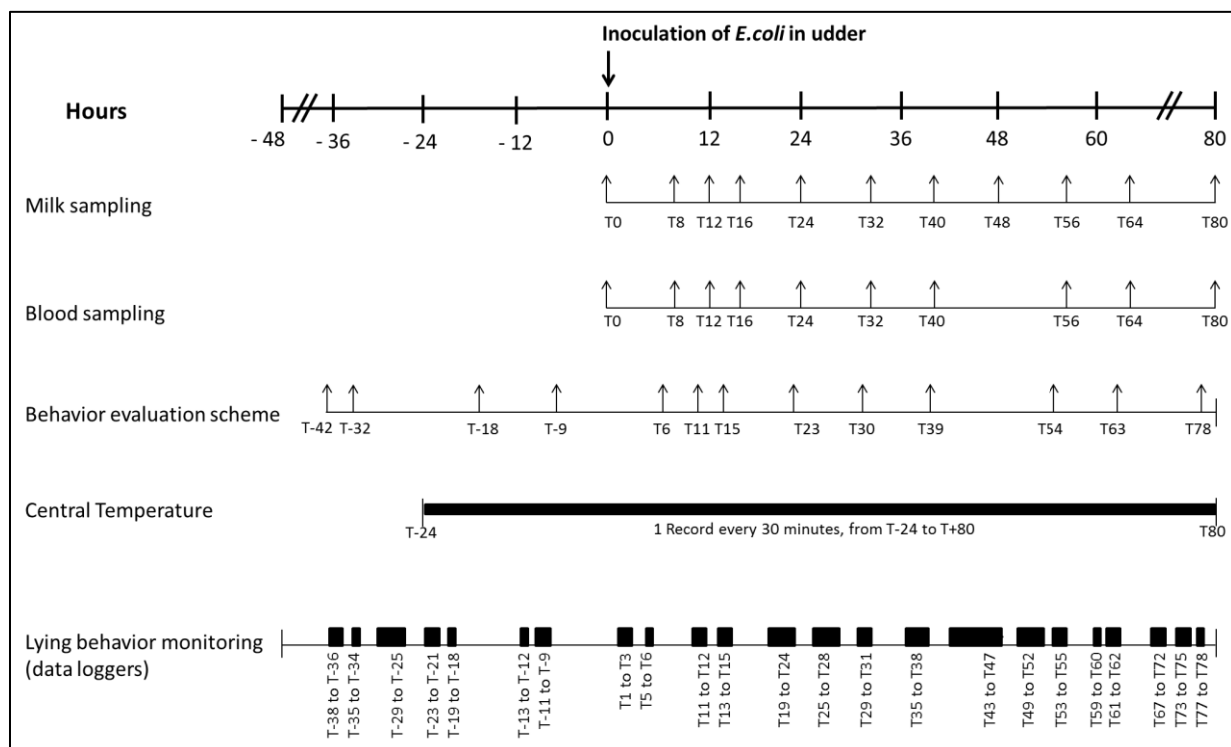


Figure 2. Individual changes in *E. coli* count in milk ($\log_{10}$ cfu/mL) and in somatic cell count (SCC) in milk 10^3 SCC / mL) from 6 Holstein-Friesian cows inoculated with *E. coli* at 0 h.

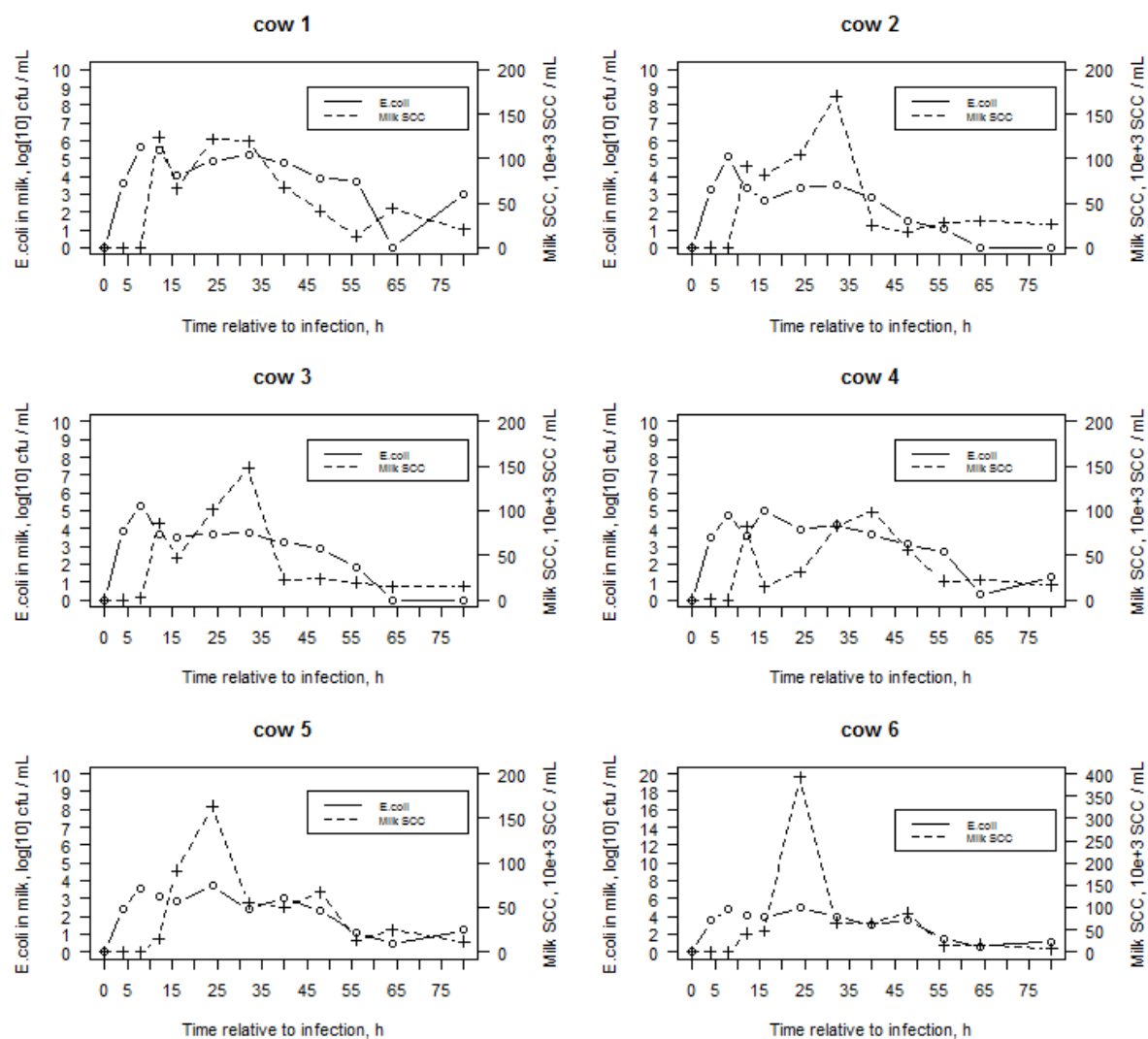


Figure 3. Changes in *Escherichia coli* count in milk ($\log_{10}$ cfu/ml) and in somatic cell count in milk 10^6 SCC / mL) from 6 Holstein-Friesian cows inoculated with *E. coli*, at 0h at Phase 0 (before inoculation), Phase 1 (0 h to 8 h post inoculation), Phase 2 (12 h to 24 h post inoculation), and Phase 3 (32 h to 80 h post inoculation). Plots with different letters differ significantly at $P < 0.05$.

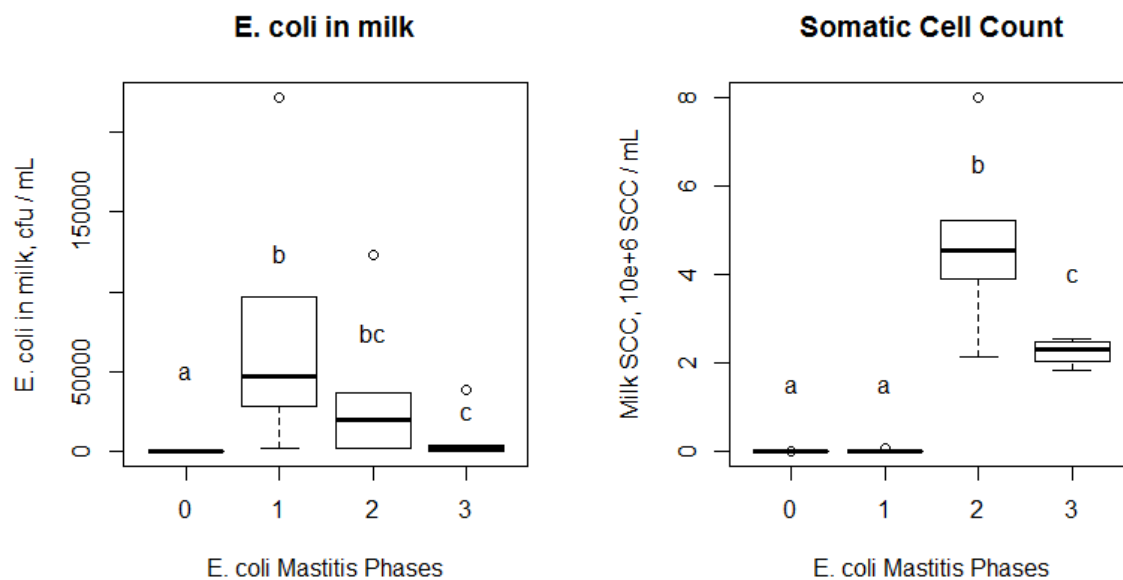


Figure 4. Factorial Discriminant Analysis (FDA) on physiological and behavioral indicators from 6 Holstein-Friesian cows inoculated with *E. coli*, at Phase 0 (before inoculation), Phase 1 (0 h to 8 h post inoculation), Phase 2 (12 h to 24 h post inoculation), and Phase 3 (32 h to 80 h post inoculation): loadings of the six indicators (A) and of the individuals (B) on axis 1 and axis 2 of the FDA analysis.

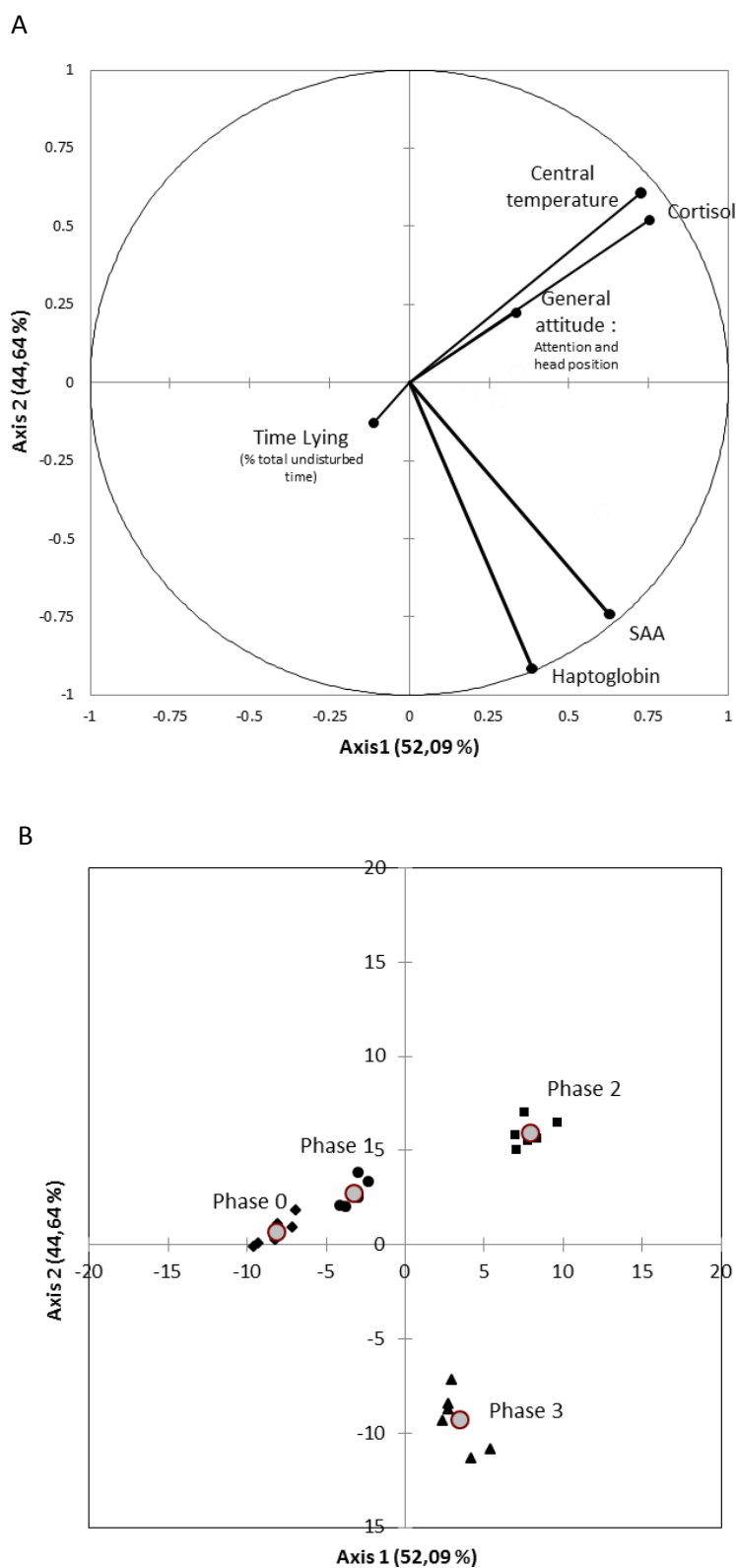
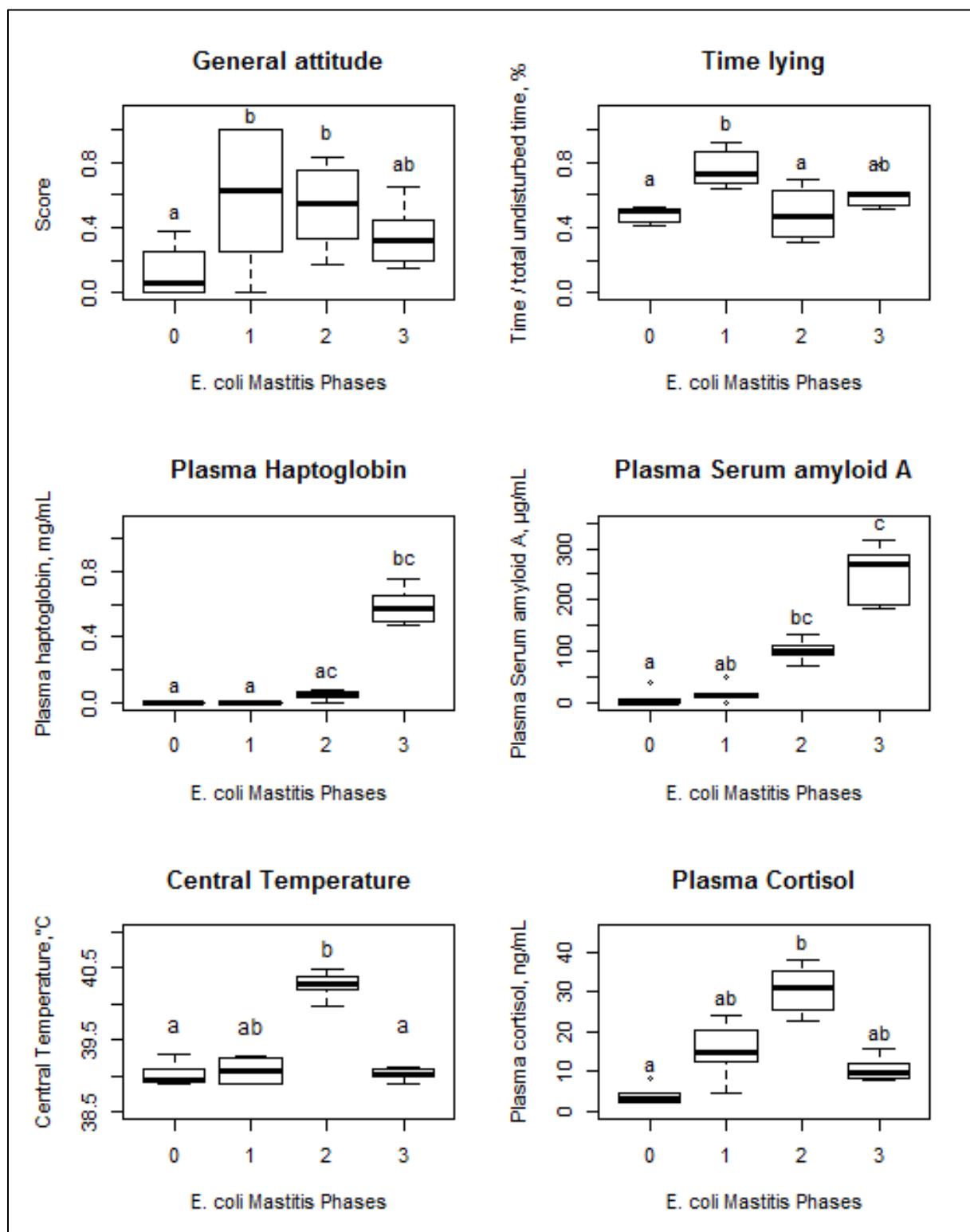


Figure 5. Changes in General attitude : Attention and head position, Time Lying (% total undisturbed time), plasma Haptoglobine concentration, plasma Serum Amyloïde A concentration, deep body temperature and plasma cortisol concentration from 6 Holstein-Friedsian cows inoculated with *E. coli*, at 0h at Phase 0 (before inoculation), Phase 1 (0 h to 8 h post inoculation), Phase 2 (12 h to 24 h post inoculation), and Phase 3 (32 h to 80 h post inoculation). Plots with different letters differ significantly at $P < 0.05$.



Supplementary materials. Median values [min-max] of the indicators from 6 Holstein-Friesian cows inoculated with *E. coli* at 0 h before inoculation (P0), at Phase 0 (before inoculation), Phase 1 (0 h to 8 h post inoculation), Phase 2 (12 h to 24 h post inoculation), and Phase 3 (32 h to 80 h post inoculation).. Behavioral Scores are expressed on a 0-1 value scale.

Indicators	P0	P1	P2	P3
Behavior				
Score Attention and head position	0.06 [0.00 – 0.38]	0.63 [0.00 – 1.00]	0.54 [0.17 – 0.83]	0.35 [0.15 – 0.65]
Score Eyelid position	0.13 [0.00 – 0.22]	0.25 [0.00 – 1.00]	0.42 [0.00 – 0.50]	0.30 [0.20 – 0.40]
Score Ear position	0.13 [0.00 – 0.25]	0.50 [0.00 – 1.00]	0.50 [0.00 – 1.00]	0.50 [0.00 – 1.00]
Score Facial Expression	0.00 [0.00 – 0.00]	0.00 [0.00 – 0.00]	0.00 [0.00 – 0.00]	0.00 [0.00 – 0.00]
Score Standing posture	0.00 [0.00 – 0.00]	0.00 [0.00 – 0.00]	0.00 [0.00 – 0.00]	0.00 [0.00 – 0.00]
Score Limb posture	0.00 [0.00 – 0.25]	0.00 [0.00 – 0.00]	0.00 [0.00 – 0.33]	0.00 [0.00 – 0.40]
Score Lying position	0.00 [0.00 – 0.00]	0.00 [0.00 – 0.50]	0.00 [0.00 – 0.00]	0.00 [0.00 – 0.00]
Score miscellaneous abnormal behaviors	0.00 [0.00 – 0.00]	0.00 [0.00 – 0.00]	0.00 [0.00 – 0.11]	0.00 [0.00 – 0.07]
Score Tail position	0.00 [0.00 – 0.00]	0.00 [0.00 – 0.00]	0.25 [0.00 – 0.50]	0.05 [0.00 – 0.10]
Score Clinical signs	0.00 [0.00 – 0.05]	0.00 [0.00 – 0.00]	0.07 [0.00 – 0.07]	0.08 [0.00 – 0.16]
Time Lying (% total undisturbed time)	50.0 [41.0 – 52.0]	72.5 [64.0 – 92.0]	47.0 [31.0 – 69.0]	60.0 [51.0 – 79.0]
Inflammation				
Haptoglobine (mg/mL)	0.00 [0.00 – 0.00]	0.00 [0.00 – 0.00]	0.05 [0.00 – 0.07]	0.57 [0.47 – 0.76]
SAA (µg / mL)	0.00 [0.00 – 37.5]	13.6 [0.00 – 48.6]	100.3 [71.8 – 132.5]	269.1 [181.7 – 317.4]
Central Temperature (°C)	39.0 [38.9 – 39.3]	39.0 [38.9 – 39.3]	40.3 [39.9 – 40.5]	39.0 [38.9 – 39.1]
HPA axis				
Cortisol (ng/mL)	3.14 [2.10 – 8.22]	15.0 [4.49 – 24.3]	31.3 [22.6 – 38.1]	9.96 [7.99 – 15.5]
Oxydative stress				
GSH/GSSG ratio	0.13 [0.06 – 0.50]	0.14 [0.09 – 0.31]	0.16 [0.11 – 0.32]	0.21 [0.19 – 0.42]

REFERENCES

- Agabriel, J. 2010. Alimentation des bovins, ovins et caprins: besoins des animaux et valeur des aliments. Tables INRA 2007, Mise à jour 2010.
- Arlot, S. and A. Celisse. 2010. A survey of cross-validation procedures for model selection. 40-79. doi:10.1214/09-SS054
- Auboiron, S., D. A. Sparrow, L. Beaubatie, D. Bauchart, J. T. Sparrow, P. M. Laplaud, and M. J. Chapman. 1990. Characterization and amino-terminal sequence of apolipoprotein AI from plasma high density lipoproteins in the preruminant calf, *Bos spp.* *Biochem Biophys Res Commun* 166(2):833-839.
- Bannerman, D. D., M. J. Paape, J. W. Lee, X. Zhao, J. C. Hope, and P. Rainard. 2004. *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* elicit differential innate immune responses following intramammary infection. *Clin Diagn Lab Immunol* 11(3):463-472. doi:10.1128/cdli.11.3.463-472.2004
- Blum, S., N. Sela, E. D. Heller, S. Sela, and G. Leitner. 2012. Genome analysis of bovine-mastitis-associated *Escherichia coli* O32:H37 strain P4. *J Bacteriol* 194(14):3732. doi:10.1128/jb.00535-12
- Boissy, A. and M. F. Bouissou. 1994. Effects of androgen treatment on behavioral and physiological responses of heifers to fear-eliciting situations. *Horm. Behav.* 28(1):66-83. doi:10.1006/hbeh.1994.1006
- Bougarn, S., P. Cunha, A. Harmache, A. Fromageau, F. B. Gilbert, and P. Rainard. 2010. Muramyl Dipeptide Synergizes with *Staphylococcus aureus* Lipoteichoic Acid To Recruit Neutrophils in the Mammary Gland and To Stimulate Mammary Epithelial Cells. *Clinical and Vaccine Immunology : CVI* 17(11):1797-1809. doi:10.1128/CVI.00268-10
- Bradley, A. J. 2002. Bovine Mastitis: An Evolving Disease. *Vet. J.* 164(2):116-128. doi:<http://dx.doi.org/10.1053/tvj.2002.0724>
- Caray, D., A. de Boyer des Roches, S. Frouja, S. Andanson, and I. Veissier. 2015. Hot-iron disbudding: stress responses and behavior of 1- and 4-week-old calves receiving anti-inflammatory analgesia without or with sedation using xylazine. *Livestock Science* (0). doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.livsci.2015.05.013>
- Coetzee, J. F. 2013. Assessment and Management of Pain Associated with Castration in Cattle. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 29(1):75-101. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.cvfa.2012.11.002>
- Cyples, J. A., C. E. Fitzpatrick, K. E. Leslie, T. J. DeVries, D. B. Haley, and N. Chapinal. 2012. Short communication: The effects of experimentally induced *Escherichia coli* clinical mastitis on lying behavior of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 95(5):2571-2575. doi:<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2011-5135>
- de Oliveira, F. A., S. P. L. Luna, J. B. do Amaral, K. A. Rodrigues, A. C. Sant'Anna, M. Daolio, and J. T. Brondani. 2014. Validation of the UNESP-Botucatu unidimensional composite pain scale for assessing postoperative pain in cattle. *BMC Veterinary Research* 10(1):1-14. doi:10.1186/s12917-014-0200-0
- Eckersall, P. D., F. J. Young, C. McComb, C. J. Hogarth, S. Safi, A. Weber, T. McDonald, A. M. Nolan, and J. L. Fitzpatrick. 2001. Acute phase proteins in serum and milk from dairy cows with clinical mastitis. *Vet Rec* 148(2):35-41.
- European Food Safety Authority. 2009. Scientific report of EFSA prepared by the Animal Health and Animal Welfare Unit (AHAW) on the effect of farming systems on dairy cow welfare and disease. Annex to the EFSA Journal 1143. 284. <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/1143r.pdf>
- Faure, M., V. Paulmier, A. Boissy, A.-S. Bage, C. Ravel, A. Guittard, A. De Boyer Des Roches, and D. Durand. 2014. Multiparametric approach to assess pain in sheep following an experimental surgery. Pages 117-117 in 6. International Conference on the Assessment of Animal Welfare at Farm and Group Level (WAFL 2014). Academic Publishers, Clermont-Ferrand.
- Faure, M., V. Paulmier, A. Boissy, A. de la Foye, A. de Boyer des Roches, and D. Durand. in revision. A multiparametric approach to discriminate stress and pain experienced by sheep during experimental surgeries. *Animal*, in revision.

- Fitzpatrick, J. L., A. M. Nolan, F. J. Young, C. J. Hogarth, T. Mc Donald, A. Weber, P. D. Eckersall, and H. C. Davidsmon. 2000. Objective measurement of pain and inflammation in dairy cows with clinical mastitis. in Proc. International Symposium on Veterinary Epidemiology and Economics, Breckenridge (CO).
- Flecknell, P. 2008. Analgesia from a veterinary perspective. *British journal of anaesthesia* 101(1):121-124. doi:[10.1093/bja/aen087](https://doi.org/10.1093/bja/aen087)
- Fogsgaard, K. K., T. W. Bennedsgaard, and M. S. Herskin. 2015. Behavioral changes in freestall-housed dairy cows with naturally occurring clinical mastitis. *J. Dairy Sci.* 98(3):1730-1738. doi:<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2014-8347>
- Fogsgaard, K. K., C. M. Røntved, P. Sørensen, and M. S. Herskin. 2012. Sickness behavior in dairy cows during *Escherichia coli* mastitis. *J. Dairy Sci.* 95(2):630-638. doi:<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2011-4350>
- Gleerup, K. B., P. H. Andersen, L. Munksgaard, and B. Forkman. 2015. Pain evaluation in dairy cattle. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 171:25-32. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.applanim.2015.08.023>
- Grøndahl-Nielsen, C., H. B. Simonsen, J. Damkjær Lund, and M. Hesselholt. 1999. Behavioural, Endocrine and Cardiac Responses in Young Calves Undergoing Dehorning Without and With Use of Sedation and Analgesia. *Vet. J.* 158(1):14-20. doi:<http://dx.doi.org/10.1053/tvj.1998.0284>
- Hart, B. L. 1988. Biological basis of the behavior of sick animals. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 12(2):123-137. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0149-7634\(88\)80004-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0149-7634(88)80004-6)
- Herry, V., C. Gitton, G. Tabouret, M. Repérant, L. Forge, C. Tasca, F. B. Gilbert, E. Guitton, C. Barc, C. Staub, D. G. E. Smith, P. Germon, G. Foucras, and P. Rainard. Submitted. Local immunization impacts the response of dairy cows to *Escherichia coli* mastitis. Submitted.
- Hogeveen, H., K. Huijps, and T. Lam. 2011. Economic aspects of mastitis: New developments. *New Zealand Veterinary Journal* 59(1):16-23. doi:10.1080/00480169.2011.547165
- Hopster, H., J. T. N. van der Werf, and H. J. Blokhuis. 1998. Stress enhanced reduction in peripheral blood lymphocyte numbers in dairy cows during endotoxin-induced mastitis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 66(1):83-97. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0165-2427\(98\)00189-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0165-2427(98)00189-5)
- Hudson, C., H. Whay, and J. Huxley. 2008. Recognition and management of pain in cattle. In *Practice* 30(3):126-134. doi:10.1136/inpract.30.3.126
- Huxley, J. N. and H. R. Whay. 2006. Current attitudes of cattle practitioners to pain and the use of analgesics in cattle. *Vet. Rec.* 159:662-668. doi:10.1136/vr.159.20.662
- Ito, K., D. M. Weary, and M. A. G. Von Keyserlingk. 2009. Lying behavior: assessing within - and between - herd variation in free-stall-housed dairy cows. *J. Dairy Sci.* 92:4412-4420. doi:10.3168/jds.2009-2235
- Jensen, M. B., L. J. Pedersen, and L. Munksgaard. 2005. The effect of reward duration on demand functions for rest in dairy heifers and lying requirements as measured by demand functions. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 90(3-4):207-217. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.applanim.2004.08.006>
- Lebart, L., M. Piron, and A. Morineau. 1995. *Statistique exploratoire multidimensionnelle*. Dunod, ed.
- Leslie, K. E. and C. S. Petersson-Wolfe. 2012. Assessment and management of pain in dairy cows with clinical mastitis. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 28(2):289-305. doi:10.1016/j.cvfa.2012.04.002
- Martin, J. and I. N. H. White. 1991. Fluorimetric determination of oxidised and reduced glutathione in cells and tissues by high-performance liquid chromatography following derivatization with dansyl chloride. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 568(1):219-225. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/0378-4347\(91\)80356-H](http://dx.doi.org/10.1016/0378-4347(91)80356-H)
- Martin, P. and P. Bateson. 2013. *Measuring behaviour: an introductory guide*. 3rd edition ed. Cambridge University Press.
- McDougall, S., M. A. Bryan, and R. M. Tiddy. 2009. Effect of treatment with the nonsteroidal antiinflammatory meloxicam on milk production, somatic cell count, probability of re-treatment, and culling of dairy cows with mild clinical mastitis. *J. Dairy Sci.* 92(9):4421-4431. doi:<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2009-2284>

Mialon, M.-M., V. Deiss, S. Andanson, F. Anglard, M. Doreau, and I. Veissier. 2012. An assessment of the impact of rumenocentesis on pain and stress in cattle and the effect of local anaesthesia. *Vet. J.* 194(1):55-59. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2012.02.019>

Millman, S. T. 2013. Behavioral Responses of Cattle to Pain and Implications for Diagnosis, Management, and Animal Welfare. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 29(1):47-58. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.cvfa.2012.11.007>

Mølgaard, L., B. M. Damgaard, V. Bjerre-Harpøth, and M. S. Herskin. 2012. Effects of percutaneous needle liver biopsy on dairy cow behaviour. *Res. Vet. Sci.* 93(3):1248-1254. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2012.04.001>

Molony, V. and J. E. Kent. 1997. Assessment of acute pain in farm animals using behavioral and physiological measurements. *J Anim Sci* 75(1):266-272.

Prunier, A., L. Mounier, P. Le Neindre, C. Letierrier, P. Mormede, V. Paulmier, P. Prunet, C. Terlouw, and R. Guatteo. 2013. Identifying and monitoring pain in farm animals: a review. *Animal* 7(6):998-1010. doi:10.1017/s1751731112002406

Royster, E. and S. Wagner. 2015. Treatment of mastitis in cattle. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 31(1):17-46, v. doi:10.1016/j.cvfa.2014.11.010

Salvemini, D., J. W. Little, T. Doyle, and W. L. Neumann. 2011. Roles of reactive oxygen and nitrogen species in pain. *Free radical biology & medicine* 51(5):951-966. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.01.026

Schukken, Y. H., J. Gunther, J. Fitzpatrick, M. C. Fontaine, L. Goetze, O. Holst, J. Leigh, W. Petzl, H. J. Schuberth, A. Sipka, D. G. Smith, R. Quesnell, J. Watts, R. Yancey, H. Zerbe, A. Gurjar, R. N. Zadoks, and H. M. Seyfert. 2011. Host-response patterns of intramammary infections in dairy cows. *Vet Immunol Immunopathol* 144(3-4):270-289. doi:10.1016/j.vetimm.2011.08.022

Sharma, L., A. K. Verma, A. Rahal, A. Kumar, and R. Nigam. 2016. Relationship between serum biomarkers and oxidative stress in dairy cattle and buffaloes with clinical and sub-clinical mastitis. *Biotechnology* 15(3-4):96-100. doi:10.3923/biotech.2016.96.100

Siivonen, J., S. Taponen, M. Hovinen, M. Pastell, B. J. Lensink, S. Pyörälä, and L. Hänninen. 2011. Impact of acute clinical mastitis on cow behaviour. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 132(3-4):101-106. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.applanim.2011.04.005>

Theurer, M. E., B. J. White, J. F. Coetzee, L. N. Edwards, R. A. Mosher, and C. A. Cull. 2012. Assessment of behavioral changes associated with oral meloxicam administration at time of dehorning in calves using a remote triangulation device and accelerometers. *BMC Veterinary Research* 8:48. doi:10.1186/1746-6148-8-48

Veissier, I., P. Le Neindre, and G. Trillat. 1989. The use of circadian behaviour to measure adaptation of calves to changes in their environment. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 22(1):1-12. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/0168-1591\(89\)90075-0](http://dx.doi.org/10.1016/0168-1591(89)90075-0)

Viñuela-Fernández, I., D. Weary, and P. Flecknell. 2011. Pain. Pages 64-77 in *Anim. Welfare*. Michael C. Appleby, Joy A. Mench, I. Anna S. Olsson, and B. O. Hughes, ed. C.A.B. International.

Weary, D. M., L. Niel, F. C. Flower, and D. Fraser. 2006. Identifying and preventing pain in animals. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 100(1-2):64-76. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.applanim.2006.04.013>

Wenz, J. R., G. M. Barrington, F. B. Garry, R. P. Dinsmore, and R. J. Callan. 2001. Use of systemic disease signs to assess disease severity in dairy cows with acute coliform mastitis. *J Am Vet Med Assoc* 218(4):567-572.

Publication N°6

Evaluation de l'efficacité d'une analgésie multimodale dans le cadre d'interventions chirurgicales sur le tractus digestif pratiquées chez la vache laitière en lactation.

M. Faure, P. Lamberton, A. de Boyer des Roches, S. Lemosquet, D. Durand

The Veterinary Journal en préparation

Résumé :

De nombreuses études de digestion ou de métabolisme conduites chez le bovin nécessitent la pose en chronique de canules et/ou de cathéters au niveau du tractus digestif. Ces interventions chirurgicales sont connues pour entraîner des douleurs somatiques et viscérales. L'objectif de cette étude était d'évaluer l'efficacité d'un protocole médicamenteux combinant AINS et opioïdes pour réduire la douleur induite par la pose de canules ruminale et duodénale chez la vache laitière. Nous avons pour cela utilisé une approche multiparamétrique d'évaluation de la douleur développée chez les ovins, combinant des réponses comportementales, physiologiques, métaboliques et zootechniques. Cinq vaches laitières primipares de race Holstein au 219^{ème} ± 13 jours de lactation ont été fistulées du rumen et du duodénum. Les observations et mesures ont été réalisées 7 jours avant la chirurgie (J-7), puis 1 (J1), 3 (J3), 5 (J5) et 13 (J13) jours après la chirurgie. Les quantités ingérées sont significativement diminuées en J1 (-30%, $P < 0.05$) et ré-augmentent progressivement pour atteindre leur niveau initial en J13. L'haptoglobine atteint 662 ± 88 mg/L en J5 pour revenir à des taux normalisés en J13. Le rapport du glutathion réduit/oxydé est significativement diminué (-85%, $P < 0.01$) dès J1, de même que la vitamine E en J5 (-45 %, $P < 0.05$). Seul, l'indicateur "attitude anormale" augmente significativement à J1 et J3, cet indicateur restant élevé de J5 à J13, mais non significativement différent des valeurs mesurées avant opération (J-7). L'approche multiparamétrique a permis de discriminer les animaux à chacun des stades avec de très bonnes performances (justesse variant de 88 à 100%). Le traitement pharmacologique proposé limite de façon satisfaisante la réaction inflammatoire et la douleur associée, un apport plus significatif d'opioïdes et d'antioxydants en peropératoire serait à envisager.

Evaluation de l'efficacité d'une analgésie multimodale dans le cadre d'interventions chirurgicales sur le tractus digestif pratiquées chez la vache laitière en lactation.

M. FAURE¹, P. LAMBERTON², A. DE BOYER DES ROCHES¹, S. LEMOSQUET², D.DURAND^{1*}

¹ UMR1213 Herbivores, INRA, VetAgro Sup, Clermont université, université de Lyon, 63122 Saint-Genès-Champanelle,

² UMR Pegase, INRA, 35590 Saint-Gilles

*Corresponding author. Tel.: 0473624227
E-mail address: denis.durand@inra.fr

Résumé :

De nombreuses études de digestion ou de métabolisme conduites chez le bovin nécessitent la pose en chronique de canules et/ou de cathéters au niveau du tractus digestif. Ces interventions chirurgicales sont connues pour entraîner des douleurs somatiques et viscérales. L'objectif de cette étude était d'évaluer l'efficacité d'un protocole médicamenteux combinant AINS et opioïdes pour réduire la douleur induite par la pose de canules ruminale et duodénale chez la vache laitière. Nous avons pour cela utilisé une approche multiparamétrique d'évaluation de la douleur développée chez les ovins, combinant des réponses comportementales, physiologiques, métaboliques et zootechniques. Cinq vaches laitières primipares de race Holstein au 219^{ème} $\pm$ 13 jours de lactation ont été fistulées du rumen et du duodénum. Les observations et mesures ont été réalisées 7 jours avant la chirurgie (J-7), puis 1 (J1), 3 (J3), 5 (J5) et 13 (J13) jours après la chirurgie. Les quantités ingérées sont significativement diminuées en J1 (-30%, $P < 0.05$) et ré-augmentent progressivement pour atteindre leur niveau initial en J13. L'haptoglobine atteint 662 ± 88 mg/L en J5 pour revenir à des taux normalisés en J13. Le rapport du glutathion réduit/oxydé est significativement diminué (- 85%, $P < 0.01$) dès J1, de même que la vitamine E en J5 (-45 %, $P < 0.05$). Seul, l'indicateur "attitude anormale" augmente significativement à J1 et J3, cet indicateur restant élevé de J5 à J13, mais non significativement différent des valeurs mesurées avant opération (J-7). L'approche multiparamétrique a permis de discriminer les animaux à chacun des stades avec de très bonnes performances (justesse variant de 88 à 100%). Le traitement pharmacologique proposé limite de façon satisfaisante la réaction inflammatoire et la douleur associée, un apport plus significatif d'opioïdes et d'antioxydants en peropératoire serait à envisager.

Mots clés : analgésie multimodale, évaluation de la douleur, approche multiparamétrique, vache laitière, chirurgie.

Introduction

L'expérimentation sur animaux est souvent l'objet de nombreuses critiques, particulièrement dans le cas où ceux-ci subissent une intervention chirurgicale. Or un nombre significatif d'études de digestion ou de métabolisme réalisées en recherche agronomique nécessite la pose en chronique de canules et/ou de cathéters au niveau du tractus digestif permettant de réaliser des prélèvements (ou des injections) à différents niveaux du tractus digestif (rumen, duodénum et iléon). Les techniques de pose de canule sont assez anciennes (Flourens, 1833). Elles consistent à réaliser un orifice (ou fistule) à travers la paroi abdominale et à implanter en chronique une canule qui permettra d'effectuer des prélèvements. Il est bien établi que les laparotomies sont des procédures entraînant de la douleur comme cela a été montré chez les petits animaux (Roughan and Flecknell, 2001). Plus spécifiquement, chez l'ovine, ces interventions sur le tractus digestif entraînent des douleurs somatiques, suite aux lésions survenant lors de la laparotomie, mais aussi viscérales, suite aux tensions et distensions des organes creux et à l'inflammation consécutive survenant sur le tractus digestif (Faure et al., en révision). Ces interventions posent donc deux questions qui concernent d'une part le niveau de douleur engendré et d'autre part l'efficacité des protocoles analgésiques habituellement utilisés. A ce jour, peu d'études ont été conduites dans ce sens chez les bovins. Une étude ancienne avait rapporté des traitements analgésiques introduisant des dérivés morphiniques associés à des AINS, sans toutefois en évaluer l'efficacité (Sams et Fubini, 1993). Concernant l'analgésie associée aux interventions chirurgicales pratiquées chez les animaux de rente, beaucoup d'interventions se pratiquent encore sous anesthésie locale sans association avec des antiinflammatoires. Par exemple, une étude conduite en Angleterre montre qu'un tiers des césariennes sont réalisées sans AINS (Huxley and Whay, 2006). De même, une étude canadienne réalisée entre 2004 et 2005, rapporte que lors des interventions sur l'épiploon nécessitant une laparotomie, les traitements analgésiques étaient limités à des anesthésiques locaux, l'emploi d'AINS n'étant jamais rapporté (Hewson et al., 2007). Pourtant l'analgésie multimodale inhibant le message nociceptif à plusieurs niveaux en parallèle apparaît comme beaucoup plus efficace que l'analgésie unimodale, comme cela avait été rapporté dès 2005 chez le cheval (Valverde, 2005). Par exemple, l'association de sédatifs aux AINS est plus efficace pour limiter des douleurs liés à l'écornage (Stafford and Mellor, 2005,

Caray et al., 2014). De même, si l'on se réfère à l'étude réalisée en 2010 (Boreve), il est important d'adapter les protocoles analgésiques à l'intensité douloureuse, les douleurs de palier 3 (torsion de caillette, amputation d'onglon...) nécessitant un traitement associant AINS, morphinique et anesthésie loco régionale. Par ailleurs, nous avons montré, chez le mouton mâle castré, que lors de la pose de plusieurs canules digestives (rumen, duodénum et iléon), les AINS seuls étaient insuffisants pour prévenir efficacement la douleur induite par la chirurgie (Faure et al., en révision). Chez les bovins, la seule étude qui aborde l'analgésie dans le cadre de la pose de canules est celle de Newby et al. (2014) qui a évalué l'efficacité d'anti-inflammatoires non stéroïdiens sur quelques indicateurs de douleur en post-opératoire. Des approches plus intégrative de l'évaluation de la douleur ont été proposées chez le mouton après pose de canules digestives (Faure et al., 2015 ; Faure et al, en révision). Cette évaluation de la douleur est basée sur une approche multiparamétrique combinant des réponses comportementales, physiologiques, métaboliques et zootechniques. Cette approche multiparamétrique présente des performances de discrimination de différentes situations douloureuses bien supérieures aux performances des différentes voies considérées une à une.

L'objectif de cette expérimentation était d'évaluer l'efficacité d'un protocole médicamenteux combinant AINS et opioïdes pour réduire la douleur induite par une chirurgie invasive (pose de canules ruminale et duodénale) chez cinq vaches laitières en production. Nous avons pour cela utilisé une approche multiparamétrique d'évaluation de la douleur développée chez les ovins et adaptée à des bovins en production.

Matériels and Méthodes

Animaux, conditions de logement

L'expérience a été conduite à l'installation expérimentale de production du lait de l'UMR1348 PEGASE de l'INRA à Mejusseume (1.71°W, 48.11°N; Brittany, France) durant le printemps 2014. Cinq vaches laitières primipares de race Holstein ont été fistulées du rumen et du duodenum. Les chirurgies ruminales et duodénales ont été réalisées après obtention de l'autorisation à expérimenter N°7 R-2012-PL-01. Avant la mise à jeun préparatoire des chirurgies, les vaches étaient en moyenne à 219 ± 13 jours de lactation, elles étaient gestantes de 117 ± 5 jours, elles pesaient 534 ± 24 kg et elles produisaient 17.4 ± 2.3 kg/j de lait. Les vaches étaient logées en stalles individuelles dans une salle climatisée deux semaines avant le début de la chirurgie et pendant les 5 semaines post-chirurgie. Avant la préparation de la chirurgie elles avaient un accès libre à l'alimentation et à l'eau. La ration

était distribuée deux fois par jour (ad libitum) et était composée d'ensilage de maïs (62% de la MS), d'ensilage d'herbe (6% de la MS), de paille (1% de la MS), de luzerne déshydratée (10% de la MS), de tourteau de soja 48 (10% de la MS), d'un concentré énergétique à base de céréales (10 % de la MS) et d'un complément minéral vitaminé (1% de la MS) composé de 5.5 % phosphore, 27 % de calcium et 4 % de magnésium.

Chirurgies

1 - Préparation des animaux à l'opération

A J-3, les vaches ont été douchées et tondues entièrement. Un cathéter de 30 cm de longueur (diamètre interne 1.02 mm, externe 2.16 mm: Fisher scientific, Strasbourg, France) a été implanté dans une veine jugulaire pour faciliter un apport énergétique important dès le début de la diète alimentaire préopératoire. La pose du cathéter a été réalisée sous anesthésie locale après injection de 2 ml de Lurocaïne® (Vetoquinol SA, Lure, France). Les animaux étaient soumis à une diète alimentaire de 48 h et une diète hydrique de 24 h avant l'intervention. Les animaux ont reçu par voie veineuse, durant les 48 heures de diète, une perfusion lente (15 ml/mn) de glucose 30% (500 ml ; Bruneau Braun Medical Boulogne Billancourt, France), d'énerghepa (500 ml ; Virbac, Carros, France), de rehydrex (500ml : Coophavet , Ancenis , France) ainsi que 2 poches de 10 L de ringer/lactate (Virbac, Carros, France) en perfusion plus rapide (250 ml/mn). Les vaches ont été rasées au niveau des zones d'implantation des canules et ont reçu une injection d'antibiotiques en intramusculaires de 65 ml d'intramicine® (Ceva Santé Animale, Libourne, France).

2 - Protocole d'anesthésie et d'analgésie

Quinze minutes avant d'être amenées en salle de chirurgie; les vaches ont reçu une dose de xylasine 2 % (Rompun, BAYER santé animale; Puteaux; France) (0.5 ml/100 kg/PV; IM) pour leur tranquillisation. L'induction de l'anesthésie a été obtenue par injection intraveineuse (au niveau de la veine jugulaire) de kétamine (IMALGENE 1000, Merial, Lyon France) (0,03 ml / kg de PV; IM). En quelques secondes, l'animal a perdu son tonus et a été allongé au sol grâce à la descente progressive des treuils. L'intubation a été réalisée aussitôt avec une sonde trachéale de 27 mm de diamètre. Celle-ci a été aussitôt connectée à l'appareil d'anesthésie en phase gazeuse et l'isoflurane (Axience, Pantin, France) a été délivré à une concentration de 5% en mélange avec de l'oxygène pendant quelques minutes jusqu'à obtention d'une anesthésie profonde puis de 1 à 2% en fonction des animaux de façon à les maintenir au stade

3 de l'anesthésie (disparition des réflexes palpébral et cornéen). Dès que le stade 3 était obtenu, l'animal était placé sur la table d'opération à l'aide des treuils, en position de décubitus latéral droit pour la chirurgie de pose de la canule ruminale. Juste avant de commencer l'opération, 20 mL de Flunixin (anti-inflammatoire) ont été injectés en intramusculaire (Genixine, Coophavet, Ancenis, France). Par ailleurs, l'animal a reçu 5 l de Ringer lactate (Virbac, Carros, France), 500 ml de glucose 30% (Bruneau Braun Medical Boulogne Billancourt, France) et 500 ml de rehydex (Coophavet France Ancenis, France) au cours de l'intervention.

3 - Description de la chirurgie

Le flanc de l'animal a été désinfecté par trois nettoyages successifs à l'aide d'un savon désinfectant (Vétédine solution Povidone iodée; Vétoquinol, Lure France) et d'alcool iodé puis les champs opératoires ont été posés autour du site opératoire. L'emplacement de pose de la canule a été préalablement repéré chez l'animal vigile et en position debout. Une incision égale au diamètre interne de la canule a été effectuée au bistouri au niveau de la peau, celle-ci étant ensuite décollée des plans sous-jacents sur tout le périmètre de l'incision. Les différents plans musculaires ont ensuite été dilacérés à partir d'une ouverture effectuée au centre de l'incision. Une partie du sac dorsal du rumen, la moins vascularisée possible, était extériorisée et une ouverture de forme circulaire et égale au diamètre de la canule a été réalisée. Le corps de la canule munie d'une rondelle interne a été introduit à l'intérieur du rumen, celle-ci a été en partie extériorisée permettant l'invagination de la paroi du rumen sur 4 cm tout autour de la canule. Après suture, du rumen sur le corps de la canule, celle-ci était replacée dans la cavité abdominale. Pour finir, un antibiotique a été administré en local tout autour de la canule (15 ml d'intramixine, Ceva Santé animale, Libourne, France). Une gaze stérile a été placée sur la plaie autour de la canule et la rondelle externe a été posée et maintenue en place par une rondelle clipsée dans une gorge du corps de la canule. L'animal a ensuite été placé en décubitus latéral gauche pour la pose de la canule duodénale. Le site opératoire a été préparé de la même façon que pour la canule ruminale. Une incision de 20 cm a été réalisée au bistouri sur le flanc droit, parallèlement à la colonne vertébrale, à partir d'un point situé à 10 cm de la dernière côte flottante. Les différents plans musculaires ont été dilacérés. Après avoir repéré le duodénum, la caillette et le pylore, le duodenum proximal était extériorisé. L'intestin a été incisé sur 4 cm à environ 10 cm du pylore. Après introduction de la canule dans l'intestin, celui-ci a été suturé autour de la canule. Une incision de la peau (4 cm) a été réalisée au niveau du site d'extériorisation préalablement repéré (haut du flanc) chez l'animal en

position debout. La canule a été extériorisée par cette incision de manière à bien plaquer la canule à la paroi abdominale et favoriser les adhérences. Le péritoine et les différents plans musculaires ont été suturés. Un antibiotique (15 ml d'intramicine, Ceva Santé animale, Libourne, France) a été délivré sur la plaie en cours de la suture. Pour finir, la peau a été suturée et un spray cicatrisant (Orospray) a été pulvérisé autour de la canule. La canule est maintenue en place à l'extérieur à l'aide d'une gaze stérile assurée par du sparadrap. En fin de chirurgie, un antibiotique local (15 ml Intramicine® (Ceva Santé Animale, Libourne, France) était délivré sur toute périphérie de la canule. Un cicatrisant a été délivré tout autour de la canule (Orospray®, Vetoquinol SA, Lure, France), puis une gaze stérile était placée sur plusieurs tours et maintenue à l'aide de sparadrap.

4 - Suivi post-chirurgical

Dès la fin de l'opération, l'isoflurane était arrêté, l'animal était ensuite transféré rapidement dans le box de réveil. Dès que l'animal avait retrouvé ses réflexes de déglutition, il était extubé en ayant pris soin au préalable d'éliminer les particules alimentaires présentes dans la bouche. Trente minutes après son réveil, l'animal avait accès à l'eau et était ensuite transféré dans une salle de l'installation expérimentale spécialement aménagée pour ce type d'animaux. Les animaux étaient gardés en stalle individuelle pendant 5 semaines après la chirurgie. Les plaies chirurgicales étaient désinfectées tous les jours pendant 3 semaines. De J0 à J3, 65 ml d'Intramicine (CEVA santé animale, Lure France, PAys) étaient administrés en IM matin et soir. De la Flunixin (25 ml Genixine) était injectée en J2, J3 J4 (IM) ainsi qu'un mL de Torbugésic (Butorphanol ; Zoetis , Paris France) (IV) 4 h après l'opération puis le lendemain matin.

Les animaux ont reçu pendant 3 jours, par voie veineuse, des perfusions nutritives de Biosorbix (Biové , Arques , France ; 500 ml/ j), d'Energhepa (Virbac ; Carros ; France, 500 ml/ j) ; de glucose 30% (Bruneau Braun Médical, Boulogne Billancourt, France 500 ml/j). Ils recevaient également pendant 2 jours du Ringer/lactate (Coophavet, Ancenis, France, 15 litres à J1; 10 litres à J2) et des stimulants et régulateurs des fonctions digestives via la canule du rumen (de la carnithine; Vigosine Ceva santé animale, Libourne, France pendant 3j ; des vitamines K à J1 ; du Besortyl, Elanco France , Rueil malmaison , France pendant 5 jours et du Rumigastryl; CEVA santé animale , Libourne , France pendant 5 jours). Ils ont été progressivement réalimenté : le jour de l'opération et le lendemain ils recevaient 15 kg bruts d'ensilage de maïs et 1kg brut de tourteau de soja 48 ainsi que du foin à volonté. Les jours suivants, les quantités d'ensilage de maïs et de concentrés étaient progressivement

augmentées en fonction de l'ingestion de la vache jusqu'à récupération totale du niveau d'ingestion et de production de lait d'avant la chirurgie

Mesures réalisées

1 - Indicateurs de productions

Pendant toute la durée de l'expérimentation (de J-7 à J 13), la production laitière à chaque traite, les quantités ingérées et la consommation d'eau ont été mesurés individuellement.

2 - Réponse comportementale

Les observations comportementales de chaque animal ont été réalisées par la méthode du scan sampling (Martin & Bateson, 2013) par trois observateurs formés pour observer le comportement des animaux, en utilisant l'éthogramme défini dans le tableau 1. En jours J-7 et J-6 avant l'intervention chirurgicale, 1 grille par jour a été remplie (à 14h) sur chacune des vaches. En période post-opératoire, deux grilles étaient remplies le jour de l'intervention (J0, +6h et + 12h après intervention), le lendemain (J1, 10 h et 14h), 3 jours après l'opération (J3, 14h) puis une grille a été remplie en J5 (14h) et J13 post-opératoires (14h). L'enregistrement des observations comportementales a été effectuée avec une grille comportementale « EvaDoul »" développée par des équipes de recherche INRA.

3 - Réponse physiologiques

Des prélèvements sanguins (veine jugulaire) ont été effectués le matin avant la distribution du repas en pré-opératoire (J-7, J-6) et en post-opératoire (J1, J3, J5 et J13). Pour chaque animal, 37.5 mL de sang ont été prélevés sur différents anticoagulants (tubes S-Monovette de 7.5 mL, EDTA di Na2 ou Heparin; Sarstedt Nümbrecht, Allemagne). Du sang total (400 µL) a été prélevé et déprotéinisé en vue du dosage du glutathion sanguin. Puis, l'ensemble des tubes a été centrifugé à 4°C (15 min à 2000 g/min), et le plasma récupéré a été aliquoté puis congelé à -80°C jusqu'à la mise en œuvre des dosages

3.1 - Inflammation : haptoglobine et TNF α

L'haptoglobine est une protéine de l'inflammation synthétisée par le foie. Son dosage plasmatique est réalisé par immunoprécipitation selon la méthode décrite par Auboiron et al., (1990). La concentration plasmatique en TNF α a été mesurée par une méthode immuno-enzymatique de type ELISA à l'aide du kit "GenWay" (ref. : GWB-F0F1X9).

3.2 - Axe hypothalamo-hypophysaire : cortisol, glucose and AGNE

La concentration plasmatique en cortisol est déterminée par une méthode de radioimmunologie (Boissy et al., 1994). Le cortisol sous forme lié est séparé de la transcortine grâce à un tampon de glycine à pH 3.0. Le principe de ce dosage repose sur une compétition entre du cortisol radioactif (tritium) et le cortisol endogène face à un anticorps spécifique. Les concentrations plasmatiques en glucose et en acides gras non estérifiés (AGNE) ont été déterminées par des méthodes enzymatique et colorimétrique sur l'automate Arena 20 XT selon la méthode de Trinder et al., (1969) pour le glucose et selon la méthode de Scislowski et al. (2005) pour les AGNE. Les réactions enzymatiques ont été conduites par incubation au bain-marie à 37°C et la densité optique mesurée par spectrophotométrie à 550 nm (glucose et AGNE).

3.3 - Stress oxidant: Glutathion, vitamine A and E, NO and MDA

Le glutathion existe sous les formes réduites (GSH) et oxydées (GSSG). L'oxydation du glutathion réduit permet la neutralisation des radicaux libres en excès selon la réaction $\text{GSH} + \text{peroxyde} \Rightarrow \text{GSSG} + \text{peroxyde réduit}$. Le dosage des concentrations plasmatiques en GSH et GSSG est réalisé par HPLC (Hiigh Performance Liquid Chromatography) selon la méthode de Martin et al., (1991).

Les concentrations plasmatiques en vitamines A et E, antioxydants exogènes, sont déterminées par HPLC selon la méthode de Hatam and Kayden (1979).

Le NO est produit en réponse à une inflammation par des cellules inflammatoires (macrophages, fibroblastes et hépatocytes) et ses produits finaux in vivo sont le nitrite (NO_2^-) et le nitrate (NO_3^-) dont la somme est un indicateur de la production totale de NO. Les concentrations plasmatiques de ses produits finaux sont dosées avec le kit de dosage fluorométrique (réf. 780051, Cayman Chemical Company).

Le MDA plasmatique est un des aldéhydes majeurs formés lors de la peroxydation lipidique. Le dosage colorimétrique du MDA dans le plasma permet d'évaluer l'amplitude des attaques radicalaires sur les AGPI (acides gras polyinsaturés) du plasma. L'analyse du MDA est réalisée par HPLC selon la méthode d'Agarwal et al., (2002).

Analyse Statistique

Deux journées de mesures ont été réalisées avant toute intervention (j-7 et J-6) et ont été par la suite moyennées pour n'apparaître que comme 1 seule donnée (J-7). Puis 4 temps post chirurgie ont été définies, soit 1 (J1), 3 (J3), 5 (J5) et 13 (J13) jours après opération.

Chaque catégorie de comportement a été établie à partir de plusieurs items comportementaux : par exemple, la catégorie "attitude générale" regroupe les comportements "tête basse» et «apathique". Ensuite, nous avons calculé un score pour chaque catégorie de comportement puis son pourcentage d'expression sur chaque jour de mesure (J-7, J1, J3, J5 et J13).

Afin de tester un effet temps avec un échantillon apparié sur les différents indicateurs mesurés, nous avons fait des tests non paramétriques de Friedman puis des comparaisons des données appariées par la méthode de Nemenyi. Enfin, nous avons effectué une analyse factorielle discriminante (AFD) pour discriminer statistiquement les différentes journées de mesures (J-7 vs J1 vs J3 vs J5 vs J13). Cette AFD utilise les différentes voies impliquées dans la douleur liée à une chirurgie à savoir les performances zootechniques, le comportement, l'inflammation, le stress oxydatif et l'axe hypothalamo-hypophysaire. L'analyse discriminante permet de mettre en évidence les variables sur lesquelles les temps de mesures diffèrent et identifie une combinaison linéaire optimale des variables discriminantes (modèle complet). Cette fonction discriminante est de la forme: $D_i = d_{i1}Z_1 + d_{i2}Z_2 + \dots + d_{ip}Z_p$; où D_i est le score sur la fonction discriminante I ; d 's sont des coefficients de pondération, et Z 's sont les valeurs des variables discriminantes p utilisées dans l'analyse discriminante. Afin d'identifier des combinaisons linéaires des variables qui discriminent au mieux les différents jours, nous avons simplifié le modèle complet par élimination progressive de variables par une "septwise" descendante : le seuil pour conserver une variable dans le modèle final a été fixé à $P = 0,05$. Pour interpréter les composantes discriminantes (axes) de l'AFD, nous avons choisi les variables avec une corrélation de valeur absolue supérieure à 0,3. Enfin, nous avons estimé les performances du modèle prédictif final en exécutant une validation croisée. La validation croisée met en évidence le nombre de vaches correctement classées et donc permet de calculer les performances du modèle final: la sensibilité (pourcentage de vaches correctement prédit à ressentir la douleur; $Se = \text{Vrai positif} / \text{Vrai positif} + \text{Faux négatifs}$) et la spécificité (pourcentage de vaches correctement prédit à ne pas ressentir une douleur; $Sp = \text{Vrai négatifs} / \text{Vrai négatifs} + \text{Faux positifs}$). Toutes les analyses ont été effectuées en utilisant XLSTAT 2015

Résultats

1 - Evolution des différents indicateurs au cours de la période d'observation

1.1 - Performances zootechniques (figure 1)

Les quantités ingérées sont significativement diminuées le lendemain de l'intervention (-30%, $P < 0.05$) et ré-augmentent progressivement pour atteindre leur niveau initial en J13. Dans le même temps, la production laitière n'est pas significativement diminuée par l'intervention et atteint en J13 des niveaux supérieurs aux valeurs initiales (18.7 ± 2.2 vs 14.8 ± 0.6 kg/j en J13 et J-7 respectivement) même si cette augmentation n'est pas statistiquement significative ($P = 0.115$).

1.2 – Inflammation (figure 2)

Les niveaux d'inflammation mesurés au travers l'haptoglobine montrent que ceux-ci sont augmentés dès le premier jour post-opératoire (148 ± 7 vs 3 ± 0.1 mg/L) pour atteindre 662 ± 88 mg/L en J5. Cependant, cette poussée inflammatoire n'apparaît plus à J13. Le $\text{TNF}\alpha$ ne présente pas de variation significative au cours du temps et varie de 0.44 ± 0.06 à 1.19 ± 0.46 pg/mL.

1.3 - Stress oxydant (figure 3)

Le niveau de stress oxydant apprécié par le rapport du glutathion réduit/oxydé montre clairement l'apparition d'un stress très marqué dès le premier jour post-opératoire (-85%, $P < 0.01$), stress qui reste très marqué pendant les 5 jours post-chirurgie, pour revenir à des valeurs encore basses en J13 (0.13 ± 0.10) mais non significativement différent de celles mesurées en J-7. Dans le même temps, les réserves en antioxydants (vitamines A et E) chutent, cette chute devenant significative pour la vitamine E qu'en J5 (-45 %, $P < 0.05$), alors que l'apparition de produits d'oxydation (MDA) augmente significativement également en J5 (+45%, $P < 0.05$).

1.4 - Axe hypothalamo-hypophysaire (figure 4)

Les variations d'activité de l'axe hypothalamo-hypophysaire (AHH) sont essentiellement observées 1 jour après chirurgie (J1), le cortisol et les AGNE étant multiplié par 3.3 et 2.3 respectivement, ces augmentations n'étant cependant pas significatives. Dès J3, les concentrations plasmatiques de ces 2 indicateurs reviennent à des taux comparables à ceux observés avant la chirurgie. Les teneurs en glucose restent stables tout au long de la période d'observation et voisinent de 0.8 – 0.9 g/L.

1.5 – Comportement (figure 5)

Les indicateurs de comportement présentent une grande variabilité entre individus. Seul, l'indicateur "attitude anormale" augmente significativement à J1 et J3, cet indicateur restant

élevé de J5 à J13, mais non significativement différent des valeurs mesurées avant opération (J-7). Les autres indicateurs comportementaux comme les signes cliniques ou anormaux, les postures antalgiques ou des pattes ou de couchage ou enfin les positions des oreilles ne sont pas modifiés significativement par la chirurgie.

2 - Approche multiparamétrique (figure 6, tableaux 2 et 3)

L'analyse factorielle discriminante a été réalisée sur J-7, J1, J3, J5 et J13 et les 5 périodes correspondant aux 5 journées de mesure ont été clairement identifiées et discriminées selon 2 axes. L'axe 1, qui porte 90 % de la variance observée du modèle, est expliqué par l'inflammation, l'haptoglobine et le TNF présentant des corrélations absolues de 0.882 et 0.311 respectivement, mais aussi très fortement par le stress oxydant, en particulier le rapport GSH/GSSG (corrélation de 0.803). En plus de la MSI, le comportement est également très discriminant, les attitudes anormales et les postures antalgiques présentant des corrélations de 0.616 et 0.407 respectivement. L'axe 2, qui explique seulement 5.75 % de la variance observée du modèle, est essentiellement expliqué par les performances zootechniques (0.712 et 0.421 pour la production laitière et la MSI respectivement), l'axe AHH (0.542 et 0.578 pour le cortisol et les AGNE respectivement) et le stress oxydant (0.539, 0.393 et 0.741 pour la Vitamines E, le NO et le MDA respectivement). Ainsi, par rapport aux animaux avant intervention chirurgicale (J-7), les animaux en J1, J3 et J5 se discriminent essentiellement par des niveaux d'inflammation élevés, des changements de comportement, et un niveau de stress oxydant très augmenté. Dans une moindre mesure ils se discriminent par un axe AHH plus sollicité et une baisse des performances d'ingestion. Enfin, deux semaines après l'intervention (J13), les animaux retrouvent l'essentiel de leurs paramètres de base mesurés avant opération, sauf pour le stress oxydant qui présente encore un niveau supérieur à celui mesuré en J-7, permettant ainsi de bien différencier les J-7 des J13. Les performances de la méthode ont été estimées. Elle présente une sensibilité allant de 60 à 100 % selon les jours d'observation, et une spécificité allant de 95 à 100%. Il est à remarquer que les performances de sensibilité les plus faibles sont observées entre J1 et J5, période où les animaux présentent tous de façon plus ou moins synchrone, des modifications importantes des axes inflammatoire, comportementaux et du stress oxydant.

Discussion

La pose de canules digestives chez la vache laitière en production nécessite une intervention chirurgicale lourde. Ce type d'intervention nécessite, en dehors des apports énergétiques et une antibiothérapie appropriée, une prise en charge de la douleur la plus

efficace possible. L'inflammation consécutive à la laparotomie ainsi que les distensions exercées sur les mésentères et le tractus digestif engendrent des douleurs importantes qui nécessitent une analgésie multimodale comme recommandée dans des douleurs de palier 2 ou 3. L'efficacité du protocole médicamenteux proposé dans cette expérimentation a été évaluée par le suivi de différents indicateurs caractéristiques des voies potentiellement impliquées dans l'évaluation de la douleur et par une approche intégrée d'évaluation multiparamétrique de la douleur selon la procédure proposée par Faure et al, (en révision).

Les modifications les plus importantes suite à la chirurgie sont relatives à la réaction inflammatoire. Malgré l'apport d'AINS aux animaux dès l'intervention chirurgicale, le taux d'haptoglobine ne cesse d'augmenter au cours de la première semaine post opératoire par rapport aux concentrations en pré-opératoire pour atteindre des valeurs de 0.5 mg/mL et 0.65 mg/mL à 3 et 5 jours postopératoires respectivement. Néanmoins ces taux sont inférieurs à ceux rapportés par Newby et al. (2014) qui avait administré 3 mg/kg PV de ketoprophen et qui montrent que trois et sept jours après la pose d'une seule canule (ruminale) les concentrations en haptoglobine sont multipliées par 7 pour atteindre 0.9 mg/mL. Il est possible que cette différence s'explique en partie par le type de molécule utilisée (la flunixin présentant une action potentielle sur les douleurs de type viscérale) et la posologie utilisée, Newby et al. ne réalisant que 2 injections (J0 et J1) alors que dans notre essai, 4 injections étaient réalisées. D'autres auteurs rapportent des valeurs encore beaucoup plus élevées en haptoglobine, les concentrations pouvant être multipliées par 100 lors de processus inflammatoire aigu (Cornner et al., 1998), ce qui est loin d'être le cas dans notre expérimentation. Il apparait donc que le traitement anti-inflammatoire utilisé dans notre étude a permis de limiter fortement le processus inflammatoire.

Le stress oxydant est impliqué dans de nombreuses pathologies douloureuses comme les métrites, l'acidose ou les maladies respiratoires (Celi, 2011). Par ailleurs, il est maintenant bien admis que les espèces réactives à l'oxygène (ROS) générées lors de lésion tissulaire (et à l'origine du stress oxydant), sont des molécules à potentiel "pronociceptif" (Salvemini et al., 2011). Un déséquilibre entre antioxydants/oxydants a été rapporté dans plusieurs situations de douleur générée par de l'inflammation (Salvemini et al., 2011). Dans notre étude, le niveau de stress oxydant mesuré par l'oxydation du glutathion et l'apparition de produits d'oxydation tel que le MDA, ou encore la perte d'antioxydants comme les vitamines A et E indiquent clairement qu'un stress oxydant marqué est présent chez les 5 vaches dès le 1^{er} jour post opératoire et perdure au-delà de la première semaine, certains indicateurs étant encore

impactés en J13. Plusieurs causes peuvent être évoquées. En dehors de la forte réaction inflammatoire, il est également possible que l'anesthésie en elle-même ait pu augmenter la production de radicaux libres comme le rapporte différentes études (Naziroglu and Gunay 1999; Gadek-Michalska *et al.* 2005). La faible modulation du NO est cependant assez surprenante, les radicaux libres étant les premiers impactés par l'inflammation. Il est possible que les AINS, connus pour diminuer l'activité de la NO synthase (NOS) (Chen et al., 1997) aient suffisamment modulés cette synthèse pour que l'on ne puisse observer de variations significatives au niveau systémique. Par contre, il est clair que la chirurgie a bien augmentée les processus oxydatifs, mais que ceux-ci ne peuvent être mis en évidence qu'avec des indicateurs plus intégratifs comme les réserves en antioxydants évalué par le glutathion ou les vitamines.

L'axe hypothalamo-hypophysaire n'a été que peu impacté par la chirurgie, le cortisol et les AGNE n'étant augmenté qu'en J1 mais non significativement. Il apparaît que le traitement médicamenteux, qui a limité l'inflammation, mais aussi l'utilisation de dérivés morphiniques qui sont considérés comme des analgésiques "centraux" (Chambers, 2012) ont dû fortement limiter la transmission du message nociceptif et donc la réponse de l'axe AHH.

Enfin, si l'on considère les indicateurs comportementaux, seul un indicateur parmi les 7 indicateurs suivis augmente significativement les premiers jours après la chirurgie : les attitudes anormales. Les autres indicateurs comportementaux semblent également indiquer la présence de douleur, principalement le premier jour après l'intervention chirurgicale, mais la grande variabilité entre individus n'a pas permis pas de mettre en évidence des modifications significatives. Il est cependant important de noter que ces variations comportementales restent modestes vraisemblablement en raison du choix de la flunixin comme AINS dans cette expérimentation. L'utilisation de dérivés morphiniques, qui possède des propriétés antalgiques au niveau des viscères (Heinrich et al 2010 ; Coetzee 2011 ; Lizarraga et Chambers 2012 ; Fitzpatrick et al 1998) mais aussi au niveau central comme nous venons de le voir avec la réponse de l'axe AHH, a dû fortement contribuer à la limitation des changements comportementaux. Ainsi, nous confirmons que l'approche multimodale de l'analgésie pour ce type d'intervention chirurgicale invasive est à préconiser comme cela a déjà été rapporté chez le cheval (Valverde, 2005) et chez le bovin pour des douleurs de palier 3 (Boreve, 2010).

Si l'on considère l'évolution des performances zootechniques de nos animaux, la production laitière et les quantités ingérées ont été faiblement impactées par la chirurgie, excepté le premier jour postopératoire, où celles-ci sont significativement diminuées. Les

animaux ont retrouvé leur niveau de performance préopératoire dès le 3^{ème} jour après la chirurgie. L'apport de composés énergétiques apparaît donc comme bien adapté pour ces animaux en production laitière, et ainsi capable de limiter au maximum la mobilisation des réserves comme en témoigne les niveaux d'AGNE circulants. Il est également possible que la prise en charge de la douleur post-opératoire avec les AINS ait limité la baisse de production laitière. En effet, Newby et al., (2014) montrent que l'injection d'un AINS tend à augmenter la production laitière comparé à des vaches sans AINS suite à une opération de pose de canule ruminale.

Ainsi, il apparaît clairement que nos animaux présentent des modulations relativement faibles des différentes voies potentiellement révélatrices de douleur, en raison d'un protocole analgésique et antalgique approprié. Cependant, il reste délicat d'avoir une vue intégrative de ces différentes modulations qui ne sont pas forcément synchrones, l'inflammation étant beaucoup plus tardive que les changements de comportement ou d'apparition de stress oxydatif par exemple. Aussi, nous avons souhaité évaluer le niveau de douleur en fonction des jours après opération par notre approche multiparamétrique développée chez les ovins (Faure et al., en révision). Ainsi, notre approche multiparamétrique a bien permis de discriminer les 5 jours d'observation avec d'excellentes performances. Cette approche a permis de discriminer les animaux selon leur état physiologique, métabolique et émotionnel. Nous avons ainsi en déduire qu'au cours des premiers jours post opératoire, les animaux se différenciaient des animaux non opérés principalement par 1) leur niveau d'inflammation (même si il était en partie bien maîtrisé par les AINS), 2) un niveau de stress oxydant fort avec une mobilisation importante des réserves antioxydantes (vitamines A et E, glutathion) 3) des comportements modifiés (postures antalgiques et attitude anormale) 4) une baisse de l'ingestion. Donc, même si, comme nous l'avons discuté précédemment, le traitement médicamenteux associant AINS et morphinique a fortement limité les modulations des indicateurs de chacune des voies impliquées dans la douleur, il apparaît que l'approche multiparamétrique différencie parfaitement les animaux avant et après intervention. De plus, nous avons pu identifier assez précisément les animaux en fonction du jour après intervention, ce qui démontre que les challenges auxquels sont soumises les vaches après la chirurgie évoluent au cours de la première semaine post opératoire. Ainsi il apparaît qu'au cours des premières heures, les animaux ont plus à gérer un challenge de "douleur" (plus de postures antalgiques, taux de cortisol plus élevé) alors qu'au cours des jours suivant le challenge était plus en relation avec la réaction inflammatoire et le stress oxydant. Ces données militeraient

pour une amélioration de l'analgésie immédiatement après l'opération, en particulier en utilisant les dérivés morphiniques de façon plus systématique. Par ailleurs, compte tenu que la réaction inflammatoire est déjà bien prise en charge par les AINS, il serait particulièrement intéressant de tester l'apport d'antioxydants en complément des AINS, d'autant que le déséquilibre antioxydant/oxydant persiste au-delà de la première semaine post opératoire. En effet, des études récentes mettent en évidence la valence antinociceptive des antioxydants, de par leur action directe sur les médiateurs de la réaction inflammatoire (cytokines en particulier) (Pinheiro et al., 2015). Chez des bufflonnes, il est possible de diminuer les effets délétères des dystocies (réduction du cortisol, des produits d'oxydations...) en supplémentant les animaux en vitamine E et sélénium (Sathaya et al., 2007).

En conclusion, l'approche multiparamétrique a permis avec une très grande fiabilité de suivre les animaux en période de récupération au cours des différentes journées de mesure, chaque journée d'observation se discriminant parfaitement des autres journées. Cette discrimination repose sur des indicateurs spécifiques de chacune des voies prospectées (zootechnie, métabolisme, physiologie, comportement). Il apparaît également que le traitement pharmacologique proposé dans cette étude limite de façon satisfaisante la réaction inflammatoire et la douleur associée mais que des améliorations restent encore envisageables comme l'apport de morphinique en tout début de période postopératoire et d'antioxydants avant et après intervention chirurgicale pour limiter le stress oxydant et diminuer la réaction inflammatoire. Il assure un retour à l'homéostasie très rapide avec des performances zootechniques récupérées dès la deuxième semaine post opératoire.

References

- Agarwal R., Chase S. D. 2002. Rapid fluorimetric-liquid chromatographic determination of MDA in biological samples. *Journal of Chromatography B*, 775, 121-126.
- Auboiron, S., Sparrow, DA, Beaubatie, L., Bauchart, D., 1990. Characterization and amino-terminal sequence of apolipoprotein AI from plasma high density lipoproteins in the preruminant calf, *Bos Spp.* *Biochememical Biophysical Research Communications* 166, 833-839.
- Boissy, A., and Bouissou, MF, 1994. Effects of androgen treatment on behavioural and physiological responses of heifers to fear-eliciting situations. *Hormones and Behaviour* 28, 66-83.
- Boreve guide, 2010. *Prise en charge de la douleur chez les bovins, Recommandations pour le vétérinaire*, 67p.
- Caray, D., A. de Boyer des Roches, S. Frouja, S. Andanson, and I. Veissier. 2015. Hot-iron disbudding: stress responses and behavior of 1- and 4-week-old calves receiving anti-inflammatory analgesia without or with sedation using xylazine. *Livestock Science*, 1-102.
- Celi P 2011. Biomarkers of oxidative stress in ruminant medicine. *Immunopharmacology and Immunotoxicology* 33, 233-240.
- Chen L, Salafranca MN and Mehta JL 1997. Cyclooxygenase inhibition decreases nitric oxide synthase activity in human platelets. *The American Physiological Society* 97, 0363-6135.
- Coetzee J.F., 2011. Review of pain assessment techniques and pharmacological approaches to pain relief after bovine castration: Practical implications for cattle production within the United States. *App. Anim. Behav. Sci.*, 135, 192-213.
- Conner J.G., Eckersall P.D., Wiseman A., Aitchison T.C., Douglas T.A. Bovine acute phase response following turpentine injection. *Res. Vet. Sci.*, 1988b, **44**, 82-88.
- Faure, M., V. Paulmier, A. Boissy, A.-S. Bage, C. Ravel, A. Guittard, A. De Boyer Des Roches, and D. Durand. 2014. Multiparametric approach to assess pain in sheep following an experimental surgery. Pages 117-117 in 6. *International Conference on the Assessment of Animal Welfare at Farm and Group Level (WAFL 2014)*. Academic Publishers, Clermont-Ferrand.
- Faure, M., V. Paulmier, A. Boissy, A. de la Foye, A. de Boyer des Roches, and D. Durand. in revision. A multiparametric approach to discriminate stress and pain experienced by sheep during experimental surgeries. *Animal*, in revision.
- Flourens, P. J. M. 1833. Expériences touchant l'action de l'émétique (tartre de potasse antimonié) sur les animaux ruminans. *Gazette Médicale de Paris*, tome I : 169–171.
- Fitzpatrick J.L., Young F.J., Eckersall D., Logue D.N., Knight C.J., Nolan A., 1998. Recognising and controlling pain and inflammation in mastitis. *Anim. Health*, p36-44.
- Gadek-Michalska A, Spyрка J and Bugajski J 2005. Psychosocial stress affects the involvement of prostaglandins and nitric oxide in the lipopolysaccharide-induced

- hypothalamic-pituitary-adrenal response. *Journal of Physiology and Pharmacology* 56, 287-298.
- Hatam L.J. and Kayden H.J. 1979. High-performance liquid-chromatographic method for the determination of tocopherol in plasma and cellular-elements of the blood. *Journal of lipid research*. 20(5), 639-645.
- Heinrich A., Duffield T.F., Lissemore K.D., and Millman S.T., 2010. The effect of meloxicam on behavior and pain sensitivity of dairy calves following cautery dehorning with a local anesthetic. *J. Dairy Sci.*, 93, 2450-2457.
- Huxley, J.N., Whay H.R. 2006. Current attitudes of cattle practitioners to pain and the use of analgesics in cattle. *Vet. Rec.* 159:662-668.
- Hewson CJ, Dohoo IR, Lemke KA, Barkema HW. 2007. Canadian veterinarians' use of analgesics in cattle, pigs, and horses in 2004–2005. *Can Vet J.*, 48, 155–164.
- Lizarraga I., and Chambers J.P., 2012. Use of analgesic drugs for pain management in sheep. *New Zealand Vet. J.*, 60, 87-94.
- Martin J., White H. 1991. Fluorimetric determination of oxidized and reduced glutathione in cells and tissues by high performance liquid chromatography following derivatization with dansyl chloride. *Journal of Chromatography*, 568, 219-225.
- Martin P and Bateson P 2013. *Measuring behaviour: an introductory guide*. Cambridge University Press.
- Naziroglu M and Gunay C 1999. The levels of some antioxidant vitamins, glutathione peroxidase and lipoperoxidase during the anaesthesia of dogs. *Cell Biochemistry and Function* 17, 207-212.
- Newby N.C., Turker C. B., Pearl D.L., LeBlanc S.J., Leslie K.E., Von Keyserling M.A.G., Duffield T.F. 2014. An investigation of the effects of ketoprofen following rumen fistulisation surgery in lactating dairy cows. *Can. Vet. J.*, 55, 442-448.
- Pinheiro, M.M.G , Miltojević, A.B , Radulović, N.S , Abdul-Wahab, I.R , Boylan, F , Fernandes, P.D. , 2015. Anti-Inflammatory activity of *Choisya ternate* Kunth Essential Oil, Ternanthranin, and its two Synthetic Analogs (Methyl and Propyl-N-Methy- lanthranilates). *PLoS One* 2510 (3), 0121063 .
- Roughan JV, Flecknell PA. 2001. Behavioural effects of laparotomy and analgesic effects of ketoprofen and carprofen in rats. *Pain*, 90:65–74.
- Sams, A. E., and S. L. Fubini. 1993. Primary repair of abomasal fistulae resulting from right paramedian abomasopexy in eight adult dairy cattle. *Vet. Surg.* 22:190-193.
- Salvemini D., Joshua W. Little, Timothy Doyle, William L. Neumann. 2011. Roles of reactive oxygen and nitrogen species in pain. *Free Radical Biology and Medicine* , 51, 951-966
- Scislowski, V., Bauchart, D., Gruffat, D., Laplaud, PM, Durand, D., 2005. Effects of dietary n-6 or n-3 polyunsaturated fatty acids protected or not against ruminal hydrogenation on

plasma lipids, and their susceptibility to peroxidation in fattening steers. *Journal of Animal Science* 82, 2162-2174.

Stafford K.J., Mellor D.J. 2005. Dehorning and disbudding distress and its alleviation in calves. *The Veterinary Journal*, 169, 337–349. Boreve guide, 2010. Prise en charge de la douleur chez les bovins, Recommandations pour le vétérinaire, 67p

Trinder, P., 1969. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Annals of Clinical Biochemistry* 6, 24.

Valverde A., 2005. Pain management in horses and farm animals. *J. Vet. Emerg. Crit. Care.*, 15, 295-307.

Tableau 1 : Description des comportements observés au cours des chirurgies de pose de canules

Behaviour Category	Behaviour description	Score	Composite score per behaviour category*	
Abnormal attitude	Vigilant	0	Min = 0	Max = 2
	Apathetic : cow does not respond to any stimulus of the environment	1		
	Head below withers	1		
Position of the ears	Ears forwards: both ears are positioned forward of the perpendicular. This is often also associated with the ear auricles facing forward	0	0	
	Ears plane: both ears are perpendicular to the head-rump axis. This is often also associated with the ear auricle facing down	1	1	
Eyelid position	Opened	0	0	
	Closed	1	1	
Facial expressions	bunching of muzzle	1	Min = 0	Max = 2
Standing postures (Molony et al, 2012)	plated tail	0	Min = 0	Max = 2
	Standing unsteadily, sometimes the body leaning leaning against a wall	1		
	Arched back. Standing still with the back arched	1		
Lying postures (Molony et al, 2012)	Sternal recumbency with the legs tucked in and the head down, either round to one side or directly in front or head up	0	0	
	Sternal recumbency with the hind limbs partially or fully extended, or with the lamb keeping the scrotal region off the ground	0.5	0.5	
	lateral recumbency with one shoulder on the ground, with extension of the hind limbs (Molony and Kent 1997)	1	1	
Postures of the legs	Normal posture of the legs	0	Min = 0	Max = 1
	Standing with leg held in suspension	1		
	Standing with the hindlegs stretched back (Robertson 1994)	1		
	Standing with crossed the forelimbs or hindlimbs	1		
Clinical signs	The sheep's eyes are sunken into their orbits	1	Min = 0	Max = 3
	Hair raised : the sheep's hairs are raised on the head	1		
	Panting : rapid breathing	1		
Abnormal activities	Grinding the teeth	1	Min = 0	Max = 3
	lack of rumination	1		
	Trampling	1		

Tableau 2: Valeur des corrélations des variables en fonction des axes discriminants retenus dans l'AFD.

Factor Discriminant Analysis	Axe 1	Axe 2
Proportion de la variance expliquée	90.16	5.75
Correlation de chacune des variables aux axes:		
Production laitière	0.023	0.712
MSI	0.472	0.421
Cortisol	-0.064	-0.542
AGNE	-0.044	-0.578
glucose	-0.392	-0.159
TNF	0.311	-0.104
Haptoglobine	-0.882	-0.064
Vitamine E	0.550	-0.539
Vitamine A	0.683	0.170
GSH/GSSG	0.803	-0.028
NO	-0.215	-0.393
MDA	-0.161	0.741
Attitude anormale	-0.616	0.130
Signes anormaux	0.013	-0.178
Signes cliniques	-0.057	-0.357
Postures antalgiques	-0.407	-0.042
Postures couchées	-0.163	-0.347
Postures anormales	-0.063	-0.268
Position des oreilles	-0.057	-0.360

Les valeurs en gras représentent les facteurs retenues comme les plus explicatifs

Table 3 : Justesse, sensibilité et spécificité de l'AFD après validation croisée.

de \ vers	D-7	D1	D3	D5	Q13	Justesse (%)	Sensibilité(%)	Spécificité(%)
D-7	5	0	0	0	0	100	100	100
D1	0	4	1	0	0	92	80	95
D3	0	1	3	1	0	88	60	95
D5	0	0	0	5	0	96	100	95
D13	0	0	0	0	5	100	100	100

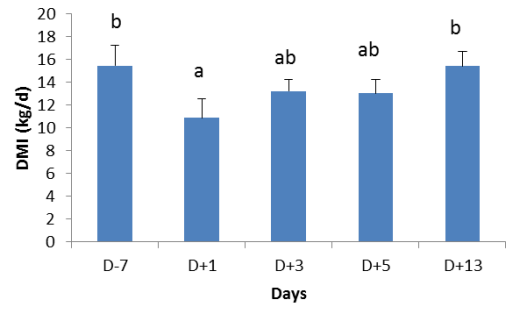
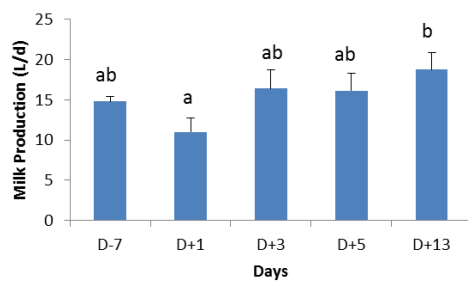


Figure 1 : Evolution de la production laitière (Milk production, L/d) et de la matière sèche ingérée (DMI, kg/d) chez 5 vaches Holstein primipares en lactation 7 jours avant (D-7) ou 1, 3, 5, 13 jours après (D+1, D+3, D+5, D+13) implantation de canules ruminale et duodénale par voie chirurgicale.

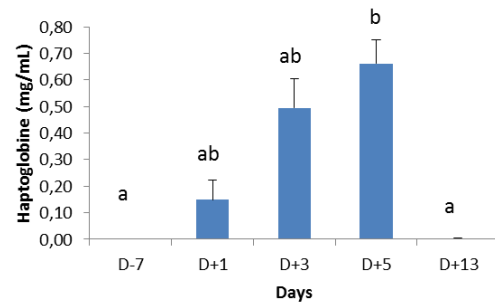
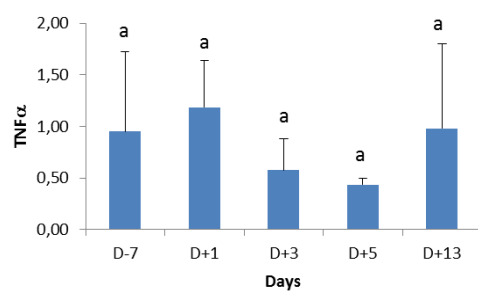


Figure 2 : Evolution du TNFα (pg/mL) et de l'haptoglobine (mg/dL) plasmatique chez 5 vaches Holstein primipares en lactation 7 jours avant (D-7) ou 1, 3, 5, 13 jours après (D+1, D+3, D+5, D+13) implantation de canules ruminale et duodénale par voie chirurgicale.

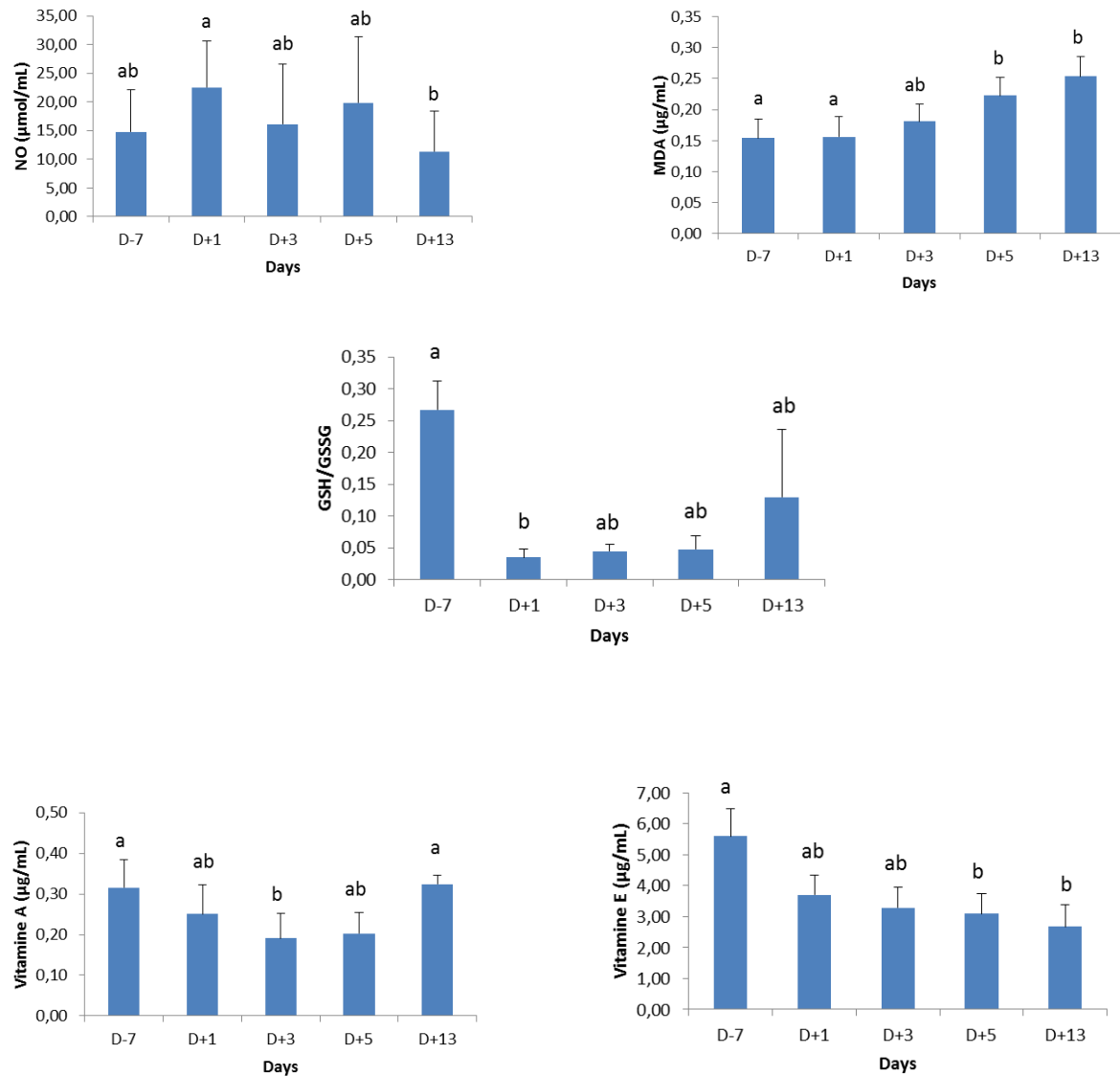


Figure 3 : Evolution de l'oxyde nitrique (NO, μmole/mL), du malondialdéhyde (MDA, μg/mL), du glutathion réduit sur oxydé (GSH/GSSG,), des vitamines A et E (μg/mL) chez 5 vaches Holstein primipares en lactation 7 jours avant (D-7) ou 1, 3, 5, 13 jours après (D+1, D+3, D+5, D+13) implantation de canules ruminale et duodénale par voie chirurgicale.

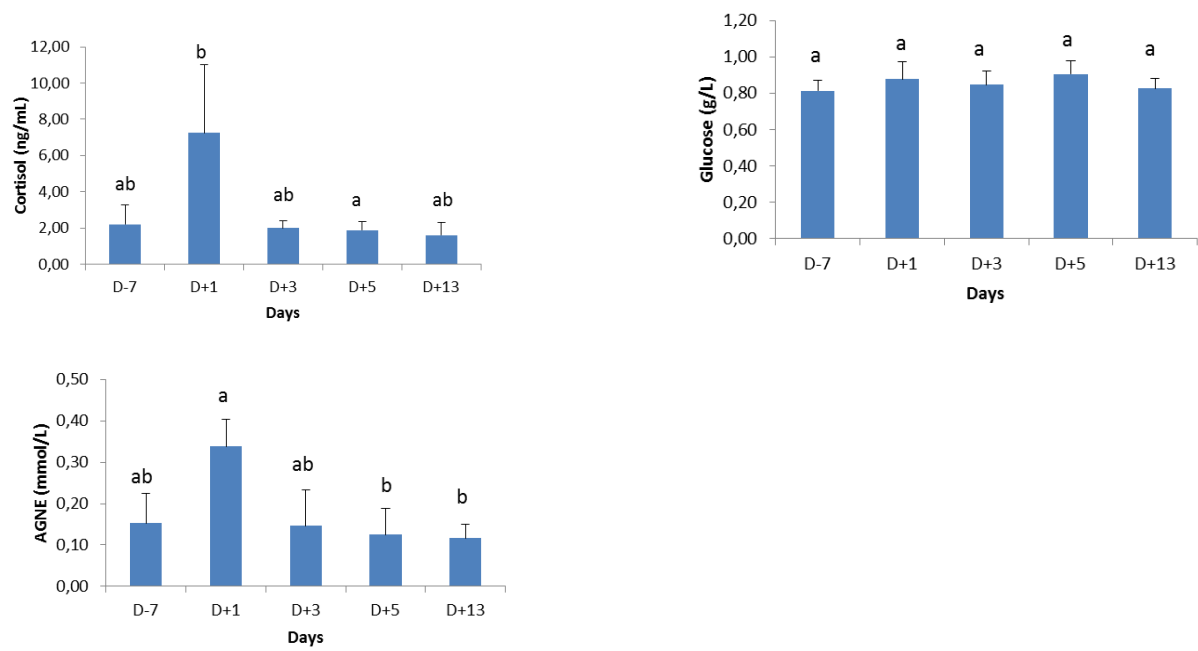


Figure 4 : Evolution plasmatique de la glycémie (g/L), des acides gras non estérifiés (AGNE) et de la cortisolémie (ng/mL) chez 5 vaches Holstein (3 ans $\pm$) en lactation 7 jours avant (D-7) ou 1, 3, 5, 13 jours après (D+1, D+3, D+5, D+13) implantation de canules ruminale et duodénale par voie chirurgicale.

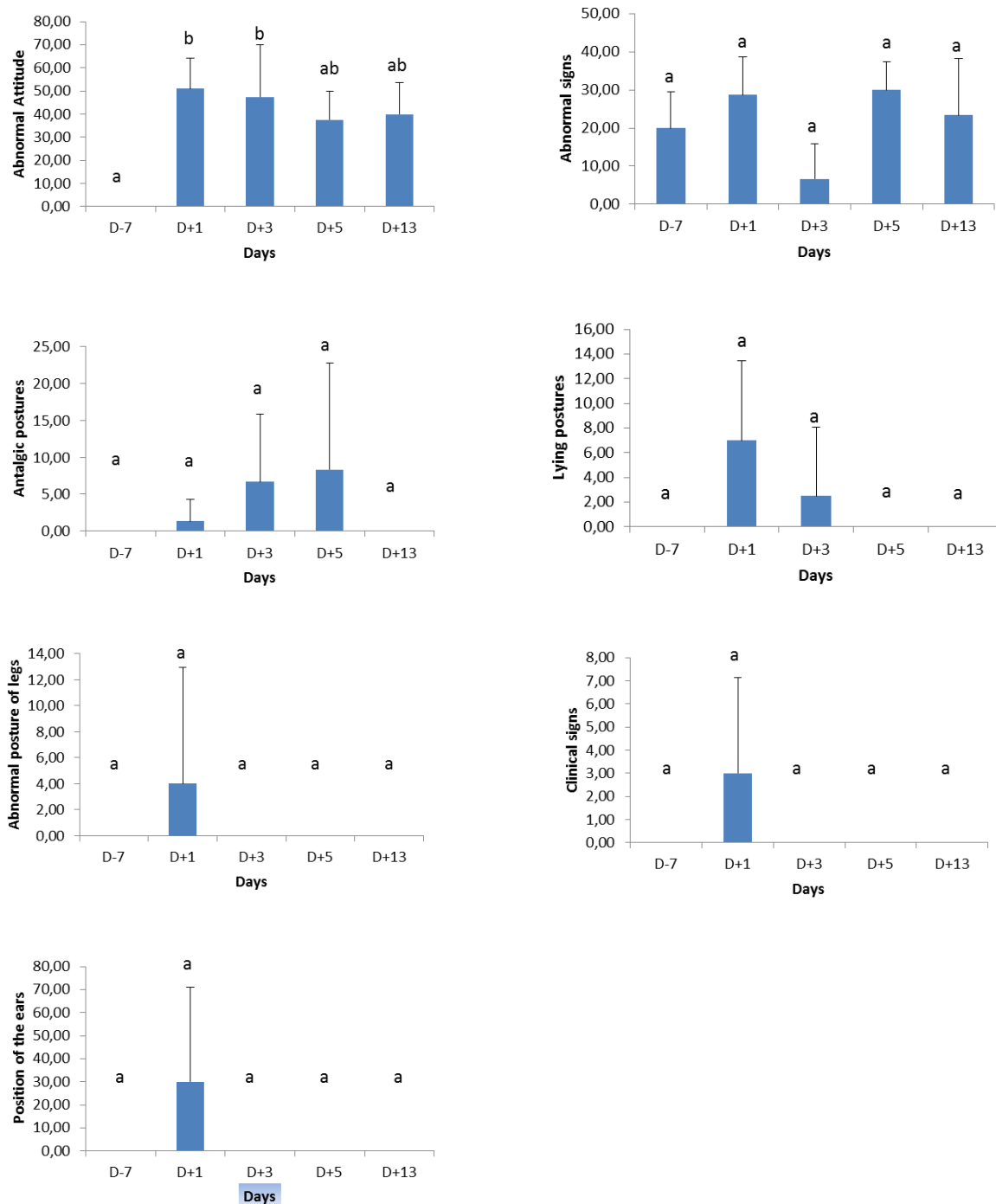


Figure 5 : Evolution de différents comportements exprimés chez 5 vaches Holstein primipares en lactation 7 jours avant (D-7) ou 1, 3, 5, 13 jours après (D+1, D+3, D+5, D+13) implantation de canules ruminale et duodénale par voie chirurgicale.

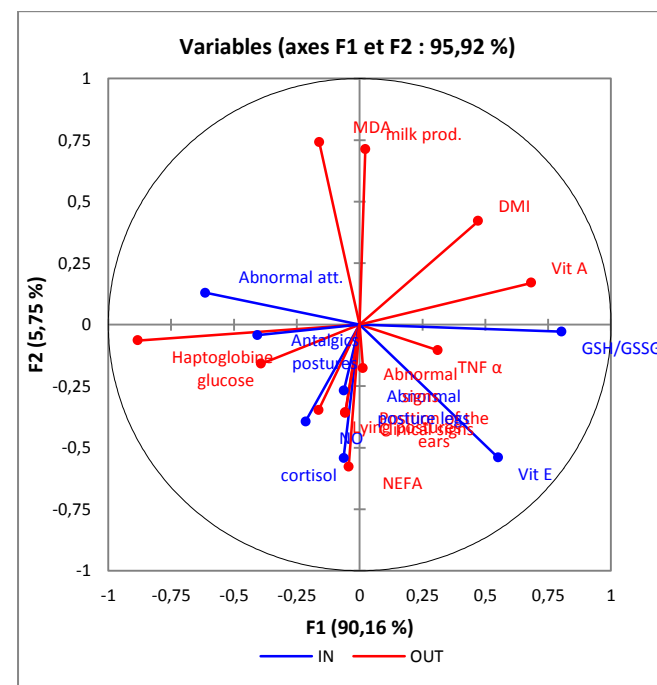
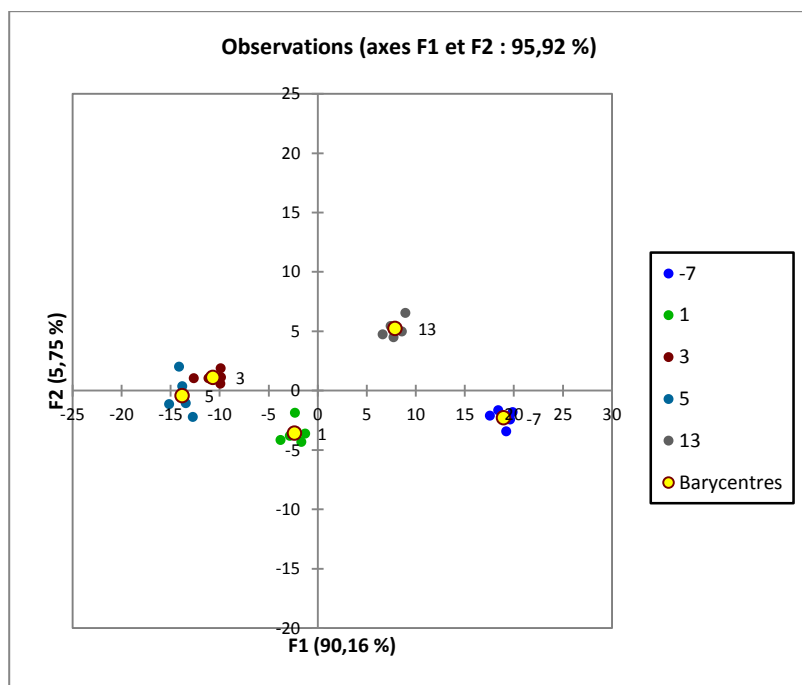


Figure 6 : Analyse Factorielle Discriminante réalisée chez des vaches Holstein en lactation (n=5) avant (J-7) et après (J1, J3, J5 et J13) pose de canules digestives.

Discussion générale

Introduction

La prise en charge de la douleur nécessite au préalable une évaluation de celle-ci afin de pouvoir la caractériser et si possible mesurer son intensité. Chez l'animal, la plupart des critères d'évaluation de la douleur correspondent à des modifications physiologiques ou comportementales, visant à supprimer la cause et/ou à diminuer les conséquences du stimulus nociceptif qui menace l'intégrité de l'individu (Le Neindre et *al.*, 2009). Aussi, il est habituel de retrouver le comportement comme "outil" le plus fréquemment utilisé pour identifier et localiser la douleur, aussi bien par le monde des scientifiques que par celui des vétérinaires praticiens (Le Neindre et *al.*, 2009). Cette voie comportementale englobe différents indicateurs comme les vocalisations, les modifications d'activités, de postures, d'expressions faciales, l'apathie, l'isolement ou le manque d'appétit. L'observation du comportement présente des atouts considérables car il est en général non invasif et assez sensible. L'utilisation de cette voie permet d'établir des échelles de douleur chez de nombreux mammifères notamment les espèces de compagnies comme le chien et chat et le cheval. Chez les ruminants les problèmes de boiteries ont fait l'objet de développement de différentes échelles incluant soit la modification de la locomotion seule soit associée à des pertes de production. Cependant, d'autres voies indicatrices de douleur sont de plus en plus associées à celle du comportement. En effet, dans la littérature les modulations de l'axe hypothalamo-hypophysaire sont souvent associées à celles du comportement, le cortisol étant l'indicateur le plus utilisé pour caractériser cette voie. D'autres axes ont également été abordés comme les performances zootechniques ou la réponse inflammatoire.

Néanmoins ces modulation des voies comportementales, physiologiques ou zootechniques sont également très souvent utilisées pour caractériser des niveaux de stress, d'anxiété ou d'inconfort qui n'impliquent pas nécessairement une composante nociceptive. Aussi il est très difficile d'identifier des critères qui soient des "évaluateurs" strictement spécifiques de la douleur (Le Neindre et *al.*, 2009). De plus ces indicateurs peuvent s'exprimer différemment entre espèces, ou selon le contexte dans lequel ils apparaissent. Par ailleurs, la perception des modifications de comportement est variable selon l'observateur considéré, éleveur ou vétérinaire, et diffère en fonction de leur connaissance du comportement pour l'espèce concernée et de leur propre perception de la douleur. Enfin, les réponses comportementales, physiologiques et zootechniques pour une même stimulation nociceptive varient au cours du temps et en fonction de l'individu lui-même, quelle que soit son espèce ou sa race. Elles peuvent être également modifiées par des états physiologiques particuliers, comme la

gestation et la mise bas (Le Neindre et *al.*, 2009). De plus, toutes ces réponses peuvent être modulées par des mécanismes d'analgésie endogène qui se mettent en place en réponse à la douleur elle-même (Le Bars et Willer, 2004). Aussi, le challenge d'une évaluation fiable et performante de la douleur chez les animaux, reste complexe.

Dans la littérature, l'évaluation de la douleur au cours de situation d'élevage est peu investiguée, mis à part lors de l'écornage ou de la castration dans le but d'évaluer l'efficacité de différents protocoles antalgiques. Dans le cadre de douleurs induites lors d'expérimentation animale, à notre connaissance, seuls les travaux de Newby et *al.*, (2014) (canulation ruminale chez la vache laitière), de Mølgaard et *al.*, (2012) (biopsies du foie chez des vaches laitières) ou de Mialon et *al.*, (2012) (trocavage ruminal) ont été rapportés. Ce manque d'investigation chez les ruminants est très dommageable, aussi bien pour l'animal de rente lui-même que pour les éleveurs, les vétérinaires mais aussi pour le citoyen de plus en plus soucieux du bien-être animal.

Face au manque de recherches consacrées à cette problématique, l'INRA, par le biais du Département Phase, et VetAgro Sup ont souhaité mettre en place et soutenir financièrement une recherche visant à proposer une démarche d'évaluation de la douleur la plus fiable possible chez le Ruminant. Dans ce cadre de recherche, le travail qui m'a été confié consistait à (i) identifier toutes les voies potentiellement impliquées dans la douleur (ii) identifier les indicateurs les plus pertinents de chacune des voies identifiées à l'étape précédente (iii) proposer une approche d'évaluation des différents types de douleur rencontrés chez le ruminant en évaluant ses performances.

Pour mener à bien cette recherche, nous avons choisi dans un premier temps d'effectuer une étude bibliographique la plus large possible pour identifier les voies et les indicateurs les plus pertinents. Nous nous sommes largement appuyés sur les travaux conduits en médecine humaine et vétérinaire rapportés dans la littérature, mais nous avons également souhaité bénéficier de l'opportunité d'avoir à proximité de notre Centre de Recherche une des équipes les plus en pointe sur ce sujet chez l'Homme (Unité Inserm "Neurodol", Directeur : Professeur A Eschallier, CHU de Clermont-Ferrand). Dans un second temps, pour tester les performances des voies et indicateurs sélectionnés précédemment, nous avons conduit 4 expérimentations sur des bovins ou ovins soumis à des situations douloureuses.

Les résultats détaillés de ces essais sont largement rapportés dans les 5 publications consignées dans ce mémoire. Cependant il nous est apparu important, suite à ce travail de

thèse, de revenir plus spécifiquement sur la stratégie globale qui a été choisie et qui a guidé notre recherche tout au long de ces 3 années afin d'en évaluer de façon générale son impact sur nos résultats. C'est ce que nous nous proposons de faire au cours de cette discussion générale en abordant notamment le **choix des modèles de douleur** sélectionnés pour notre travail, le **choix des modèles animaux** mais aussi la **pertinence globale des voies et indicateurs retenus**.

Chapitre 1 : Intérêts et limites des modèles choisis

▪ Choix des modèles de douleur

Comme nous l'avions bien défini suite à notre étude bibliographique (article 1), les différents types de douleur auxquels les animaux de rente sont soumis sont soit par **excès de nociception** soit **neuropathiques**. Dans le cadre de mon travail de thèse, nous avons ciblé préférentiellement les douleurs par excès de nociception, ceci pour plusieurs raisons. Les douleurs par excès de nociception sont de loin les plus courantes chez les animaux d'élevage ou expérimentaux. De plus, chez les ruminants les douleurs neuropathiques restent encore très peu décrites en élevage et sont souvent associées à des douleurs par excès de nociception ce qui aurait compliqué fortement l'interprétation de nos résultats. Enfin, si l'on se réfère aux études faites chez les autres mammifères, les douleurs neuropathiques induisent très souvent des douleurs qui deviennent chroniques ce qui aurait nécessité un suivi sur plusieurs mois, compliquant fortement le déroulé de la thèse. Par ailleurs, les situations d'élevage ou expérimentales qui auraient pu générer des douleurs neuropathiques n'étaient absolument pas maîtrisées dans l'Unité et nécessitaient donc un développement méthodologique préalable. Nous nous sommes donc concentrés sur des douleurs par **excès de nociception**.

Les douleurs par excès de nociception peuvent être d'origine **viscérale** ou **somatique** selon la zone affectée. Très clairement, les modèles animaux permettant d'étudier des douleurs d'origine exclusivement viscérale n'existent pas chez le ruminant, sauf le modèle développé chez le mouton par Kania et *al.*, (2006) qui consistait à induire une distension duodénale pendant 5 min. Ce modèle bien que douloureux, génère une douleur très fugace allant de quelques minutes à quelques heures, ne nous permettant pas de tester toutes les voies de l'approche multiparamétrique, en particulier la réponse inflammatoire. Nous avons donc retenu, de façon plus ou moins opportuniste (en fonction des expérimentations mises en place par des collègues dans le cadre de projets de recherche) différentes situations qui présentaient

soit des douleurs de type somatique exclusif (mammite, pose de canule ruminale) soit des douleurs mixtes qui étaient d'origine somatique et viscérale (castration, pose de canules duodénale et iléale).

La limite de nos modèles réside donc plus sur le champ de douleur testé, les douleurs purement viscérales et neurologiques n'ayant pas été abordées. Cependant, nos modèles nous ont permis de couvrir la grande majorité des douleurs rencontrées en élevage et en expérimentation chez le ruminant.

▪ Variation de l'intensité douloureuse

La difficulté dans ces travaux a été d'induire expérimentalement des douleurs tout en respectant l'éthique animale. L'intensité de la douleur a surtout été modulée pour les expérimentations chez l'ovin par (i) l'invasivité de la chirurgie (canule rumen vs canule au niveau du rumen, duodénum et iléon) les animaux recevant le même protocole médicamenteux quel que soit la chirurgie pratiquée (ii) le protocole médicamenteux administré (absence d'anesthésie et d'analgésie vs anesthésie seule vs anesthésie locale avec analgésie), ceci pour un même type d'intervention, en l'occurrence la castration. Selon nos connaissances établies à partir de la littérature et de nos pratiques, les niveaux et le type de douleur s'orientaient vers (i) une douleur de type viscérale et somatique chez les moutons recevant les canules intestinales vs une douleur de type exclusivement somatique chez les animaux ne recevant que la canule ruminale (ii) une gradation du niveau de douleur et du moment du ressenti de celle-ci, les ovins castrés sans anesthésie ni analgésie devant ressentir une douleur dans les premières heures suivant la castration alors que les ovins castrés avec une anesthésie locale devraient ressentir cette même douleur mais en différé (après l'arrêt d'action de l'anesthésie locale). Concernant l'expérimentation sur les mammites chez les bovins, les phases de douleur ont été établies à partir des connaissances sur l'évolution des processus infectieux et inflammatoires (très bien maîtrisé par nos collègues vétérinaires de Toulouse) reflétant la sévérité d'une mammite en particulier, l'état d'avancement de l'infection (concentration en E. Coli dans le lait) et de l'inflammation (concentration en cellule somatique dans le lait). Enfin dans l'expérimentation sur les canules digestives chez la vache, l'objectif était autre, nous souhaitions dans ce cas précis tester l'efficacité d'une analgésie multimodale sur le niveau de douleur des animaux en période post opératoire, niveau que nous ne maîtrisions pas mais que l'on cherchait à établir.

La limite de ces schémas expérimentaux dont l'objectif était de discriminer des animaux selon des niveaux et/ou des types de douleur est le recours aux molécules anesthésiques et/ou analgésiques en tant que facteur de modulation, ces molécules pouvant interférer sur les voies investiguées de par leur mode d'action masquant ainsi l'expression de certains indicateurs comme par exemple les morphiniques et les indicateurs du comportement. Néanmoins, d'un point de vue éthique, il n'était pas recevable d'induire des douleurs chez l'animal sans les limiter.

▪ Choix de l'espèce cible

Nous avons le choix entre trois espèces de ruminant, le bovin, l'ovin et le caprin. Nous avons retenu 2 espèces, le bovin et l'ovin pour plusieurs raisons. Nous voulions tester notre approche sur des ruminants de différents gabarits, et surtout représentatifs de la majorité des ruminants d'élevage. En effet, en 2016 la France compte 19.5 millions de bovins, en 2015 le cheptel ovin français s'établit à 7 millions de têtes et seulement 1.2 millions de caprins (site Agreste conjoncture). De plus, le comportement de l'espèce caprine est très spécifique à cette espèce et n'aurait pu être représentatif des autres ruminants de petite taille. Concernant l'âge de nos animaux modèles, nous avons choisi de travailler uniquement avec des animaux adultes, la différence de perception de la douleur entre un jeune et un adulte n'étant aujourd'hui pas encore très claire. La perception de la douleur chez les nouveaux nés mammifères est présente, néanmoins il semble que les seuils de réponses varient d'un âge à un autre. Johnson (2009) montre une différence de réponse de la fréquence cardiaque à une castration chez des ovins âgés de 3h (augmentation de 2%) par rapport à des ovins âgés de 36 jours (augmentation de 33%). De la même façon Robertson (1994) montre que la castration avec la pince burdizzo est moins douloureuse chez les jeunes veaux par rapport aux animaux plus vieux. C'est pourquoi, afin de limiter le nombre de situations à tester nous avons choisi de travailler uniquement sur des animaux adultes pour l'ensemble de nos expérimentations.

Ce choix nous a permis de conduire quatre expérimentations, deux sur chacune des espèces cibles (bovin et ovin), permettant ainsi de s'appuyer sur un dispositif assez équilibré et de pouvoir comparer notre approche entre espèce et entre type de douleur (somatique vs somatique = viscérale).

Tableau 8 : Pertinence des différentes voies selon l'espèce, le type de douleur et le niveau de douleur supposé d'après les articles N°3, 4, 5 et 6.

Espèce	Type de douleur	Traitements et/ou Période / Jour		Voies explorées					
				Comportement	Inflammation	HHA	SNA	Stress oxydant	Zootecnie
OVIN	somatique + viscérale (<i>castration</i>)	0 - 2h	B + A + AINS	0	+	0			
			B + A	0	+	+	ns	ns	⊖
			B	++	+	++			
		3 - 36h	B + A + AINS	0	+	0			
			B + A	++	0	++	ns	ns	⊖
			B	0	0	0			
		36 - 78 h	B + A + AINS		0	0		0	
			B + A	ns	++	+	ns	+	⊖
			B		0	0		0	
BOVIN	somatique (+ viscérale, RDI) (<i>canules</i>)	T		0	0	0	0	0	
		S		+	+	+	+	++	
		R		++	++	++	+	++	⊖
		RDI		++	++	++	+	++	
	somatique (<i>mammite</i>)	P0 (-42 ; 0 h)		0	0	0			
		P1 (0 ; +8 h))		++	0	0			
		P2 (+12 ; +24h))		+	++	++	⊖	ns	⊖
		P3 (+32 ; +80 h)		0	++	0			
	somatique + viscérale (<i>canules</i>)	J1		++	++	+		++	
		J3		++	++	+		++	++
		J5		++	++	+	⊖	++	
		J13		0	0	0		0	0

⊖ : voie non mesurée

0 : voie non explicative

+

++ : Corrélation d'un moins un indicateur de la voie comprise entre [0.5 – 1 [sur l'axe 1 ou l'axe 2

Chapitre 2 : L'approche multiparamétrique est-elle pertinente ?

▪ Une approche multiparamétrique à 5 voies : trop ou pas assez?

Malgré les différentes situations d'expérimentation et d'élevage testées, ceci chez le bovin et chez l'ovin, nous avons réussi, à discriminer grâce à l'approche multiparamétrique différentes situations plus ou moins douloureuses avec des performances très acceptables. Néanmoins il est légitime à posteriori d'évaluer la pertinence des différentes voies dans ces discriminations de façon à ne retenir que les voies les plus indispensables dans un souci de simplification ultérieure de notre approche.

Le pouvoir explicatif des différentes voies que nous avons introduites dans notre approche multiparamétrique, en fonction de l'espèce considérée (ovin *vs* bovin) et du type de douleur étudié (somatique *vs* viscérale et somatique) est rapporté dans le tableau 8. Cependant, toutes les combinaisons possibles entre espèces et type de douleur n'ont pu être testées, aussi notre analyse reste perfectible. Quoiqu'il en soit, de grandes tendances se dégagent et sont très souvent conformes à la bibliographie.

Ainsi, le **comportement**, qui a été apprécié dans toutes nos situations expérimentales, permet de discriminer beaucoup de situations supposées douloureuses de celles non douloureuses. Par exemple, le comportement discrimine le lot d'ovins castrés sans analgésie ni anesthésie dans les deux heures qui suivent la castration par rapport aux autres lots mais également les différentes phases pré-clinique et cliniques dans le développement d'une mammite (Tableau 8). Malgré le fait que nos deux espèces cibles soient des espèces proies, la panoplie d'indicateurs mis en place a été suffisamment pertinente pour arriver à ce résultat, nous discuterons dans le chapitre suivant de l'intérêt des différents indicateurs en fonction des situations investiguées. Cependant, il apparaît que les modifications de comportement soient plus ou moins discriminantes en fonction du stade d'observation. En effet, les modifications de comportement sont plus visibles dans les stades précoces de l'installation de la douleur, comme dans les 2 premières heures après castration ou lors de la phase sub-clinique lors d'une mammite, ces modifications disparaissant plus tard alors que les processus inflammatoires sont encore très marqués. En effet, dans les huit premières heures qui suivent une mammite, les bovins modifient leurs attitudes générales et passent plus de temps debout. De la même façon, les ovins castrés sans analgésie ni anesthésie ont davantage de comportements et/ou activité anormales dans les deux heures qui suivent la castration.

Une autre voie apparaît comme déterminante dans la discrimination des différentes situations douloureuses, c'est la voie relative aux **processus inflammatoires** car elle permet de discriminer chaque groupe ou période supposés douloureux (Tableau 8). Encore une fois, cette voie a également été largement décrite dans la littérature comme étant très liée à l'apparition de douleur. Nous avons pu tester cette voie, comme pour le comportement, dans toutes nos situations expérimentales. Il apparaît que les processus inflammatoires soient encore un peu plus discriminants que le comportement, au vue des situations testées, mais il est également important de prendre en compte les modèles de douleur que nous avons choisis, tous entraînant une forte réaction inflammatoire. Il est important de noter ici que malgré l'utilisation d'anti-inflammatoire, comme dans le cas de la pose de canules digestives, cette voie reste discriminante, les AINS ne modulant pas complètement les processus inflammatoires. Nous pouvons également remarquer, que cette voie de l'inflammation "s'allume" un peu plus tardivement que celle du comportement mais reste discriminante plus longtemps. Cette caractéristique peut en partie résulter des marqueurs que nous avons choisis, les protéines précoces de l'inflammation étant augmentées significativement qu'après quelques heures post traumatisme, les cytokines auraient été dans notre cas plus révélatrices des phases précoces. Par contre, nous n'avons pas pu tester de situations douloureuses qui ne seraient pas associées à des réactions inflammatoires marquées, comme par exemple des atteintes des voies digestives (coliques, retournement de caillette...). Dans ces situations, pourtant fréquentes en élevage, les autres voies de notre approche multiparamétrique seraient certainement indispensables pour détecter et évaluer les douleurs générées.

Concernant la voie de l'**axe hypothalamo-hypophysaire** que nous avons également pu tester dans nos 4 situations douloureuses, elle apparaît comme également discriminante et ceci pratiquement au même niveau de pertinence que les 2 autres voies abordées précédemment. Ainsi, elle est discriminante suite à des douleurs de type somatique (pose de canules ruminales, mammite) que ce soit chez l'ovin ou chez le bovin. Il semble donc qu'il n'y ait pas de spécificité d'espèce. Ces résultats semblent cohérents avec la littérature où certains auteurs montrent des augmentations de cette voie suite aux mêmes types de douleurs somatiques telles que des castrations chez le veau et l'agneau (Robertson et *al.*, 1994 ; Mellema et *al.*, 2006) ou durant une mammite chez vache laitière (Hopster et *al.*, 1998). En revanche, concernant les douleurs mixtes induites par des chirurgies digestives (somatique et viscérale) cette voie apparaît comme plus discriminante chez l'ovin que chez le bovin. Il est possible que cette différence entre espèces provienne du protocole médicamenteux mis en place au

cours de ces deux expérimentations : les bovins avaient reçu de la kétamine et du butorphanol alors que le protocole médicamenteux adopté chez les ovins ne comprenait pas ces molécules mais des anti-inflammatoires non stéroïdiens. En effet, les opioïdes, de par leur action au niveau spinal et supra spinal vont moduler le message nociceptif (Lizarraga et Chambers, 2012) et donc potentiellement diminuer la réponse de l'axe hypothalamo-hypophysaire surrénalien. Cependant, cette voie est sujette à discussion, les nombreuses études rapportées dans la littérature montrant bien sa forte modulation par des situations de stress fréquemment rencontrées en élevage tels que le transport ou les changements de parc des animaux, ces stress n'étant pas forcément associés à de la douleur (Mormede et *al.*, 2007). Aussi, il apparaît que cette voie, même si elle permet de discriminer différentes situations douloureuses ne peut se suffire en elle-même et doit être systématiquement combinée avec d'autres voies comme nous l'avons fait tout au cours de ce travail.

La voie du **système nerveux autonome** (SNA) n'a pas été abordée chez le bovin limitant ainsi la portée de nos conclusions. Néanmoins, chez l'ovin, quelle que soit la situation douloureuse testée, elle n'est pas la voie la plus discriminante dans le cadre des situations étudiées au cours de notre travail de thèse (tableau 8). Il est possible que ces mesures, qui traduisent l'équilibre entre le système sympathique et le système parasympathique, soient plus fugaces que nos autres mesures, les pas de temps que nous avons adoptés (plusieurs heures) risquant de "lisser" les variations. Il serait important de reconsidérer nos mesures en observant plus finement (sur des pas de temps de l'ordre de l'heure, voire de la minute) ces indicateurs qui sont rapportés comme très sensibles aux processus douloureux dans la littérature. Par ailleurs, comme indiqué précédemment pour la voie HHA, le système nerveux autonome est également fortement modulé par des situations de stress sans forcément apparition de douleur (Jiankang et Akitane, 1999), et donc comme pour la voie HHA, le SNA ne peut certainement pas être utilisé comme seul "évaluateur" de la douleur.

La voie du **stress oxydant** est une voie très nouvelle dans cette approche d'évaluation de situation potentiellement douloureuse, bien qu'elle soit de plus en plus utilisée dans de nombreuses situations douloureuses, les antioxydants (ou les espèces réactives de l'oxygène) se révélant comme des modulateurs de la nociception (via leur actions sur les processus inflammatoires) (Vaculin et *al.*, 2010 ; Salvemini et *al.*, 2011 ; Moreira et *al.*, 2016). Cette voie apparaît comme discriminante, principalement dans des douleurs de type mixte, mais selon l'indicateur utilisé cette discrimination est plus ou moins tardive par rapport à

l'évènement déclencheur. Par exemple, chez le bovin, suite à la pose de canules digestives, les radicaux libres comme le NO et les antioxydants endogènes comme le rapport GSH/GSSG s'avèrent être des indicateurs assez précoces (variation significative dès J1) alors que les antioxydants exogènes comme les vitamines A et E et le Malondihaldéhyde (MDA) semblent plus tardifs (augmentation plus importante en J3, J5 et J13). Cette voie présente l'intérêt d'être fortement corrélée à plusieurs modifications relatives à la douleur comme l'inflammation. Pinheiro (2015) montre que les antioxydants ont un effet analgésique qui pourrait être relié à leur action inhibitrice sur les agents inflammatoires. En effet, comme nous l'avons déjà rapporté dans notre revue bibliographique et au cours des articles scientifiques produits dans ce travail, l'équilibre antioxydants/pro-oxydants est largement bouleversé dans de nombreuses situations générant de la douleur comme par exemple au cours de vêlage et/ou de vêlage dystocique (Nakao et Grunert, 1990 ; Politis et *al.*, 1996 ; Goff et *al.*, 2002), ce qui en fait un bon marqueur indirect de situations d'élevage où les animaux subissent des lésions tissulaires. Par contre, ce qui apparaît comme assez nouveau actuellement, c'est le rôle qui semble être attribué aux antioxydants, l'action antinociceptive de ceux-ci ouvrant de nouvelles voies thérapeutiques chez l'Homme (Vaculin et *al.*, 2010). Ainsi, dans la poursuite de nos investigations, la voie du stress oxydant sera peut-être à reconsidérer, non seulement comme marqueur du déséquilibre engendré par des situations potentiellement douloureuses, mais aussi comme modulateur potentiel de la douleur réellement perçue par l'animal.

Quant à la dernière voie que nous avons abordée, celle des **performances zootechniques**, une seule expérimentation, concernant la pose de canules digestives chez le bovin, a été conduite avec enregistrements de ces performances. Cette voie n'a pas été la plus discriminante sur l'ensemble de la période. Les indicateurs mesurés étaient la production laitière qui diminue mais non significativement en J1 et la matière sèche ingérées (MSI) qui diminue elle aussi en J1 de façon significative. Ainsi on ne peut donc pas attribuer cette baisse de production laitière à la présence potentielle d'une douleur vu que la MSI diminue. Notre plan expérimental portant soit sur des animaux non producteurs soit sur des animaux qui étaient restreints en post-opératoire, nous ne pouvons conclure sur la pertinence de cette voie qui est pourtant largement évoquée dans la littérature.

En résumé, avec notre plan expérimental, malgré le fait que toutes les combinaisons entre espèces et types de douleur n'aient pas été abordées, il ressort que conformément à la littérature, les voies liées au comportement et à l'inflammation sont les plus discriminantes de

situations douloureuses. La voie du comportement semble plus spécifique des stades post traumatiques précoces alors que l'inflammation discrimine mieux lorsqu'on la considère plus tardivement par rapport au traumatisme. Ces différences de performances dans le temps entre les 2 voies peuvent s'expliquer en partie par le choix des indicateurs que nous avons fait, nous reviendrons sur cette notion dans la suite de notre discussion. L'axe HHA apparaît également comme performant pour repérer des animaux "douloureux", mais il est en partie influencé par nos conditions expérimentales où les restrictions alimentaires imposées aux animaux lors des interventions chirurgicales (pose de canule en particulier) modifient fortement certains indicateurs sélectionnés pour caractériser cette voie notamment les indicateurs métaboliques de cette voie : glucose et AGNE). Néanmoins dans cette voie l'utilisation du cortisol reste l'indicateur de référence et contribue à lui seul à expliquer les bonnes performances de discrimination de cet axe... Cependant comme d'autres indicateurs il n'est pas spécifique de la douleur et peut augmenter fortement dans des situations de stress métabolique, physique ou émotionnel. Enfin, le stress oxydant apparaît comme très discriminant des différentes situations douloureuses investiguées et très synchronisé avec les processus inflammatoires, ce qui correspond complètement à ce qui est rapporté dans la bibliographie. Cependant, cette voie n'est pas discriminante dans le cas des essais réalisés chez la vache laitière après induction d'une mammite, alors que l'inflammation est présente, cette absence de réponse résultant probablement du nombre d'indicateurs utilisé dans cette étude, seule le rapport GSH/GSSG étant mesuré.

Si l'on considère la pertinence de chacune des voies investiguées dans notre travail, il apparaît clairement que chacune d'elle prise individuellement ne permet pas de couvrir l'ensemble des situations étudiées, des combinaisons plus ou moins complexes se dégageant en fonction du type de douleur et du moment de son évaluation. Pour pouvoir réellement statuer sur le nombre de voies "optimal" à considérer dans l'évaluation de la douleur chez les animaux de rente, il sera nécessaire de conduire d'autres études qui devront couvrir un champ beaucoup plus large de situations génératrices de douleur (comme les douleurs neuropathiques par exemple).

Tableau 9 : Pertinence des différents indicateurs au sein de la voie **comportementale** d'après les articles N°3, 4, 5 et 6.

Espèce	Type de douleur	Traitements et/ou Période / Jour		Attitude générale	Position des oreilles	Position des paupières	Expression faciale	Postures antalgiques et/ou debout couché	Position anormale des membres	Signes cliniques	Comportement alimentaire anormal	% temps passé debout	Comportement et/ou activités anormales
OVIN	somatique + viscérale (castration)	0 - 2h	B + A +AINS	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	⊖	⊖	+
			B + A										0
			B										++
		3 - 36h	B + A +AINS	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	⊖	⊖	0
			B + A										++
			B										+
		36 - 78 h	B + A +AINS	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	⊖	⊖	0
			B + A										++
			B										0
BOVIN	somatique (+ viscérale, RDI) (canules)	T		0	⊖	⊖	⊖	0	ns	0	0	⊖	0
		S		0				0		(+)	(+)		0
		R		0				0		+	+		0
		RDI		++				++		++	++		++
	somatique (mammite)	P0 (-42 ; 0 h)		0	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0	ns
		P1 (0 ; +8 h))		++								++	
		P2 (+12 ; +24h))		++								0	
		P3 (+32 ; +80 h)		+								+	
	somatique + viscérale (canules)	J1		++	ns	ns	ns	ns	ns	ns	⊖	⊖	ns
		J3		++									
		J5		+									
		J13		+									

⊖ : Indicateur non mesuré

0 : Indicateur non explicatif

+

++ : Indicateur explicatif (indicateur varie significativement ($P \leq 0.05$) par rapport à la référence (lot ou période sans douleur))

▪ Nombre d'indicateurs par voie

Après avoir discuté de l'intérêt des différentes voies dans la discrimination de situations douloureuses, nous pouvons nous poser le même type de question concernant l'intérêt des différents indicateurs utilisés pour caractériser chacune de ces voies.

Les **indicateurs comportementaux** évalués étaient suffisamment nombreux pour que leur analyse soit représentative des différentes approches habituellement rapportées chez les animaux de rente ou domestique. Ces indicateurs sont regroupés au sein de grands items comportementaux tels que : l'attitude générale, les expressions faciales, la position des oreilles et des paupières, les postures antalgiques, la position des membres, les signes cliniques, le comportement alimentaire, le temps passé debout et les comportements ou activités anormales (Tableau 9). Les indicateurs les plus discriminants, quels que soient l'espèce ou le type de douleur, relèvent de l'attitude générale et du comportement et/ou activités anormales. Ces 2 indicateurs sont assez intégratifs et sont facilement accessibles pour l'évaluateur. Concernant l'attitude générale, cet indicateur permet de mesurer la vigilance ou à l'inverse l'état apathique d'un animal. Cet indicateur a permis de discriminer les ovins ayant subi l'opération de pose de canules digestives la plus invasive ainsi que les vaches durant la phase pré-clinique et la phase d'état durant la mammite. Les vaches ayant subi la pose des canules digestives sont également plus apathiques dès le 1^{er} jour post-opératoire et jusqu'au 3^{ème} jour, néanmoins dans cette expérimentation l'administration de dérivés morphiniques a certainement modulé cet indicateur, les dérivés morphiniques étant connu pour modifier le comportement des animaux. Concernant les comportements et/ou activités anormales, cet item comprend l'absence de rumination, les grincements de dents, les tremblements, les vocalisations et les stéréotypies. Dans les situations expérimentales étudiées, cet indicateur paraît être plus discriminant chez l'ovin que chez le bovin car les ovins castrés sans anesthésie ni analgésie et les ovins opérés pour la pose de canules ruminales et intestinales présentaient significativement plus d'activités anormales que les autres lots. Il apparaît également que les postures antalgiques sont discriminantes chez l'ovin suite aux chirurgies digestives et intestinales, ce qui rejoint des études conduites sur le modèle de douleur orthopédiques chez le cheval (Buisnière et *al.*, 2008). Concernant les signes cliniques dont les indicateurs tels que l'œil enfoncé et le poil piqué ont été les plus utilisés, ils ne se révèlent pas très performants, tout du moins dans les situations expérimentales étudiées. Ce constat pose quand même un problème vis-à-vis des pratiques de terrain où l'observation par le vétérinaire et l'éleveur sont

Tableau 10 : Pertinence des différents indicateurs au sein de la voie de l'**inflammation** d'après les articles N°3, 4, 5 et 6.

Espèce	Type de douleur	Traitements et/ou Période / Jour		Haptoglobine	SAA	Température rectale	Température ruminale	TNF
OVIN	somatique + viscérale (<i>castration</i>)	0 - 2h	B + A +AINS	0	ns	+	⊖	⊖
			B + A	++		0		
			B	0		0		
		3 - 36h	B + A +AINS	0	ns	++	⊖	⊖
			B + A	+		0		
			B	++		+		
		36 - 78 h	B + A +AINS	0	ns	ns	⊖	⊖
			B + A	++				
			B	++				
	somatique (+ viscérale, RDI) (<i>canules</i>)	T S R RDI		0 0 ++ ++	⊖	⊖	⊖	⊖
BOVIN	somatique (<i>mammite</i>)	P0 (-42 ; 0 h)		0	0	⊖	0	⊖
		P1 (0 ; +8 h))		0	(+)		(+)	
		P2 (+12 ; +24h))		+	+		++	
		P3 (+32 ; +80 h)		++	++		0	
	somatique + viscérale (<i>canules</i>)	J1		+	⊖	⊖	⊖	ns
		J3		+				
		J5		++				
		J13		0				

⊖ : Indicateur non mesuré

0 : Indicateur non explicatif

+

++ : Indicateur explicatif (indicateur varie significativement ($P \leq 0.05$) par rapport à la référence (lot ou période sans douleur))

couramment utilisées pour diagnostiquer une douleur potentielle. Il est possible que les situations expérimentales investiguées dans notre étude soient en partie modulées par les traitements administrés.

Les indicateurs de l'**axe inflammatoire** sont soit des indicateurs plus en relation avec les processus inflammatoires comme les protéines de phase aigüe (haptoglobine et sérum amyloïde A (SAA) ou des cytokines (TNF) soit des **indicateurs indirects** comme la température (rectale ou ruminale) (Tableau 10). L'haptoglobine apparait comme l'indicateur le plus pertinent, permettant de différencier toutes les situations testées quels que soient l'espèce et le type de douleur (Tableau 10). Ce résultat est complètement en accord avec la bibliographie, où l'haptoglobine est une des protéines majeures de la phase aigüe chez le ruminant (Foucras et Tabouret, 2012) de plus, la réaction inflammatoire est toujours associée à la notion de douleur. Par contre, il est admis que le délai d'augmentation des concentrations sériques en haptoglobine peut être variable, mais de manière générale, elle commence à augmenter dans les 12 à 24 heures suivant le début du phénomène inflammatoire (Conner et al., 1988 ; Salonen et al., 1996). En effet, ces indicateurs sont caractéristiques de la réponse systémique et non de la réponse locale (Foucras et Tabouret, 2012). Un des facteurs qui se situerait en amont de ces protéines de la phase aigüe aurait pu être le $\text{TNF}\alpha$ en tant que cytokine caractéristique de la réponse locale. Cependant dans la seule étude conduite où nous avons mesuré les variations de cet indicateur, il n'est pas apparu comme indicateur discriminant. Il serait très intéressant de mesurer plusieurs indicateurs de la réponse locale (interleukines, $\text{TNF}\alpha$) dans les autres études conduites dans ce travail, ainsi que dans d'autres situations douloureuses pour apprécier plus précisément l'intérêt de ces indicateurs en termes de pouvoir discriminant. Enfin, la température corporelle, comme autre indicateur de la réponse systémique est apparu comme assez discriminant, cet indicateur étant facilement accessible en pratique. Cependant, chez la vache laitière après induction de mammite induite par des *Escherichia Coli*, il n'est pertinent que dans la phase d'état de la mammite (de 12 à 24h post inoculation), ce qui ne permet pas un traitement approprié dans les phases pré-clinique ou de rémission.

Parmi les indicateurs de l'**axe hypothalamo-hypophysaire surrénalien** (HHA), nous avons suivi un **indicateur "direct"** (cortisol) et 2 **indicateurs métaboliques indirects** (AGNE et glucose) qui varient fortement avec la mobilisation de cet axe (Tableau 11). A posteriori, les indicateurs indirects que nous avons mesurés dans nos différentes études sont trop influencés

Tableau 11 : Pertinence des différents indicateurs au sein de l'axe **Hypothalamo Hypophysaire Surrénalien** d'après les articles N°3, 4, 5 et 6.

Espèce	Type de douleur	Traitements et/ou Période / Jour		Cortisol	Glucose	AGNE
OVIN	somatique + viscérale (<i>castration</i>)	0 - 2h	B + A + AINS	0	0	0
			B + A	++	+	++
			B	++	++	++
		3 - 36h	B + A + AINS			0
			B + A	ns	ns	(+)
			B			0
		36 - 78 h	B + A + AINS	ns	0	
			B + A		+	ns
			B		0	
BOVIN	somatique (<i>mammite</i>)	P0 (-42 ; 0 h)		0		
		P1 (0 ; +8 h))		+		
		P2 (+12 ; +24h))		++	⊗	⊗
		P3 (+32 ; +80 h)		+		
	somatique + viscérale (<i>canules</i>)	J1		+		+
		J3		0	ns	0
		J5		0		0
		J13		0		0

⊗ : Indicateur non mesuré

0 : Indicateur non explicatif

+

++ : Indicateur explicatif (indicateur varie significativement ($P \leq 0.05$) par rapport à la référence (lot ou période sans douleur))

Tableau 12 : Pertinence des différents indicateurs au sein du **Système Nerveux autonome** d'après les articles N°3, 4, 5 et 6.

Espèce	Type de douleur	Traitements et/ou Période / Jour		Fréquence cardiaque	RMSSD	SDNN	LH/HF	
OVIN	somatique + viscérale (<i>castration</i>)	0 - 2h	B + A +AINS B + A B	ns	ns	ns	ns	
			3 - 36h	B + A +AINS B + A B	ns	ns	ns	ns
				36 - 78 h	B + A +AINS B + A B	0 + 0	ns	ns
	somatique (+ viscérale, RDI) (<i>canules</i>)	T S R RDI			0 0 0 ++	0 0 0 (+)	⊖	ns
	BOVIN	somatique (<i>mammite</i>)	P0 (-42 ; 0 h) P1 (0 ; +8 h)) P2 (+12 ; +24h)) P3 (+32 ; +80 h)		⊖	⊖	⊖	⊖
somatique + viscérale (<i>canules</i>)		J1 J3 J5 J13		⊖	⊖	⊖	⊖	

⊖ : Indicateur non mesuré

0 : Indicateur non explicatif

+ : Indicateur faiblement explicatif (indicateur varie mais de façon non significative par rapport à la référence (lot ou période sans douleur))

++ : Indicateur explicatif (indicateur varie significativement ($P \leq 0.05$) par rapport à la référence (lot ou période sans douleur))

par les conditions physiologiques des animaux (restriction alimentaire, perfusion de composés énergétiques) et de ce fait ne peuvent être évalués avec certitude. Il serait important de pouvoir appréhender ces indicateurs dans d'autres situations douloureuses, comme l'écornage, les boiteries (sans restriction alimentaire associée) et ceci dans les heures qui suivent immédiatement l'acte douloureux pour pouvoir évaluer leur pertinence. Le cortisol apparaît comme discriminant, ce qui est conforme aux données bibliographiques (Stafford *et al.*, 2005 ; Mellema *et al.*, 2006). Cependant, sa valence "indicateur de stress émotionnel" (Breuer *et al.*, 2003), fait de lui un indicateur non spécifique de l'évaluation de la douleur. Néanmoins, il apparaît comme un bon complément dans la liste des indicateurs discriminants et à ce titre garde tout son intérêt dans notre démarche d'évaluation multiparamétrique.

Les indicateurs du **système nerveux autonome** (SNA) mesurés au cours de ces expérimentations étaient la fréquence cardiaque, le RMSSD, le SDNN, le rapport LH/HF (Tableau 12). Nos observations n'ont porté que sur l'espèce ovine, l'équipement de capteur sur gros animaux étant plus délicat, nous n'avons pas pu l'intégrer dans les expérimentations que nous avons suivies hors de notre Centre de Recherche. Il apparaît cependant clairement que le simple rythme cardiaque est bien souvent suffisant pour discriminer différentes situations douloureuses (Stewart *et al.*, 2008). Cependant, l'absence de différence significative au cours des 36h post-castration (tableau 12) est étonnante, l'évènement douloureux étant pourtant assez marqué pour que l'on ait pu attendre des différences entre lots. Cependant, cet axe est également fortement modulé par le stress lui-même, indépendamment du niveau de douleur ce qui a certainement masqué les réponses propre à la douleur. Des indicateurs directs comme les catécholamines auraient peut-être été intéressants dans ce cadre d'essai.

Les indicateurs du **stress oxydant** étaient soit **directement liés aux processus oxydatifs** (NO, GSG/GSSG) soit **indirects** en évaluant les niveaux des réserves en antioxydants (vitamines E et A, TAS) ou encore le niveau de produits peroxydés produits (MDA) (Tableau 13). Il apparaît clairement, même si toutes les situations possibles n'ont pas été investiguées, que les indicateurs directs sont les plus discriminants, particulièrement la production de composés radicalaires comme l'oxyde nitrique (NO) et la mobilisation des systèmes de stabilisation de ces composés radicalaires comme le glutathion (sous sa forme oxydée). Ainsi, soit en tant que "révélateur" du niveau d'inflammation, soit en tant que "système mobilisé" dans le cadre de lésions tissulaires, ou encore comme modulateur de la nociception (Vaculin *et al.*, 2010 ; Salvemini *et al.*, 2011 ; Moreira *et al.*, 2016) comme nous l'avons déjà évoqué,

Tableau 13 : Pertinence des différents indicateurs au sein du **Stress oxydant** d'après les articles N°3, 4, 5 et 6.

Espèce	Type de douleur	Traitements et/ou Période / Jour		MDA	TAS	NO	Vitamine E	Vitamine A	GSH/GSSG
OVIN	somatique + viscérale (castration)	0 - 2h	B + A +AINS B + A B	⊙	⊙	ns	ns	ns	ns
		3 - 36h	B + A +AINS B + A B	⊙	⊙	ns	ns	ns	ns
		36 - 78 h	B + A +AINS B + A B	⊙	⊙	ns	ns	ns	ns
	somatique (+ viscérale, RDI) (canules)	T S R RDI		ns	ns	0 (+) + ++	⊙	⊙	0 0 + ++
BOVIN	somatique (mammite)	P0 (-42 ; 0 h) P1 (0 ; +8 h) P2 (+12 ; +24h) P3 (+32 ; +80 h)		⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	0 0 0 0
		J1		0	⊙	+	+	+	++
		J3		+		0	+	++	+
		J5		++		0	++	+	+
	somatique + viscérale (canules)	J13		++		0	++	0	+

⊙ : Indicateur non mesuré

0 : Indicateur non explicatif

+

++ : Indicateur explicatif (indicateur varie significativement ($P \leq 0.05$) par rapport à la référence (lot ou période sans douleur))

Tableau 14 : Pertinence des différents indicateurs au sein de la voie des **performances zootechniques** d'après les articles N°3, 4, 5 et 6.

Espèce	Type de douleur	Traitements et/ou Période / Jour		Production laitière	MSI
OVIN	somatique + viscérale (<i>castration</i>)	0 - 2h	B + A +AINS B + A B	⊖	⊖
		3 - 36h	B + A +AINS B + A B	⊖	⊖
		36 - 78 h	B + A +AINS B + A B	⊖	⊖
	somatique (+ viscérale, RDI) (<i>canules</i>)	T S R RDI		⊖	⊖
	BOVIN	somatique (<i>mammite</i>)	P0 (-42 ; 0 h) P1 (0 ; +8 h)) P2 (+12 ; +24h)) P3 (+32 ; +80 h)		⊖
somatique + viscérale (<i>canules</i>)		J1		+	++
		J3		0	(+)
		J5		0	(+)
		J13		0	0

⊖ : Indicateur non mesuré

0 : Indicateur non explicatif

+ : Indicateur faiblement explicatif (indicateur varie mais de façon non significative par rapport à la référence (lot ou période sans douleur))

++ : Indicateur explicatif (indicateur varie significativement ($P \leq 0.05$) par rapport à la référence (lot ou période sans douleur))

ces indicateurs semblent assez complémentaires de ceux des voies plus communément évoquées dans les processus douloureux (inflammation, comportement...). Par contre, les marqueurs indirects comme l'apparition de produits de peroxydation semblent moins précoces que le glutathion, les concentrations du MDA augmentent significativement à partir du 5^{ème} jour post-opératoire chez les bovins opérés de canules digestives alors que les réserves en glutathion diminuent dès le 1^{er} jour post-opératoire. Actuellement, des marqueurs plus sensibles et précoces de ces processus de peroxydation sont utilisés comme les hydroperoxydes, les isoprostanes et mériteraient d'être testés dans le cadre de notre approche multiparamétrique.

Les indicateurs de **performances zootechniques** (Tableau 14) n'ont été évalués que sur 1 des 4 essais et ne peuvent donc être discutés correctement dans notre étude. Cependant, ces indicateurs sont très régulièrement évoqués dans le cadre d'évaluation de la douleur (Le Neindre et *al.*, 2009) et restent des indicateurs très accessibles à toute la filière.

Conclusions et perspectives

Conclusions

Grâce à une étude bibliographique approfondie en début de ce travail, nous avons pu sélectionner différentes voies et différents indicateurs de chaque voie et ainsi conduire une étude exploratoire concernant une approche multiparamétrique d'évaluation de la douleur sur 2 espèces d'intérêt pour la filière ruminant. Malgré la lourdeur des mesures à conduire cette étude exploratoire a pu être menée à bien dans le cadre de 4 expérimentations complémentaires. Nous avons pu mettre en évidence l'intérêt d'une approche multiparamétrique pour 1) identifier les perturbations physiologiques (inflammation) et métabolique (stress oxydant) induite par ces situations traumatiques 2) discriminer différentes situations douloureuses, ou potentiellement douloureuses, différents types de douleur (somatique et mixte), sur deux modèles animaux et à des moments d'observation différents par rapport à l'évènement traumatique. Il reste cependant quelques points qui méritent d'être approfondis.

Notre travail a permis de proposer une première grille multiparamétrique d'évaluation du "risque de douleur". En effet, les indicateurs des voies de l'inflammation et des processus oxydatifs ne sont que des indicateurs "indirects" d'une situation potentiellement douloureuse. Il sera important de proposer une grille d'évaluation du niveau de douleur ressentie effectivement par les animaux dans diverses situations traumatiques. Pour cela, d'autres indicateurs complémentaires tels que algomètre de pression / filament de von frey, EEG pourront être utilisés pour mieux caractériser la douleur ressentie par l'animal.

Par ailleurs, nous n'avons pas testé notre approche sur des modèles de douleur spécifiquement viscérale ou purement neuropathique et nous pouvons nous demander si les indicateurs ou voies utilisés seront aussi pertinents pour évaluer ces autres types de douleur. Enfin, tous les indicateurs sélectionnés ne pourront être transposés facilement sur le terrain, comme par exemple les mesures physiologiques correspondant au rythme cardiaque, les analyses biochimiques nécessitant des prélèvements de sang suivis de dosages comme le cortisol, les marqueurs de l'inflammation ou encore les indicateurs du stress oxydant.

Cependant, le développement de l'élevage de précision avec le développement de capteurs embarqués (mesure de température par exemple) devrait permettre de mesurer certains de ces indicateurs directement en ferme et ainsi permettre d'attribuer un score de douleur dans un proche avenir. Pour cela il sera nécessaire de poursuivre les essais pour déterminer les

indicateurs indispensables à conserver pour garder une évaluation robuste et précise de la douleur chez les animaux de rente.

Une autre limite de ce travail réside dans le fait que nous n'avons pu attribuer un score global de douleur regroupant les observations faites dans chacune des voies, ce score étant indispensable pour envisager une prise en charge appropriée par l'éleveur, le vétérinaire ou l'expérimentateur.

Enfin, il sera nécessaire de mieux évaluer les performances de notre approche, particulièrement en termes de reproductibilité, celle-ci devant être déployée auprès d'un grand nombre d'acteurs dont la sensibilité par rapport à la douleur animale peut fortement influencer l'appréciation, en particulier concernant les observations comportementales.

Perspectives

Les perspectives de ce travail sont à considérer à plusieurs niveaux.

Il faudra dans un premier temps consolider nos conclusions en diversifiant les situations douloureuses prospectées pour définir très exactement le domaine de validité de notre méthode, en termes de type de douleur (neuropathique en particulier), de stade physiologique (jeune vs adulte) ou de contexte (animal isolé, en stabulation, au pâturage...).

Il sera également nécessaire à partir de ces données élargies de proposer aux utilisateurs un score global de douleur permettant de situer le niveau de douleur et d'y associer la meilleure prise en charge possible. Pour cela il faudra établir des seuils et définir des scores pour chaque indicateur. Ce score global de douleur permettrait d'évaluer l'intensité douloureuse de façon globale et permettre de définir des paliers comme proposés en médecine humaine, ces paliers définissant la prise en charge thérapeutique.

Dans un deuxième temps, il sera important de simplifier au maximum l'approche multiparamétrique en sélectionnant les indicateurs les plus discriminants d'une douleur réelle et non potentielle et les plus facilement accessible par les utilisateurs, qu'ils soient du monde de la recherche, du corps des vétérinaires praticiens ou des éleveurs.

Les approches développées dans le cadre de l'agriculture de précision devront être intégrées à cette démarche, en particulier les capteurs embarqués pour des mesures comportementales (ex. podomètres, positionnement en temps réel), biochimiques et/ou physiologiques (ex ; Température ruminale). L'évaluation du comportement des animaux, dont on a vu qu'il

constituait un axe fort de discrimination du niveau de douleur, pourra également être suivi par des techniques d'analyse vidéo en temps réel à partir d'algorithmes développés par les chercheurs. Plusieurs paramètres physiologiques peuvent être facilement mesurés directement sur l'animal via les robots de traite tels que les cellules somatiques, conductivité, coloration dans le lait. Nous pourrions donc augmenter ce nombre d'indicateurs connus pour être dosables dans le lait comme le cortisol, les catécholamines. Ces techniques en développement devraient dans un proche avenir permettre de mesurer des indicateurs comme le cortisol, les protéines de l'inflammation, des constantes métaboliques, toutes ces données pouvant être intégrées dans notre approche multiparamétrique.

Ainsi, les perspectives plus générales de cette thèse pourraient être résumées par un principe tiré de l'agriculture de précision : la bonne molécule analgésique ou anesthésique / au bon moment / au bon emplacement / à la bonne dose/ de la bonne manière ce qui nécessite une évaluation précise de l'intensité douloureuse.

Enfin, il sera important de reconsidérer les traitements antalgiques actuellement proposés en fonction de leur efficacité, de leur coût et bénéfice attendus, pour l'animal et pour ses performances. Cette nouvelle approche du coût/bénéfice, plus facilement objectivable par une grille d'évaluation de la douleur, devrait permettre aux prescripteurs d'avoir plus d'arguments pour proposer des traitements antalgiques.

Annexes

Annexe 1 : Publication N°1**Douleurs animales. 1. Les mécanismes****V. Paulmier, M. Faure, D. Durand, A. Boissy, J. Cognié, A. Eschaliér, E.M.C. Terlouw***INRA Production Animales 2015, (28), 217-230.*

Qu'ils soient élevés à des fins commerciales ou expérimentales, les animaux de rente sont confrontés tout au long de leur vie à des pratiques potentiellement sources de douleurs : interventions de convenance et d'élevage (castration, écornage...) ; interventions chirurgicales (césariennes, implantation en chronique de cathéters...). L'élaboration d'outils d'évaluation des douleurs ressenties par les animaux et de traitements pharmacologiques nécessite une bonne connaissance des mécanismes impliqués dans l'apparition et la modulation de ces douleurs. L'objectif de cette revue est de rapporter les connaissances acquises au cours des dernières années qui ont de l'intérêt pour la gestion de la douleur des animaux d'élevage. Les connaissances présentées sont en grande partie issues d'études conduites chez les rongeurs dont les conclusions sont applicables aux animaux de rente. La revue est constituée de trois parties complémentaires. La première décrit les différentes étapes d'élaboration, de transmission et d'intégration sensorielle et émotionnelle des messages nociceptifs impliqués dans l'apparition de la douleur. La deuxième partie décrit les différents types de modulation qui peuvent activer ou inhiber la transmission des messages nociceptifs. La troisième partie décrit les différents processus neurophysiologiques qui accompagnent la douleur et peuvent la moduler (inflammation, activation du système nerveux autonome et du système neuroendocrinien).

Douleurs animales.

1. Les mécanismes

V. PAULMIER^{1,2,3}, M. FAURE^{1,2}, D. DURAND^{1,2}, A. BOISSY^{1,2},
J. COGNIE^{4,5,6,7}, A. ESCHALIER⁸, E.M.C. TERLOUW^{1,2}

¹ INRA, UMR1213 Herbivores, F-63122 Saint-Genès-Champanelle, France

² Clermont Université, VetAgroSup, UMR1213 Herbivores, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France

³ ADIV, 10 rue Jacqueline Aurioi – ZAC des Gravanches, F-63039 Clermont-Ferrand, France

⁴ INRA, UMR0085 PRC, F-37380 Nouzilly, France

⁵ CNRS, UMR7247 PRC, F-37380 Nouzilly, France

⁶ Université François Rabelais de Tours, UMR0085, F-37380 Nouzilly, France

⁷ IFCE, UMR0085 PRC, F-37380 Nouzilly, France

⁸ Université d'Auvergne Clermont 1, INSERM UMR1107 Neuro-Dol, F63001 Clermont-Ferrand Cedex 1, France

Courriel : claudia.terlouw@clermont.inra.fr

En élevage tout comme en recherche, les animaux de rente sont soumis à des pratiques qui sont potentiellement sources de douleurs, dont l'évaluation et le traitement sont rendus délicats par la complexité des mécanismes impliqués. Une bonne connaissance de leurs rôles dans l'apparition et la modulation de la douleur chez les animaux de rente est donc nécessaire pour en améliorer sa prise en charge.

En élevage comme en recherche, les animaux de rente sont soumis à des pratiques potentiellement sources de douleurs telles que les interventions de convenue ou d'élevage (castration, écornage, césariennes...) ou celles liées à des protocoles expérimentaux (implantation en chronique de cathéters et/ou de canules...) (Reynolds *et al* 1995, Prunier *et al* 2013, Faure *et al* 2015, ce numéro). A l'heure actuelle, la gestion de ces douleurs reste difficile notamment en ce qui concerne leur évaluation qui reste perfectible. Pour élaborer de nouveaux outils (grilles d'évaluation, traitements pharmacologiques) en vue d'améliorer la gestion des douleurs chez les animaux de rente, l'accès aux connaissances actuelles sur les mécanismes d'apparition et de modulation de la douleur est primordial.

La douleur est une expérience complexe qui met en œuvre de nombreux processus (Julius et Basbaum 2001). En réponse à des stimulations nociceptives¹, des messages nerveux dits « nociceptifs » sont créés et transmis *via* la moelle épinière au cerveau où l'information est traitée. L'animal ressent une douleur si l'information que son cerveau reçoit génère une sensation associée à une émotion négative (Apkarian *et al* 2005, Basbaum *et al* 2009, Julius 2013).

L'objectif de cet article est de synthétiser dans un seul document les connaissances acquises au cours des dernières années concernant les mécanismes d'apparition et de modulation de la douleur chez l'animal. Cette revue est constituée de trois parties. La première décrit les différentes étapes d'élaboration, de transmission et d'intégration des messages nociceptifs impliqués dans l'apparition de la douleur (composantes sensorielle et émotionnelle). La deuxième décrit les différents types de modulation qui peuvent activer ou inhiber la transmission des messages nociceptifs. La troisième décrit les différents processus neurophysiologiques qui accompagnent la douleur et peuvent la moduler (inflammation, activation du système nerveux autonome et du système neuroendocrinien).

1 / Apparition de la douleur chez l'animal

1.1 / Elaboration des messages nociceptifs (transduction)

Dans les tissus de l'animal (peau, muscles, viscères...), des cellules spécialisées ont la capacité de recevoir les stimulations

nociceptives et de les transformer en messages nerveux. Ces cellules sont des neurones sensoriels primaires (encadré 1) appelés nocicepteurs (figure 1). Ils sont constitués : *i*) de terminaisons nerveuses libres localisées au niveau de la peau, des muscles et des viscères, etc., *ii*) d'un corps cellulaire, et *iii*) d'axones peu myélinisés (fibres Aδ) ou amyéliniques (fibres C) qui relient leurs terminaisons nerveuses libres à leur corps cellulaire et leur permettent aussi de communiquer avec des neurones localisés dans la moelle épinière (Basbaum *et al* 2009).

Les stimulations nociceptives sont spécifiques de par leur nature et leur intensité (Julius 2013). Elles peuvent être mécaniques (coups, incisions, piqûres...), thermiques (brûlures, engelures...) ou chimiques (injections de produits, sécrétions d'acides dans le tractus digestif...). La transformation des stimulations nociceptives en messages nerveux nociceptifs s'effectue dans les terminaisons nerveuses libres des nocicepteurs. Les stimulations nociceptives y sont reçues par des canaux ioniques membranaires, les canaux TRP (« *Transient Receptor Potential* »). Ces canaux s'ouvrent en réponse à des modifications de l'environnement local des terminaisons nerveuses

¹ Contraction des mots latins « *nocere* » (nuire) et « *capere* » (recevoir) : message lié à une stimulation nuisible. Une stimulation nociceptive est une stimulation qui peut blesser ou menacer l'intégrité de l'organisme d'un animal.

Encadré 1. Le neurone et son fonctionnement.

Le neurone est une cellule nerveuse stimulable et conductrice (Waugh et Grant 2004). Il est stimulable car il a la capacité d'élaborer des courants électriques, les potentiels d'action, en réponse à des stimulations provenant de l'extérieur ou de l'intérieur du corps de l'animal. Le neurone est aussi conducteur car il est capable de transmettre les potentiels d'action élaborés. Chaque neurone est constitué d'un corps cellulaire, d'axones et de terminaisons nerveuses.

Les neurones peuvent transmettre des messages nociceptifs et non nociceptifs. Plusieurs types de neurones sont impliqués dans la création et la transmission de ces messages nerveux :

- les neurones sensoriels primaires (nocicepteurs et neurones sensitifs) ;
- les neurones spinaux (neurones localisés dans la moelle épinière) ;
- les neurones supra-spinaux (neurones localisés dans le tronc cérébral et le cerveau).

Création et transmission des messages nerveux nociceptifs

Les neurones sensoriels primaires qui créent et transmettent les messages nociceptifs en réponse à des stimulations nociceptives sont les nocicepteurs (cf. 1.1). Leurs terminaisons nerveuses libres sont localisées au niveau de différents tissus (peau, muscles, viscères...). Leurs axones sont soit des fibres A δ peu myélinisées qui transmettent rapidement les messages nociceptifs aux neurones spinaux, soit des fibres C amyéliniques qui les transmettent plus lentement. Leur corps cellulaire est localisé dans les ganglions rachidiens (neurones du corps) ou dans le ganglion trigéminal (neurones de la tête).

Les neurones spinaux qui reçoivent les messages nociceptifs sont les neurones spécifiquement nociceptifs et les neurones convergents (cf. 1.2). Ces neurones transmettent ensuite les messages aux neurones supra-spinaux localisés dans différentes parties du cerveau appelées « matrice douleur » (cf. 1.3). Cette transmission passe principalement par trois voies : spino-thalamique, spino-réticulo-thalamique et ponto-mésencéphalique. L'activation de la matrice douleur par les messages nociceptifs conduit à l'apparition de douleurs (cf. 1.4).

Création et transmission des messages nerveux non nociceptifs

Les neurones sensoriels primaires qui créent et transmettent des messages non nociceptifs en réponse à des stimulations non nociceptives (tactiles et proprioceptives) sont appelés neurones sensitifs (Julius et Basbaum 2001, Le Bars et Willer 2004, Basbaum *et al* 2009). Leurs terminaisons nerveuses libres et leur corps cellulaire sont localisés dans les mêmes tissus et structures que ceux des nocicepteurs. Leurs axones sont des fibres myélinisées de gros calibre (telles que les fibres A β) qui transmettent très rapidement (30–120 m/s) les messages non nociceptifs aux neurones spinaux. Les neurones spinaux qui reçoivent ces messages sont des neurones non spécialisés dont les neurones convergents font partie. Ces neurones transmettent les messages non nociceptifs via la voie lemniscate à des neurones supra-spinaux localisés dans certaines parties du cerveau tel que le cortex somesthésique SI (Le Bars et Willer 2004). L'activation de ce cortex par les messages non nociceptifs conduit à l'élaboration de sensations tactiles et proprioceptives (perception du positionnement des différentes parties du corps).

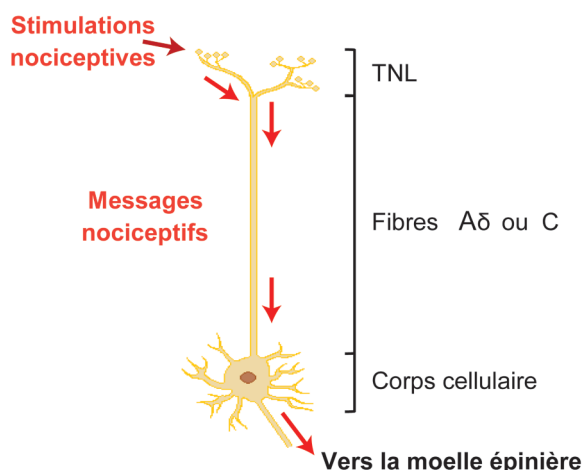
libres. Ces modifications peuvent être chimiques (libération de substances tel que l'ATP, les protons ou la bradykinine), thermiques (augmentation ou diminu-

tion de la température) ou mécaniques (modification de la pression osmotique exercée sur la membrane des terminaisons nerveuses libres) (Basbaum *et al*

2009, Julius 2013). L'ouverture des canaux TRP induit l'entrée de sodium dans le cytoplasme du nocicepteur ainsi qu'une sortie de potassium dans le milieu extracellulaire. La dépolarisation puis l'hyperpolarisation de la membrane des nocicepteurs induite par ces deux courants ioniques permet la formation d'un message nociceptif, qui est un potentiel d'action, c'est-à-dire un courant électrique qui se propage le long de l'axone.

Figure 1. Les nocicepteurs.

Les nocicepteurs sont des neurones sensoriels primaires. Ils sont constitués de terminaisons nerveuses libres (TNL), d'un corps cellulaire et d'axones peu myélinisés (Fibres A δ ou amyéliniques (Fibres C). La réception des stimulations nociceptives s'effectue au niveau des TNL qui sont localisées dans différents tissus (peau, muscles, viscères...). Lorsque les stimulations nociceptives sont reçues par les TNL, elles sont transformées en courants électriques (messages nerveux nociceptifs) par les canaux ioniques TRP (« *Transient Receptor Potential* »), localisés sur la membrane de ces TNL. Une fois créés, les messages nociceptifs sont transmis par les axones des nocicepteurs à des neurones de la moelle épinière.

**1.2 / Transmission des messages nociceptifs dans la moelle épinière****a) Les neurones récepteurs localisés dans la moelle épinière**

La transmission des messages nociceptifs vers le cerveau est initiée au niveau de la moelle épinière. La moelle épinière est constituée de dix couches de neurones spinaux qui peuvent être activés par des messages nociceptifs (potentiellement douloureux) et des messages non nociceptifs (inoffensifs). Nous nous intéresserons ici principalement aux neurones spinaux qui peuvent recevoir et transmettre les messages nociceptifs. Ces neurones sont soit spécifiquement nociceptifs, soit convergents² (Guirimand et Le Bars 1996, Calvino et

² On appelle ces neurones ainsi car ils peuvent être activés aussi bien par des messages nerveux nociceptifs que non nociceptifs.

Grilo 2006, Basbaum *et al* 2009). Les neurones spécifiquement nociceptifs sont principalement localisés dans les couches I et II de la moelle épinière, mais aussi en plus faible quantité dans les couches V, VI, VII et X. Ils reçoivent et transmettent des messages uniquement nociceptifs. Les neurones convergents sont principalement localisés dans la couche V de la moelle épinière, mais aussi en plus faible quantité dans les couches I et II. Ils reçoivent et transmettent des messages nociceptifs et non nociceptifs.

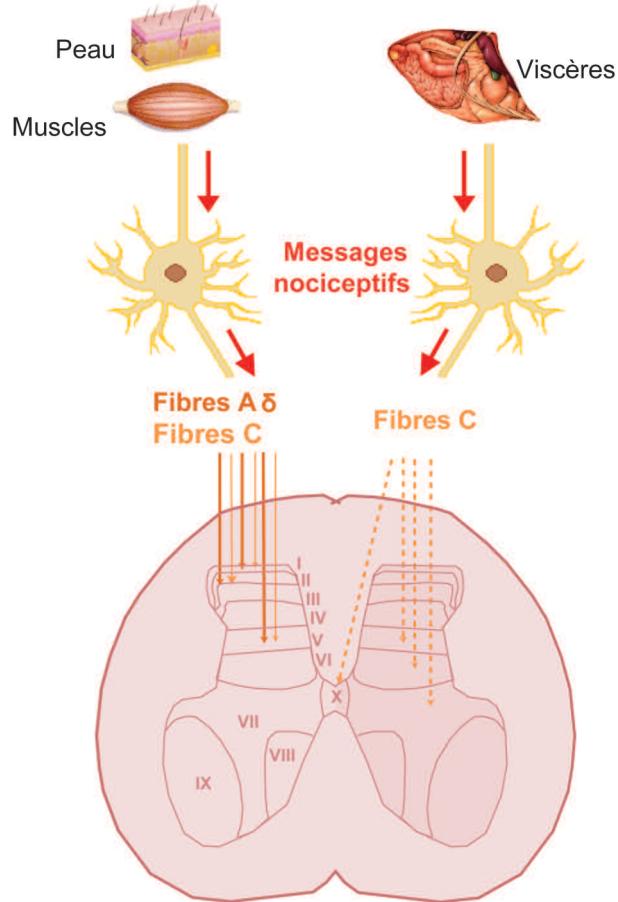
Les messages nociceptifs qui proviennent de la peau et des muscles sont transmis aux neurones spinaux au niveau des couches I, II et V de la moelle épinière (figure 2). Cette transmission est effectuée par les fibres Aδ et C des nocicepteurs. Les messages nociceptifs qui proviennent des viscères sont principalement transmis aux neurones localisés dans la couche V par les fibres Aδ et C. Ils sont aussi transmis aux neurones localisés dans les couches VI, VII et X par les fibres C (Guirimand et Le Bars 1996, Basbaum *et al* 2009). La transmission des messages nociceptifs aux neurones spinaux est plus ou moins rapide en fonction des fibres qui les transmettent. En effet, les fibres Aδ transmettent les messages nociceptifs à une vitesse de 6 à 25 m/s tandis que les fibres C les transmettent à une vitesse moindre (1 m/s) (Julius et Basbaum 2001).

b) Transmission synaptique des messages nociceptifs

Les messages générés par les nocicepteurs sont transmis aux neurones spinaux par l'intermédiaire de médiateurs chimiques au niveau d'une zone de jonction appelée synapse (figure 3) (Zamponi *et al* 2009). Le principal médiateur chimique libéré au niveau de cette synapse est le glutamate. C'est un neurotransmetteur. Il est contenu dans des vésicules localisées dans le cytoplasme des nocicepteurs. Ces vésicules fusionnent avec la membrane lorsque la concentration calcique cytoplasmique des nocicepteurs augmente, permettant ainsi la libération du glutamate dans la synapse (Basbaum *et al* 2009, Julius 2013). L'entrée de calcium qui permet la libération de glutamate est liée à l'ouverture de canaux calciques voltage-dépendants localisés sur la membrane des nocicepteurs au niveau de la synapse. L'ouverture de ces canaux est induite par l'arrivée des messages nociceptifs qui se sont propagés le long du nocicepteur suite à une stimulation au niveau des terminaisons nerveuses libres. Une fois libéré dans la synapse, le glutamate se lie à des récepteurs localisés sur la membrane des neurones spinaux spécifiquement nociceptifs et convergents. Ces

Figure 2. Transmission des messages nociceptifs par les fibres Aδ et C aux neurones de la moelle épinière.

Les fibres Aδ et C transmettent les messages nociceptifs aux neurones localisés dans la moelle épinière. Les messages nociceptifs provenant de la peau et des muscles sont transmis par les fibres Aδ et C aux neurones spinaux localisés dans les couches I, II et V de la moelle épinière (flèches continues). Ceux qui proviennent des viscères sont transmis par les fibres C aux neurones spinaux localisés dans les couches V, VI, VII et X de la moelle épinière (flèches discontinues).



récepteurs sont des récepteurs AMPA (acide-2-amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxalone/kainate) et NMDA (N-méthyl-D-aspartate) (Le Bars et Willer 2004). La liaison entre le glutamate et ces récepteurs induit l'ouverture de canaux sodiques. L'entrée de sodium dans le cytoplasme des neurones spinaux (post-synaptique) leur permettra ainsi de recevoir les messages nociceptifs.

La synapse est également le lieu d'une neuromodulation qui facilite la transmission des messages nociceptifs entre les nocicepteurs et les neurones spinaux. Cette neuromodulation est permise par un neuropeptide, la substance P qui est libérée uniquement par les nocicepteurs qui possèdent des axones de type C (dits peptidergiques). Comme pour le glutamate, la substance P est libérée suite à une entrée de calcium dans le cytoplasme des nocicepteurs induite par l'ouverture de canaux calciques voltage-dépendants (Basbaum *et al* 2009, Julius 2013). Une fois libérée, la substance P se lie à des récepteurs localisés sur la membrane des

neurones spinaux spécifiquement nociceptifs et convergents. Ces récepteurs sont les récepteurs NK1 (neurokinine-1). La liaison substance P-NK1 active l'ouverture des canaux ioniques couplés aux récepteurs NMDA (Le Bars et Willer 2004). Plus les nocicepteurs libèrent de substance P, plus les canaux sodiques et calciques restent actifs. Plus ils sont actifs, plus ils laissent entrer le sodium et le calcium dans les neurones spinaux. La réception des messages nociceptifs par les neurones spinaux est donc facilitée tout comme leur transmission vers le cerveau.

1.3 / Transmission des messages nociceptifs vers le cerveau

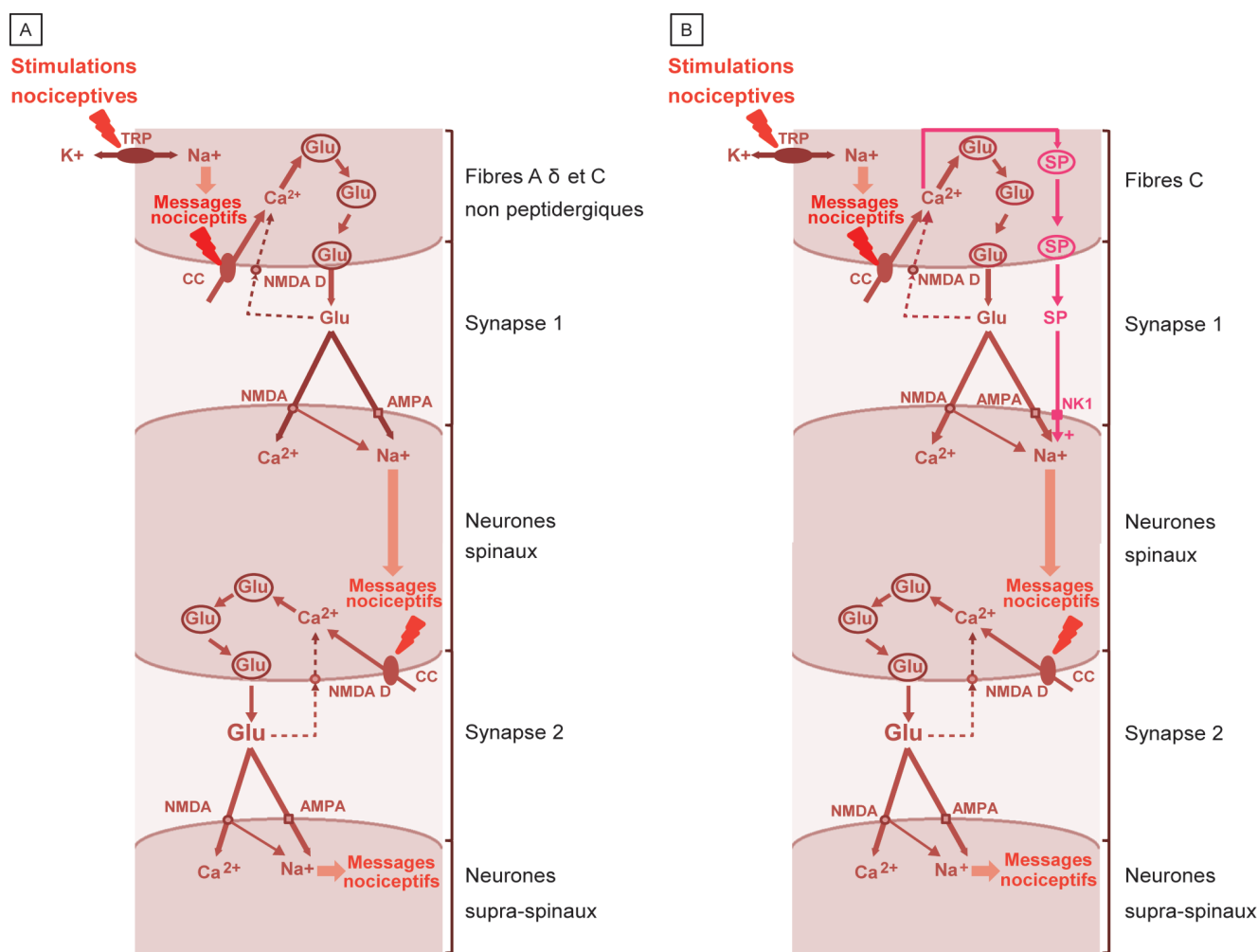
A partir de la moelle épinière, les messages nociceptifs sont transmis au cerveau. La transmission des messages nociceptifs entre neurones spinaux et supra-spinaux s'effectue au niveau de synapses qui fonctionnent comme les synapses situées au niveau de la moelle épinière (figure 3). Les neurones spinaux

Figure 3. Transmission synaptique des messages nociceptifs aux neurones spinaux et supra-spinaux.

Les stimulations nociceptives sont transformées en messages nociceptifs au niveau des canaux TRP (« *Transient Receptor Potential* ») dans les nocicepteurs (fibres A δ et C) via une entrée de sodium dans ces fibres et une sortie de potassium dans le milieu extracellulaire. Les messages nociceptifs ainsi produits ouvrent des Canaux Calciques voltage-dépendant (CC). L'entrée de calcium dans les nocicepteurs permet la libération de médiateurs chimiques dans la synapse 1.

A) Le principal médiateur chimique libéré est le glutamate (Glu). Une fois dans la synapse, le glutamate se lie à des récepteurs spécifiques localisés sur la membrane des neurones spinaux (spécifiquement nociceptifs et convergents) : les récepteurs AMPA (acide-2-amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxalone/kaïnate) et NMDA (N-Méthyl-D-Aspartate). La liaison entre le glutamate et ces récepteurs induit l'ouverture de canaux principalement sodiques qui permet une entrée de sodium dans le cytoplasme des neurones spinaux ainsi que le passage des messages nociceptifs dans ces neurones. Les messages nociceptifs sont ensuite transmis à des neurones supra-spinaux au niveau de la synapse 2 en suivant les mêmes étapes. La transmission synaptique des messages nociceptifs peut être amplifiée par un relargage massif de Glu dans la synapse. Ce relargage induit l'activation des récepteurs NMDA en dormance (NMDA D) présynaptiques (sur les fibres A δ et C ou les neurones spinaux) qui permet une nouvelle entrée de calcium dans le cytoplasme de ces neurones présynaptiques.

B) La transmission des messages nociceptifs au niveau de la synapse 1 peut être facilitée par la libération de neuromodulateurs tels que la substance P (SP) par les fibres C peptidergiques. La libération de la substance P dans la synapse s'effectue de la même manière que celle du Glu. La substance P se lie aux récepteurs NK1 (neurokinine-1), localisés sur les neurones spinaux, et suractive ainsi les récepteurs NMDA qui sont couplés aux canaux sodiques et calciques.



transmettent les messages à des neurones supra-spinaux localisés dans le tronc cérébral, comme la formation réticulée bulbaire, la substance grise périaqueducule et l'aire parabrachiale mésencéphalique, dans les structures sous-corticales, comme le thalamus, l'amygdale et l'hypothalamus et dans les structures corticales, comprenant les cortex cingulaire, insulaire et somesthésiques (primaire ou SI et secondaire ou SII) (Treede et al 1999, Calvino et Grilo 2006).

1.4 / Intégration des messages nociceptifs au niveau cérébral

Les informations transmises par les messages nociceptifs sont traitées et intégrées par le cerveau au niveau des cortex cingulaire, insulaire et somesthésiques SI et SII. Ces cortex forment un réseau fonctionnel connu sous le nom de « matrice douleur » (Apkarian et al 2005, Mouraux et al 2011). L'activation de ce réseau en réponse à des

stimulations nociceptives a pu être mise en évidence grâce à l'apport des nouvelles méthodes d'imagerie médicale développées au cours des dix dernières années telle que l'imagerie par résonance magnétique fonctionnelle et la tomographie par émission de positons notamment chez l'homme (Apkarian et al 2005) et le rat (Kim et al 2015, Yee et al 2015). Pour que l'intégration du message nociceptif conduise à l'apparition d'une douleur, elle doit permettre l'élabora-

Encadré 2. Apparition de la douleur chez l'animal : l'essentiel.

L'adjectif « nociceptif » vient du latin *nocere* (nuire) et *capere* (recevoir). Il qualifie toutes stimulations ou tous messages nerveux pouvant induire une douleur.

Le nocicepteur est le neurone sensoriel primaire qui reçoit les stimulations nociceptives et les transforme en messages nociceptifs qu'il transmet ensuite à des neurones localisés dans la moelle épinière.

L'élaboration des messages nociceptifs s'effectue dans les terminaisons nerveuses libres des nocicepteurs. Les stimulations nociceptives qui initient l'élaboration de ces messages peuvent être mécaniques (coups, incisions chirurgicales...), thermiques (marquage, écornage...) ou chimiques (injections de produits pharmacologiques...). Lorsqu'elles sont reçues par les terminaisons nerveuses libres, elles sont transformées en courants électriques (messages nociceptifs).

Les messages nociceptifs sont ensuite transmis par les nocicepteurs à des neurones localisés dans la moelle épinière, les neurones spinaux. Ces neurones spinaux transmettent les messages à différentes parties du cerveau (cortex cingulaire, insulaire et somesthésiques). Certains neurones spinaux ne peuvent recevoir que les messages nociceptifs, ils sont désignés sous le terme de « neurones spécifiquement nociceptifs ». D'autres peuvent recevoir en plus des messages nociceptifs, des messages non nociceptifs, ce sont les neurones convergents. Il existe trois voies de transmission des messages nociceptifs aux différentes parties du cerveau : spino-thalamique, spino-réticulo-thalamique et ponto-mésencéphalique.

Les cortex cingulaire, insulaire et somesthésiques traitent et intègrent les informations transmises par les messages nociceptifs. Une douleur apparaît si les cortex somesthésiques élaborent une sensation à partir de ces informations et que cette sensation est associée à une émotion négative élaborée par les cortex cingulaire et insulaire.

Encadré 3. La matrice douleur : pas de douleur sans sensation nociceptive ou sans émotion liée à la nociception.

Pour que l'animal ressente une douleur, la matrice douleur doit être intacte pour recevoir et intégrer les messages nociceptifs. Chez l'Homme, des études ont permis d'étudier les conséquences de la lésion de certaines structures corticales de la matrice.

Une lésion des cortex somesthésiques chez une patiente de Ploner *et al* (1999) a permis de connaître l'impact de l'application d'une stimulation nociceptive sur le ressenti de ce patient. L'application d'un laser sur la peau de la patiente (stimulation thermique qui entraîne une brûlure de la peau du patient) ne provoquait pas de douleur chez cette personne. Elle décrivait une « sensation désagréable en intensité » qu'elle ne pouvait pas localiser et qu'elle aimerait éviter. Ces résultats indiquent clairement que la matrice douleur de cette patiente est capable d'élaborer une émotion négative liée à la stimulation nociceptive. Cependant, l'émotion négative ne peut être associée à une sensation précise du type, de la localisation et de l'intensité de la stimulation. La lésion des cortex somesthésiques de cette patiente l'empêchait donc de ressentir la douleur proprement dite, seule la composante émotionnelle, dont la patiente ne pouvait expliquer l'origine, apparaissait.

Un autre cas rapporté par Calvino et Grilo (2006) a permis de connaître l'impact de l'application d'une stimulation nociceptive sur le ressenti d'un patient atteint d'une lésion du cortex cingulaire. L'application d'un laser sur la peau du patient, comme dans le cas précédent, ne provoquait pas de douleur chez cet individu. Il décrit cette expérience comme une « sensation non désagréable ». La matrice douleur de ce patient était capable d'élaborer une sensation précise (type, localisation, intensité) à partir des stimulations nociceptives qu'il avait perçues. Cependant, celle-ci n'était pas associée à une émotion négative pouvant être associée à cette sensation. La lésion du cortex cingulaire de ce patient l'empêchait donc de ressentir la composante émotionnelle normalement associée à une stimulation de ce type.

tion d'une sensation (composante sensorielle de la douleur) et d'une émotion (composante émotionnelle de la douleur) associée à cette sensation (Molony et Kent 1997). La sensation permet à l'animal de localiser les stimulations nociceptives et de connaître leur durée et leur intensité. L'émotion associée à cette sensation lui confère sa tonalité désagréable, pénible voire insupportable. Elle est modulée par la représentation qu'a l'animal du contexte socio-environnemental dans lequel il perçoit cette sensation (Calvino et Grilo 2006, Bushnell *et al* 2013).

Pour traiter et intégrer les informations transmises par les messages nociceptifs, les structures de la matrice douleur travaillent de manière synchrone (Treede *et al* 1999, Apkarian *et al* 2005, Mouraux *et al* 2011). Elles sont interconnectées et se transmettent des flux d'informations nociceptives. Ainsi, les cortex cingulaire et insulaire s'activent mutuellement tout comme les cortex somesthésiques SI et SII. Le cortex insulaire fait le lien entre le cortex cingulaire et le cortex somesthésique SII (Peyron *et al* 2000). Ce lien est important car c'est cette interconnexion qui permet à la matrice douleur de recevoir, de compiler et d'intégrer l'ensemble des informations nociceptives quelle que soit leur provenance (voies spino-thalamique, spino-réticulo-thalamique ou ponto-mésencéphalique – cf. 1.3). Chaque cortex de la matrice douleur a son rôle (Rainville *et al* 1997). Les cortex somesthésiques élaborent une sensation qui est *qualifiable* par l'animal (la localisation de la stimulation nociceptive, sa durée et son intensité). Les cortex cingulaire et insulaire, quant à eux, élaborent à partir de ces mêmes informations une émotion négative qui permet à l'animal de caractériser la sensation comme *désagréable* voire *non supportable*. Cette émotion peut induire des réactions comportementales (réactions de fuite, de défense, prise de positions antalgiques) (Prunier *et al* 2013). Le terme « douleur » est utilisé pour qualifier l'association entre la sensation et l'émotion élaborées par la matrice douleur en réponse à des stimulations nociceptives (encadré 2). On ne parle pas de douleur, si l'une de ces deux composantes (sensation ou émotion) n'est pas élaborée ou si les deux composantes ne sont pas associées. Ceci a été mis en évidence chez des patients humains dont les cortex somesthésiques ou cingulaire étaient endommagés (encadré 3) (Ploner *et al* 1999, Calvino et Grilo 2006).

Il existe trois voies principales de transmission entre neurones spinaux et supra-spinaux permettant l'intégration sensorielle et émotionnelle de l'information. Ces trois voies de transmission innervent les cortex cingulaire, insulaire et somesthésiques SI et SII, mais également

d'autres structures. Ces voies sont : *i*) la voie spino-thalamique, *ii*) la voie spino-réticulo-thalamique et *iii*) la voie ponto-mésencéphalique (figure 4) (Millan 1999, Treede *et al* 1999, Calvino et Grilo 2006). La voie spino-thalamique est phylogéniquement plus récente que les deux autres. Les messages nociceptifs qui suivent les voies spino-thalamique et spino-réticulo-thalamique (figure 4a) atteignent les cortex cingulaire, insulaire et somesthésiques en passant par le thalamus. La voie spino-thalamique est impliquée dans les aspects sensoriels et émotionnels. La voie spino-réticulo-thalamique (figure 4a) est probablement impliquée dans les aspects émotionnels (Millan 1999). Les deux voies sont impliquées dans l'inhibition descendante de la douleur (cf. 2.2.c) (Millan 1999). Les messages nociceptifs qui suivent la voie ponto-mésencéphalique (figure 4b) atteignent les cortex en passant par la substance grise périaqueducale. Les messages nociceptifs qui passent par cette voie sont également transmis à l'hypothalamus. Cette voie est impliquée dans l'intégration des informations somato-sensorielles et celles relatives au système nerveux autonome (cf. 3.2). Elle est en relation avec le système émotionnel (Millan 1999, 2002).

2 / Modulation de la douleur ressentie par l'animal

La transmission des messages nociceptifs peut être amplifiée ou atténuée, voire bloquée. Ceci implique que tous les messages nociceptifs n'atteignent pas la matrice douleur et que certains peuvent l'atteindre sans l'activer (Apkarian *et al* 2005, Mouraux *et al* 2011). Deux catégories de modulation de la transmission des messages nociceptifs existent : les modulations activatrices qui amplifient la transmission et les modulations inhibitrices qui l'atténuent, ou la bloquent (encadré 4).

2.1 / Modulations activatrices des messages nociceptifs

Deux types de modulations activatrices existent : *i*) la sensibilisation des nocicepteurs et *ii*) l'activation de la transmission synaptique spinale et supra-spinale.

a) Sensibilisation des nocicepteurs

Lorsqu'un animal est blessé, son organisme met en place un processus appelé inflammation qui libère plusieurs substances (cf. 3.1). Ces substances sont : *i*) l'ATP, les protons H⁺ et la bradykinine (libérés par les cellules endommagées), *ii*) les prostanoïdes (prostaglandine et prostacycline), neurotrophines (NGF – « *Nerve Growth Factor* »), la sérotonine et l'histamine (libérées par les cellules immunitaires activées lors du processus

inflammatoire) et *iii*) la substance P (libérée par les terminaisons nerveuses libres des nocicepteurs actifs). Elles activent et/ou sensibilisent les nocicepteurs en agissant au niveau des terminaisons nerveuses libres (figure 5) (Le Bars et Adam 2002, Meunier *et al* 2004, Chatterjea et Martinov 2015). Plus précisément, ces substances se lient aux canaux TRP localisés sur la membrane des terminaisons nerveuses libres, les ouvrent ou facilitent leur ouverture en abaissant leur seuil d'activation (à la chaleur, à la pression...) (Julius et Basbaum 2001, Basbaum *et al* 2009, Julius 2013). L'ouverture accrue de ces canaux TRP induit l'apparition de nombreux courants ioniques permettant la création de nouveaux messages nociceptifs (cf. 1.1) qui stimulent à leur tour la matrice douleur (cf. 1.2 et 1.3) et amplifient son activation. Ces mécanismes expliquent l'existence de différents phénomènes comme une hypersensibilité aux stimulations nociceptives (hypéralgésie) ou l'apparition de douleurs suite à des stimulations normalement non nociceptives (allodynie).

b) Activation de la transmission synaptique spinale et supra-spinale

Comme nous l'avons vu précédemment, la transmission synaptique des messages nociceptifs est notamment modulée par la quantité de glutamate et de substance P libérée au niveau de la synapse (cf. 1.2). Certaines molécules dites pronociceptives peuvent amplifier le relargage du glutamate et de la substance P. Pour cela,

elles se lient à des récepteurs localisés sur la membrane des nocicepteurs et des neurones spinaux, les activent et induisent une entrée supplémentaire de calcium dans le cytoplasme de ces neurones (figure 6) (Le Bars et Willer 2004). L'augmentation de la concentration calcique cytoplasmique de ces neurones induit le relargage massif du glutamate et de la substance P qui transmettent les messages nociceptifs aux neurones postsynaptiques (spinaux et supra-spinaux). Les molécules pronociceptives connues sont l'ATP, les prostanoïdes et la sérotonine. Elles se lient respectivement aux récepteurs P2X, EP et 5-HT₃, qui leur sont spécifiques. Cette amplification peut encore être renforcée si le relargage massif de glutamate induit l'activation de récepteurs NMDA présynaptiques en dormance (Basbaum *et al* 2009).

2.2 / Modulations inhibitrices des messages nociceptifs

Trois types de modulations inhibitrices existent : *i*) l'inhibition de la transmission synaptique spinale et supra-spinale, *ii*) la modulation segmentaire et *iii*) la modulation supra-segmentaire.

a) Inhibition de la transmission synaptique spinale et supra-spinale

Certaines molécules dites anti-nociceptives peuvent atténuer voire bloquer le relargage du glutamate et de la substance P (cf. 1.2.b). Pour cela, elles se

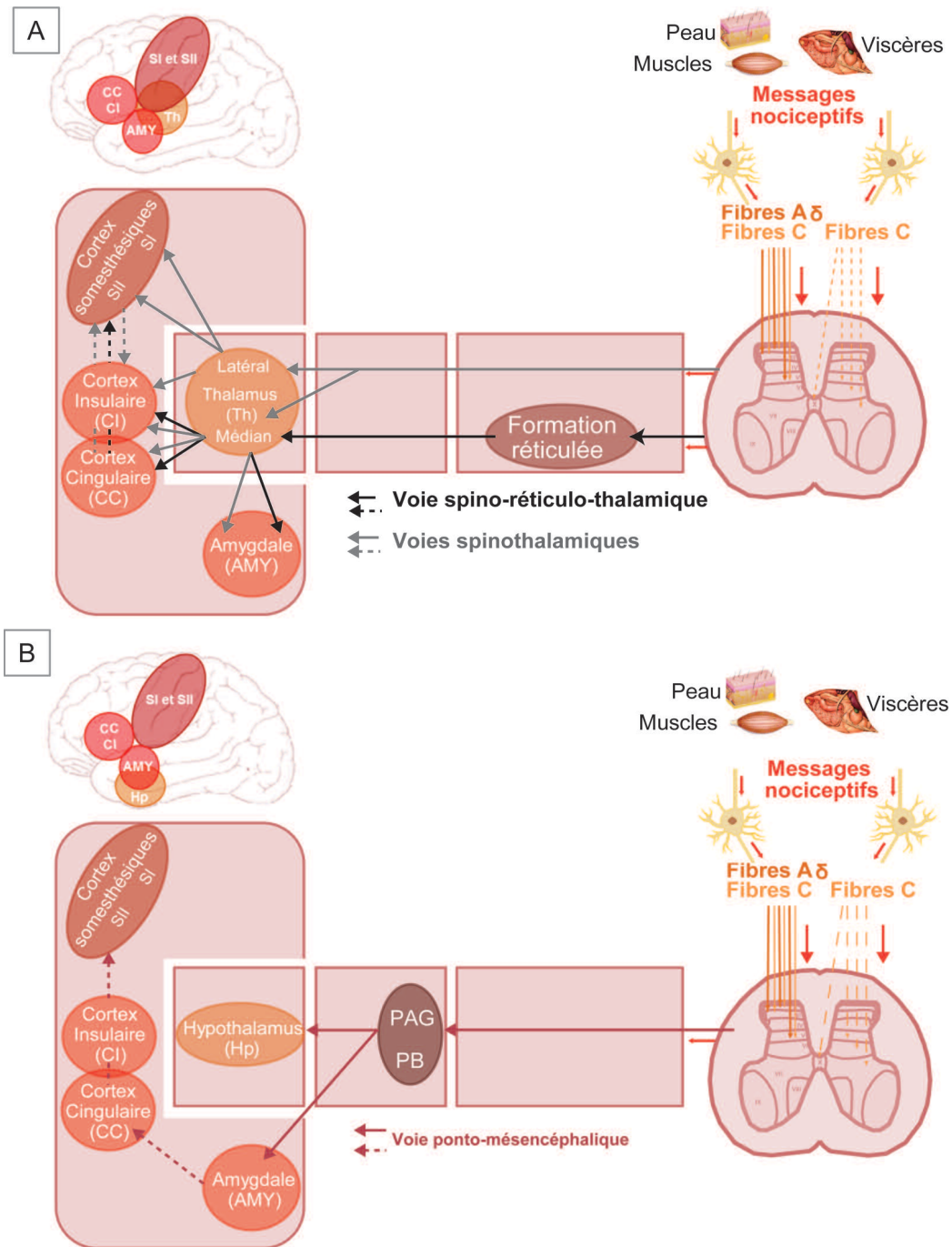
Encadré 4. Modulation de la douleur ressentie par l'animal : l'essentiel.

La douleur ressentie par un animal dépend du traitement et de l'intégration des messages nociceptifs que son cerveau aura reçus, en particulier sa matrice douleur. En fonction de la modulation de la transmission de ces messages, la matrice douleur pourra ou non les traiter et les intégrer.

Les modulations qui sont susceptibles d'amplifier la transmission des messages nociceptifs s'effectuent par une sensibilisation des nocicepteurs par des substances inflammatoires, mais aussi par l'activation de la transmission synaptique (spinale et supra-spinale) des messages nociceptifs par le biais des molécules pronociceptives.

Les modulations qui sont susceptibles d'atténuer voire de bloquer la transmission des messages nociceptifs sont :

- Une inhibition de la transmission synaptique spinale et supra-spinale des messages nociceptifs par des molécules anti-nociceptives comme les α_2 -agonistes et d'opioïdes ;
- Une inhibition de la transmission spinale des messages nociceptifs *via* une inactivation des neurones spinaux convergents par des messages non nociceptifs (modulation segmentaire). C'est ainsi que la pratique de massages des zones douloureuses peut soulager une douleur ;
- Une inhibition de la transmission synaptique spinale et supra-spinale des messages nociceptifs par des molécules anti-nociceptives endogènes. Ces molécules peuvent être libérées par différentes structures supra-spinales telles que la substance grise périaqueducale mésencéphalique suite à la réception, par ces structures, de messages nociceptifs issus d'une première stimulation nociceptive ou de stimulations nociceptives secondaires. C'est cette voie qui est utilisée dans la pratique de soulagement des douleurs par acupuncture.

Figure 4. Transmission des messages nociceptifs des neurones spinaux vers les structures cérébrales.

En fonction des parties du cerveau par lesquelles passent les messages nociceptifs au cours de leur transmission supra-spinal, trois voies principales de transmission ont été décrites : la voie spino-thalamique, la voie spino-réticulo-thalamique et la voie ponto-mésencéphalique. Ces trois voies de transmission peuvent être suivies par les messages nociceptifs en simultanée.

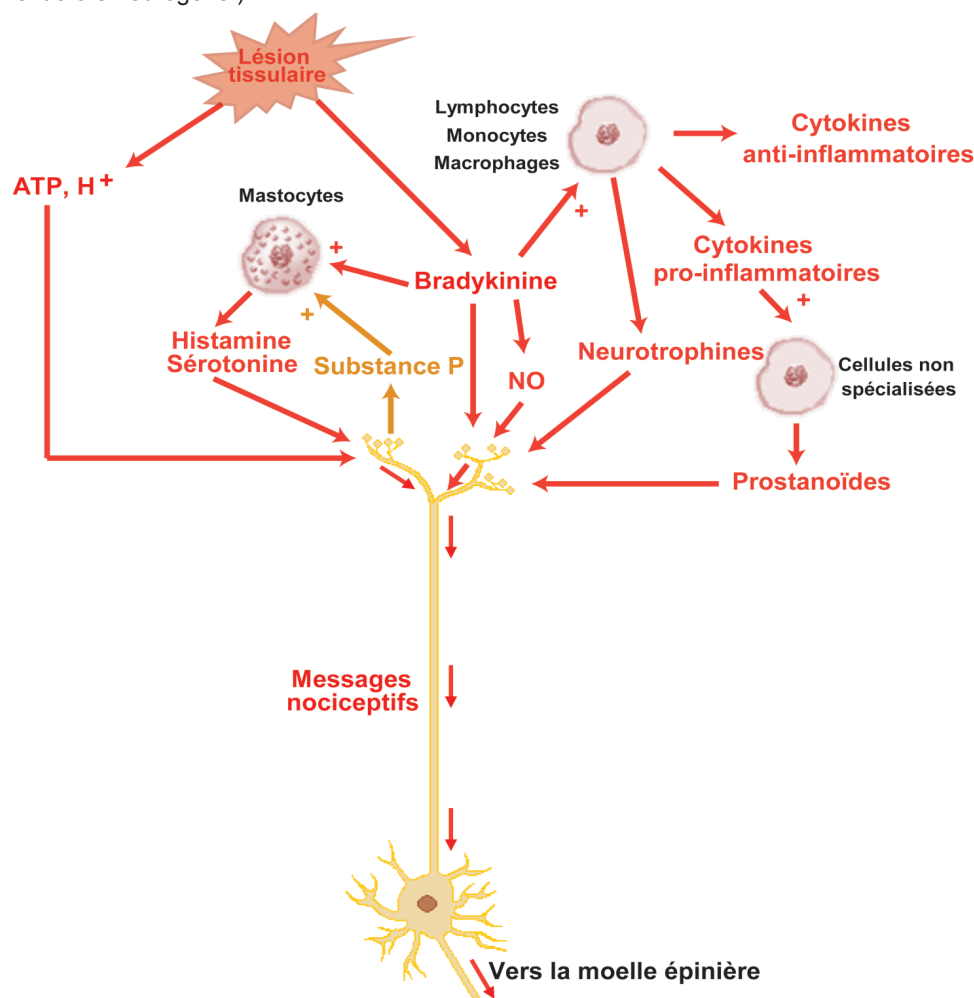
A) Dans la voie spino-thalamique, les messages nociceptifs sont transmis aux thalamus médian et latéral. Ils sont ensuite transmis par le thalamus médian à l'amygdale et aux cortex limbiques : cingulaire et insulaire. Le thalamus latéral transmet les messages nociceptifs au cortex insulaire et aux cortex somesthésiques primaire (SI) et secondaire (SII). Le cortex insulaire a un rôle central dans cette voie car il transmet en partie les messages nociceptifs qu'il reçoit du thalamus médian au cortex SII et ceux qu'il reçoit du thalamus latéral au cortex cingulaire. Dans la voie spino-réticulo-thalamique, les messages nociceptifs sont transmis à la formation réticulée au thalamus médian. Le thalamus médian les transmet ensuite à l'amygdale et aux cortex limbiques : cingulaire et insulaire. Puis le cortex insulaire les transmet en partie aux neurones du cortex SII.

B) Dans la voie ponto-mésencéphalique, les messages nociceptifs sont transmis à la substance grise périaqueducule (PAG) et à l'aire parabrachiale (PB) mésencéphaliques. La PAG et le PB transmettent ensuite ces messages à l'hypothalamus et à l'amygdale. Puis l'amygdale les transmet au cortex cingulaire qui les transmet au cortex insulaire qui les envoie au cortex SII.

Quelle que soit la voie de transmission, les structures cérébrales qui reçoivent en dernier les messages nociceptifs sont les cortex cingulaire et insulaire ainsi que les cortex somesthésiques SI et SII. Ce sont ces structures qui font l'intégration finale de l'information portée par les messages nociceptifs.

Figure 5. Sensibilisation des nocicepteurs par les substances libérées au cours de l'inflammation.

Lorsque les tissus de l'animal sont endommagés par des stimulations nociceptives, les substances libérées par les tissus endommagés (ATP, protons H^+ , bradykinine) activent les nocicepteurs. La bradykinine permet également leur sensibilisation en initiant l'inflammation des tissus. En effet, la bradykinine active la libération d'histamine, de sérotonine, d'oxyde nitrique (NO), de neurotrophines et de cytokines pro- et anti-inflammatoires notamment par les cellules de la lignée inflammatoire (mastocytes, lymphocytes, monocytes et macrophages). L'histamine, la sérotonine, les neurotrophines et le NO sensibilisent le nocicepteur. Les cytokines pro-inflammatoires induisent la production d'autres substances sensibilisatrices, les prostanoïdes, par des cellules non spécialisées. Elles jouent également un rôle dans l'amplification du processus inflammatoire en cours. Les cytokines anti-inflammatoires jouent leur rôle dans le contrôle de cette réaction inflammatoire pour éviter qu'elle ne s'amplifie trop. Les nocicepteurs sensibilisés par ces substances réagissent plus intensément aux stimulations nociceptives (conduisant à une hyperalgésie) et sont activés par des stimulations non nociceptives (conduisant à une allodynie). Ce processus conduit à une augmentation du nombre de messages nociceptifs élaborés et transmis *via* la moelle épinière au cerveau. Cette sur-activation des nocicepteurs a aussi pour conséquence la libération de substance P qui renforce la libération d'histamine et de sérotonine, l'inflammation devient alors neurogène.).



lient à des récepteurs localisés sur la membrane des nocicepteurs et des neurones spinaux, les activent et induisent une diminution de la concentration calcique de ces neurones qui inhibe le relargage du glutamate et de la substance P (figure 7) (Le Bars et Willer 2004). Les molécules anti-nociceptives connues sont la sérotonine, l'acide gamma-amino-butyrrique (GABA), la noradrénaline et les opioïdes. Elles se lient respectivement aux récepteurs 5-HT_{1A}/5-HT_{1B}, GABA_A, α_2 et $\mu/\delta/\kappa$, qui leur sont spécifiques. Ces molécules sont largement utilisées dans la pharmacopée vétérinaire (α_2 -agonistes et opioïdes notamment).

b) Modulation segmentaire

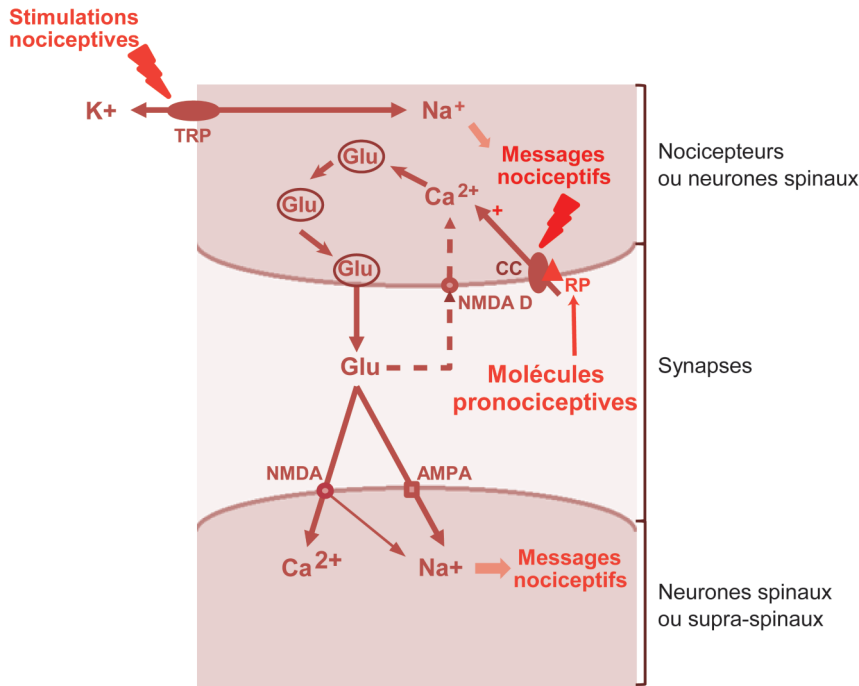
La modulation segmentaire³ de la transmission des messages nociceptifs s'effectue au niveau de la moelle épinière. Elle est liée au fonctionnement des neurones convergents. Ces neurones sont activés par des messages nociceptifs et non nociceptifs, et inactivés par des messages non nociceptifs. Ceci est lié à la structure de ces neurones qui sont constitués d'un champ récepteur excitateur et d'un champ récepteur inhibiteur (figure 8). Le champ excitateur des neurones convergents forme des synapses avec les fibres A δ et C, mais également avec des fibres non

nociceptives (tactiles par exemple). Lorsqu'il reçoit les messages nociceptifs et non nociceptifs, il active les neurones convergents et permet la transmission des messages que ces neurones ont reçus vers le cerveau (figure 8a). Le champ inhibiteur des neurones convergents forme des synapses uniquement avec des fibres non nociceptives. Lorsqu'il reçoit les messages non nociceptifs, il inactive les neurones convergents et induit le blocage de la transmission en cours des messages nociceptifs ou non nociceptifs (figure 8b). Au niveau de la moelle épinière, les champs excitateur et inhibiteur de deux neurones convergents se recouvrent

³ On l'appelle ainsi car elle est induite par l'activation de certains neurones spinaux.

Figure 6. Modulation activatrice de la transmission synaptique des messages nociceptifs.

L'activation de la transmission synaptique des messages nociceptifs est liée à une augmentation de la concentration calcique cytoplasmique des neurones présynaptiques (nocicepteurs ou neurones spinaux). L'entrée massive de calcium dans ces neurones est permise par le maintien de l'ouverture des canaux calciques voltage-dépendants (CC) localisés sur la membrane de ces neurones. Ces CC sont couplés à des récepteurs pronociceptifs (RP) sur lesquels se lient spécifiquement des molécules pronociceptives. C'est la liaison entre les molécules pronociceptives (prostagnoïdes, sérotonine et ATP) et leur RP spécifique (EP, 5-HT₃ et P2X) qui induit le maintien de l'ouverture des CC. La conséquence de l'entrée massive de calcium dans les neurones présynaptiques est le relargage massif du glutamate (Glu) qui permet la transmission synaptique des messages nociceptifs. Plus il y aura de glutamate libéré, plus les neurones postsynaptiques (neurones spinaux ou supra-spinaux) recevront de messages nociceptifs et pourront en transmettre.



(figure 8c). Ceci implique que des messages non nociceptifs peuvent activer un neurone convergent (en excitant son champ activateur) tout en inactivant son voisin (en excitant son champ inhibiteur). Cette modulation explique comment le massage ou le frottement d'une zone douloureuse peut soulager une douleur.

c) Modulation supra-segmentaire

La modulation supra-segmentaire⁴ est une inhibition de la transmission spinale et supra-spinale des messages nociceptifs (cf. 2.2.a) par l'activation de certaines structures cérébrales (Calvino et Grilo 2006) comme la substance grise péri-aqueducule mésentencéphalique. Ces structures, lorsqu'elles sont activées par un message nociceptif, libèrent des molécules anti-nociceptives, comme la sérotonine et les opioïdes endogènes qui atténuent et/ou bloquent la transmission synaptique des messages nociceptifs (cf. 2.2.a) passant par la voie pontomésentencéphalique (cf. 1.3). Cette modu-

lation est généralement induite lorsque les structures cérébrales reçoivent les premiers messages nociceptifs. Elle est renforcée lorsque ces mêmes structures reçoivent de nouveaux messages nociceptifs (Guirimand et Le Bars 1996, Le Bars et Willer 2004). Cette modulation permet à une douleur secondaire de masquer la première douleur perçue, même si cette douleur secondaire est de plus faible amplitude. Elle est à la base de la thérapie antalgique par acupuncture (Plas 2011).

3 / Processus neurophysiologiques qui accompagnent une douleur

Les mécanismes conduisant à l'apparition d'une douleur chez l'animal peuvent être associés à différents processus neurophysiologiques : l'inflammation, l'activation du système nerveux autonome et l'activation des systèmes neuroendo-

criniens (Jacque et Thurin 2002, Le Bars et Willer 2004, Serratrice et Verschueren 2005). Ces processus sont connus pour jouer un rôle dans la réparation des tissus, l'accompagnement des réactions comportementales liées à la douleur et la modulation de la douleur ressentie *via* la modulation de la transmission des messages nociceptifs. Ils font ainsi partie de la réponse à des stimulations nociceptives et c'est à ce titre qu'ils sont présentés dans cette partie.

3.1 / Inflammation

L'inflammation mise en place lorsqu'un animal est blessé permet aux tissus endommagés de cicatrifier (Opal et DePalo 2000, Sitbon *et al* 2014).

Elle est initiée par la bradykinine libérée par les tissus endommagés (Kidd et Urban 2001, Le Bars et Adam 2002). Cette molécule stimule les cellules immunitaires (lymphocytes, monocytes, macrophages) qui libèrent à la fois des cytokines (pro-inflammatoires TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-8 ; anti-inflammatoires IL-4, IL-10, IL-12, IL-13 ; mixtes IL-6) et des neurotrophines NGF (*Nerve Growth Factor*). La bradykinine induit également la production d'acide arachidonique, la libération d'oxyde nitrique (substance impliquée dans le stress oxydant) par les cellules non spécialisées et la libération d'histamine et de sérotonine par les mastocytes.

Ces différents processus biochimiques sont en fortes interactions. Les cytokines pro-inflammatoires activent la synthèse de prostanoïdes (prostaglandine PGE2 et prostacycline PGI2) à partir de l'acide arachidonique produit par les cellules non spécialisées. Une fois synthétisés, ces prostanoïdes permettent aux lymphocytes de se multiplier et/ou de migrer vers la lésion tissulaire. Les prostanoïdes aident aussi les cytokines à ajuster les processus de l'inflammation pour parvenir à une cicatrisation optimale des tissus endommagés (Opal et DePalo 2000, Sitbon *et al* 2014). Cette inflammation peut néanmoins devenir neurogène si la libération de ces différentes substances inflammatoires induit une libération de substance P par les nocicepteurs en les sensibilisant (cf. 2.1.a).

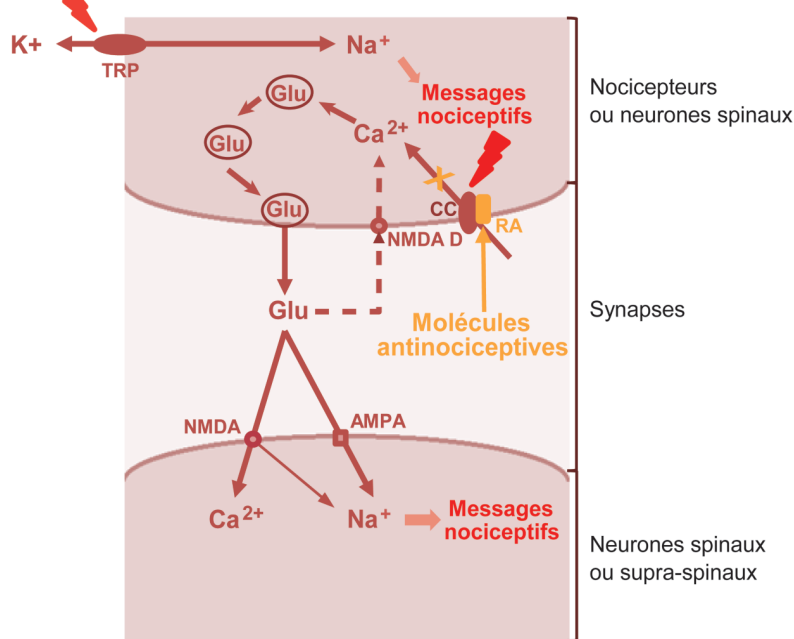
Au cours de l'inflammation, les monocytes et les lymphocytes libèrent également de la pro-enképhaline (Lefebvre *et al* 2000). Cette molécule est transportée vers ses cellules cibles (neurones supra-spinaux impliqués dans la transmission des messages nociceptifs) où elle est transformée en enképhalines. Les

⁴ On l'appelle ainsi car elle est induite par l'activation de neurones supra-spinaux localisés dans différentes parties du tronc cérébral ou du cerveau de l'animal.

Figure 7. Modulation inhibitrice de la transmission synaptique des messages nociceptifs

L'inhibition de la transmission synaptique des messages nociceptifs est liée à une diminution de la concentration calcique cytoplasmique des neurones présynaptiques (nocicepteurs ou neurones spinaux). La limitation de l'entrée de calcium dans ces neurones est permise par la fermeture de certains canaux calciques voltage-dépendants (CC) localisés sur la membrane de ces neurones. Ces CC sont couplés à des récepteurs anti-nociceptifs (RA) sur lesquels se lient spécifiquement des molécules anti-nociceptives. C'est la liaison entre les molécules anti-nociceptives (acide gamma amino butyrique (GABA), noradrénaline, sérotonine et opioïdes) et leur récepteur anti-nociceptif (RA) spécifique ($GABA_{A,B}$, α_2 , $5-HT_{1A,1B}$ et μ, δ et κ) qui induit la fermeture des CC. La conséquence de la diminution de la concentration calcique cytoplasmique dans les neurones présynaptiques est la diminution du relargage du glutamate (Glu) qui permet la transmission synaptique des messages nociceptifs. Moins il y aura de glutamate libéré, moins les neurones postsynaptiques (neurones spinaux ou supra-spinaux) recevront de messages nociceptifs et pourront en transmettre.

Stimulations
nociceptives



enképhalines sont des opioïdes endogènes qui inhibent la transmission des messages nociceptifs au niveau spinal et supra-spinal (cf. 2.2.a). En plus de ces effets directs sur la modulation des messages nociceptifs, les substances inflammatoires agissent également *via* l'activation du système nerveux autonome (cf. 3.2) et la sur-activation des systèmes neuroendocriniens (cf. 3.3) (Jacque et Thurin 2002, Serratrice et Verschueren 2005).

3.2 / Activation du système nerveux autonome

Le système nerveux autonome contrôle le fonctionnement de différents organes (yeux, cœur, bronches, viscères) (Serratrice et Verschueren 2005). Il est constitué du système nerveux sympathique dont le neurotransmetteur est la noradrénaline, et du système nerveux parasympathique dont le neurotransmetteur est l'acétylcholine. La glande médullosurrénale fait partie du système nerveux sympathique et son activation résulte en une libération

d'adrénaline. L'adrénaline et la noradrénaline stimulent les fonctions permettant des efforts physiques accrus (activités respiratoire et cardiaque, métabolisme). L'acétylcholine, quant à elle, ralentit ces fonctions et stimule l'activité digestive. Cette double régulation (activatrice et inhibitrice) permet de maintenir une homéostasie indispensable à la survie des animaux.

Les nombreuses substances libérées en réaction à une stimulation nociceptive (ATP, substance P, sérotonine, histamine, neurotrophines, ACTH et glucocorticoïdes) (cf. 1, 3.1 et 3.3) peuvent activer le système nerveux sympathique, permettant un ajustement des réponses comportementales à la situation (Prunier *et al* 2013).

Au cours de cette activation du système nerveux sympathique, la noradrénaline libérée au niveau spinal et supra-spinal a un effet antalgique *via* une inhibition de la transmission des messages nociceptifs (cf. 2.2.a). La glande médullo-

surrénale est aussi activée ce qui permet la libération d'adrénaline et de pro-enképhaline (Serratrice et Verschueren 2005, Atindehou 2012). La libération d'adrénaline renforce les effets du système nerveux sympathique sur les différents organes (dilatation pupillaire, tachycardie, broncho-dilatation et production de nutriments énergétiques notamment par le foie) (Serratrice et Verschueren 2005). La pro-enképhaline libérée par la glande médullosurrénale comme la pro-enképhaline libérée par les cellules immunitaires est transportée vers ses cellules cibles (neurones supra-spinaux) où elle est transformée en enképhaline. Ces molécules ont un effet antalgique en inhibant la transmission des messages nociceptifs aux niveaux spinal et supra-spinal (figure 7, cf. 2.2.a).

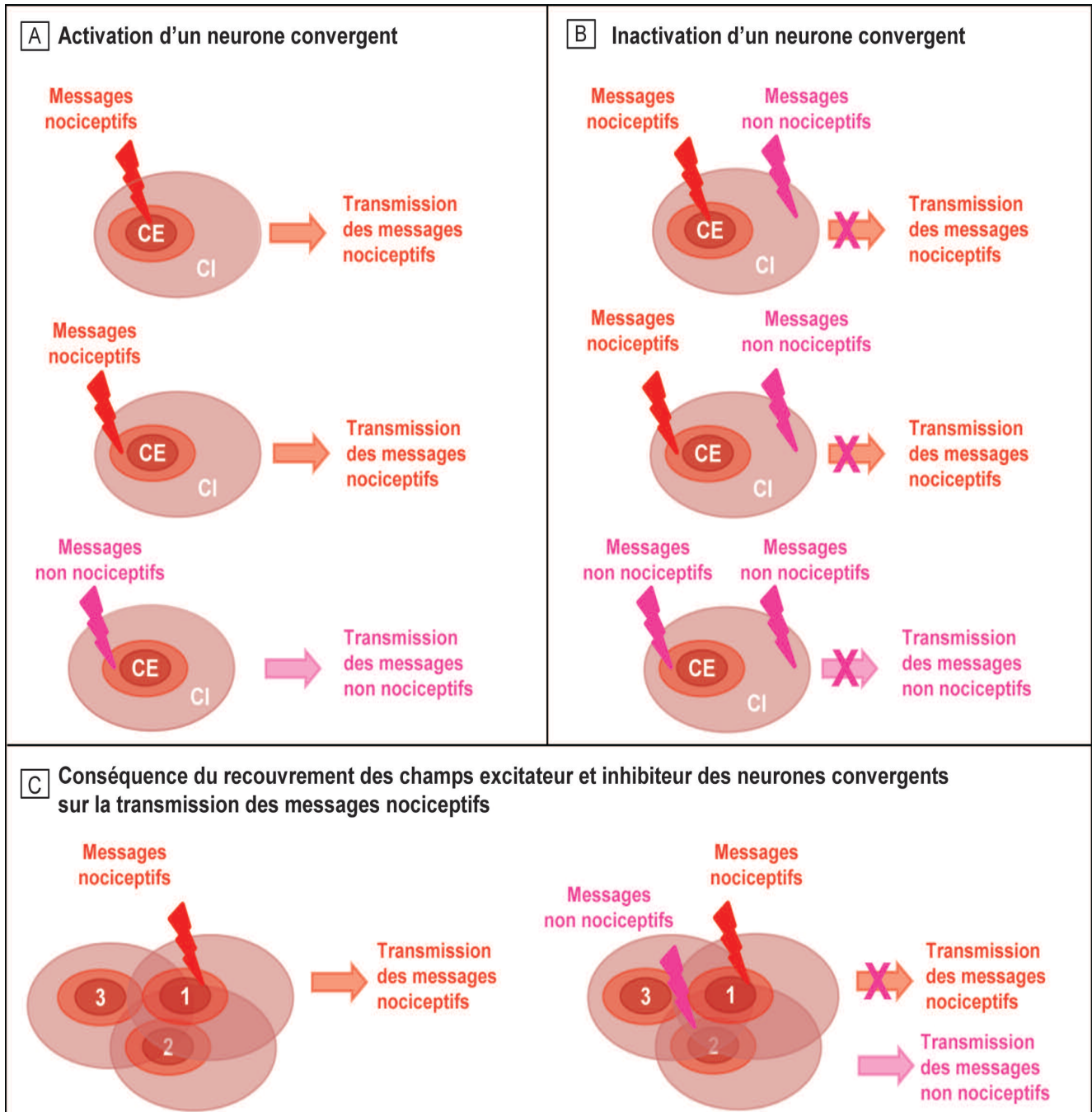
3.3 / Activation du système neuro-endocrinien

Le système neuroendocrinien est constitué de l'hypothalamus, de l'hypophyse antérieure et de la glande corticosurrénale (Honour 1994).

L'hypothalamus est directement activé par les messages nociceptifs (cf. 1). Lorsqu'il est actif, son noyau paraventriculaire libère de la « Corticotropin Releasing Hormone ». Cette hormone agit au niveau de l'hypophyse antérieure sur la maturation de la POMC (Pro-OpioMélano Cortine). Cette substance est alors clivée en plusieurs molécules dont l'ACTH et la β -endorphine (Tranchand-Bunel *et al* 1987, Lefebvre *et al* 2000).

L'ACTH ainsi synthétisée dans l'hypophyse antérieure est libérée dans le sang et transportée vers la glande corticosurrénale, stimulant la production et la libération de glucocorticoïdes tels que le cortisol (Coursin et Wood 2002). Ces glucocorticoïdes sur-activent la glande médullosurrénale entraînant ainsi un effet antalgique (cf. 3.2). Ils ont aussi un rôle anti-inflammatoire puisqu'ils inhibent la production des cytokines pro-inflammatoires et des prostanoïdes tout en activant la production des cytokines anti-inflammatoires (Chrousos 1995, Jacque et Thurin 2002). Ce rôle anti-inflammatoire permet un contrôle de l'inflammation et une cicatrisation optimale des tissus endommagés.

Quant à la β -endorphine, elle est libérée au niveau central dans la moelle épinière et dans les structures supra-spinales qui transmettent les messages nociceptifs (Le Bars et Willer 2004). La β -endorphine est un opioïde endogène qui inhibe la transmission spinale et supra-spinale des messages nociceptifs (cf. 2.2.a). Ceci permet un soulagement de la douleur pouvant être ressentie par l'animal (encadré 5).

Figure 8. Propriétés des neurones spinaux convergents.

Le corps cellulaire des neurones convergents possède deux champs récepteurs, l'un excitateur (CE) et l'autre inhibiteur (CI).

A) L'activation des neurones convergents peut être induite par des messages nociceptifs transmis par les nocicepteurs ou par des messages non nociceptifs transmis par les neurones sensitifs. Le centre du CE des neurones convergents (en rouge foncé) est activé lorsqu'il reçoit des messages nociceptifs tandis que la périphérie du CE (en rouge clair) peut être activée par des messages nociceptifs ou non nociceptifs à condition qu'ils soient de forte intensité. L'activation des neurones convergents permet la transmission des messages nociceptifs ou non nociceptifs que ces neurones ont reçus à des neurones supra-spinaux localisés dans le tronc cérébral et le cerveau de l'animal.

B) L'inactivation des neurones convergents n'est induite que par des messages non nociceptifs transmis par les neurones sensitifs, surtout lorsque ces messages nerveux sont appliqués de manière rapide et répétitive. Le CI des neurones convergents est activé lorsqu'il reçoit ces messages nerveux ce qui inactive ces neurones. Cette inactivation des neurones convergents bloque la transmission de tous les messages nerveux que ces neurones transmettaient aux neurones supra-spinaux.

C) Lorsque l'on fait une coupe de moelle épinière, on observe un recouvrement des CE et CI de différents neurones convergents. Par exemple sur le schéma, les champs excitateur et inhibiteur des neurones 1, 2 et 3 se recouvrent. Si le neurone 1 reçoit des messages nociceptifs au niveau de son CE, il les transmet à des neurones supra-spinaux. Si au même moment, un message non nociceptif de forte intensité arrive au niveau du CE périphérique du neurone 2, il sera transmis aux neurones supra-spinaux en priorité puisqu'il aura inactivé le neurone 1 en activant son CI. Les messages nociceptifs ne seront donc pas transmis aux neurones supra-spinaux et ne pourront pas être traités par la matrice douleur.

Encadré 5. Processus neurophysiologiques qui accompagnent une douleur : l'essentiel.

Les processus neurophysiologiques qui accompagnent une douleur et la modulent sont l'inflammation, l'activation du système nerveux autonome et celle du système neuroendocrinien.

L'inflammation est un processus mis en place dès lors qu'un tissu est endommagé. Cet endommagement des tissus de l'animal induit la libération en cascade de plusieurs substances nécessaires à leur cicatrisation rapide et contrôlée. Ces substances ont également un rôle dans la modulation de la transmission des messages nociceptifs puisqu'elles peuvent activer et sensibiliser les nocicepteurs à l'origine de ces messages. L'amplification de cette transmission conduit à une sur-activation du système nerveux autonome et du système neuroendocrinien entraînant ainsi une libération de substances anti-nociceptives endogènes (noradrénaline, enképhalines et β -endorphine). Elle peut aussi induire un soulagement direct de la douleur en produisant le précurseur des enképhalines.

Le système nerveux autonome est constitué du système nerveux sympathique et du système parasympathique. Il est activé par les structures cérébrales qui reçoivent les messages nociceptifs (telle que la formation réticulée), mais aussi par les substances inflammatoires et neuroendocriniennes libérées lors du processus douloureux. Quand un animal est soumis à une douleur, les neurones de son système nerveux sympathique libèrent de la noradrénaline (un neurotransmetteur qui peut avoir une action anti-nociceptive), la glande médullosurrénale activée par ces neurones produit et libère le précurseur des enképhalines, et prépare l'organisme à réagir à la situation (induction d'une tachycardie et d'une broncho-dilatation, production d'énergie...). La libération des substances anti-nociceptives endogènes (noradrénaline et enképhalines) par le système nerveux autonome permet un soulagement de la douleur ressentie par l'animal.

Le système neuroendocrinien est activé par les messages nociceptifs arrivant au niveau de l'hypothalamus. Ce système est constitué de l'hypothalamus, de l'hypophyse antérieure et de la glande corticosurrénale. Lorsque l'hypothalamus est activé en réponse aux stimulations nociceptives, il induit la libération de glucocorticoïdes par la glande corticosurrénale et celle d'une substance anti-nociceptive endogène, la β -endorphine, par l'hypophyse antérieure. La libération des glucocorticoïdes renforce l'activation de la glande médullosurrénale par le système nerveux sympathique et a un effet anti-inflammatoire. La libération de β -endorphine permet un soulagement de la douleur ressentie par l'animal.

Conclusion

Cette synthèse bibliographique montre la multiplicité et la complexité des mécanismes impliqués dans l'induction et la modulation de la douleur. En réponse à des stimulations nociceptives, des messages nerveux dits nociceptifs sont créés et transmis *via* la moelle épinière au cerveau où l'information est traitée. L'animal ressent une douleur si l'information que son cerveau reçoit lui permet de générer une sensation et de l'associer à une émotion négative. Associés aux processus de

transmission et d'intégration des messages nociceptifs, de nombreux mécanismes en interaction modulent la transmission des messages pour aboutir à la douleur ressentie. Que ce soient les mécanismes impliqués dans l'induction ou ceux intervenant dans la modulation de la douleur, ils sont généralement accompagnés par des réactions neurophysiologiques impliquées dans la réparation des tissus, la transmission de la douleur et les réactions comportementales associées. La douleur est une notion subjective, qui dépend de composantes à la fois sensorielle et émotionnelle. Malgré tout, ce

n'est qu'au prix d'une meilleure connaissance et d'une meilleure prise en compte de la complexité des mécanismes liés à la douleur, que l'on parviendra à mettre en place une véritable gestion intégrée des douleurs chez les animaux de rente, dans laquelle praticiens et éleveurs pourront intervenir de manière partagée.

Remerciements

Cette synthèse bibliographique a bénéficié d'un financement de l'Interprofession Bovine (INTERBEV).

Références

- Apkarian A.V., Bushnell M.C., Treede R.D., Zubieta J.K., 2005. Human brain mechanisms of pain perception and regulation in health and disease. *Eur. J. Pain*, 9, 463-484.
- Atindehou M.M., 2012. Caractérisation structurale et biologique de nouveaux agents antibactériens naturels actifs dans les infections intestinales : des peptides de la chromogranine A et des principes actifs de *Chromolaena odorata*. Thèse doctorale, Université de Strasbourg et d'Abimey-Calavi, France, 421p.
- Basbaum A.I., Bautista M., Scherrer G., Julius D., 2009. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell*, 139, 267-284.
- Bushnell M.C., Ceko M., Low L.A., 2013. Cognitive and emotional control of pain and its disruption in chronic pain. *Nat. Rev. Neurosci.*, 14, 502-511.
- Calvino B., Grilo R.M., 2006. Le contrôle central de la douleur. *Rev. du Rhum.*, 73, 10-18.
- Chatterjea D., Martinov T., 2015. Mast cells: versatile gatekeepers of pain. *Mol. Immunol.*, 63, 38-44.
- Chrousos G.P., 1995. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation. *New Eng. J. Med.*, 332, 1351-1363.
- Coursin D.B., Wood K.E., 2002. Corticosteroid supplementation for adrenal insufficiency. *JAMA*, 287, 236-240.
- Faure M., Paulmier V., De Boyer Des Roches A., Boissy A., Terlouw C., Guatteo R., Cognie J., Courteix C., Durand D., 2015. Douleurs animales. 2. Evaluation et traitement de la douleur chez les ruminants. *INRA Prod. Anim.*, 28, 231-242.
- Guirimand F., Le Bars D., 1996. Physiologie de la nociception. *Ann. Fr. Anesth. Reanim.*, 15, 1048-1079.
- Honour J.W., 1994. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Respir. Med.*, 88, 9-15.
- Jacque C., Thurin J.M., 2002. Stress, immunité et physiologie du système nerveux. *Med. Sci.*, 18, 1160-1166.
- Julius D., 2013. TRP channels and pain. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 29, 355-384.
- Julius D., Basbaum A.I., 2001. Molecular mechanisms of nociception. *Nature*, 413, 203-210.
- Kidd B.L., Urban L.A., 2001. Mechanisms of inflammatory pain. *Br. J. Anaesth.*, 87, 3-11.
- Kim J., Shin J., Oh J.H., Jung H.H., Kim Y.B., Cho Z.H., Chang J.W., 2015. Longitudinal

FDG microPET imaging of neuropathic pain: does cerebellar activity correlate with neuropathic pain development in a rat model ? *Acta Neurochir.*, 1-7.

Le Bars D., Adam F., 2002. Nocicepteurs et médiateurs dans la douleur aiguë inflammatoire. *Ann. Fr. Anesth. Reanim.*, 21, 315-335.

Le Bars D., Willer J.C., 2004. Physiologie de la douleur. *EMC-Anesth. Reanim.*, 1, 227-266.

Lefebvre C., Tasiemski A., Salzert M., 2000. Peptides opioïdes, substances opiacées et réponse immunitaire. *Med. Sci.*, 16, 235-242.

Meunier A., Braz J., Cesselin F., Hamon M., Pohl M., 2004. Inflammation et douleur : thérapie génique expérimentale. *Med. Sci.*, 20, 325-330.

Millan M.J., 1999. The induction of pain: an integrative review. *Prog. In Neurobiol.*, 57, 1-164.

Millan M.J., 2002. Descending control of pain. *Prog. Neurobiol.*, 66, 355-474.

Molony V., Kent J.E., 1997. Assessment of acute pain in farm animals using behavioral and physiological measurements. *J. Anim. Sci.*, 75, 266-272.

Mouraux A., Diukova A., Lee M.C., Wise R.G., Iannetti G.D., 2011. A multisensory investigation of the functional significance of the « pain matrix ». *NeuroImage*, 54, 2237-2249.

Opal S.M., DePalo V.A., 2000. Anti-inflammatory cytokines. *Chest J.*, 117, 1162-1172.

Peyron R., Laurent B., Garcia-Larrea L., 2000. Functional imaging of brain responses to pain. A review and meta-analysis. *Neurophysiol. Clin.*, 30, 263-288.

Plas A., 2011. Synthèse stéréosélective de bispindines : vers la conception de nouvelles molécules antalgiques. Thèse doctorale, Université Blaise Pascal Clermont-Ferrand II, France, 242p.

Ploner M., Freund H.J., Schnitzler A., 1999. Pain affect without pain sensation in a patient with a postcentral lesion. *Pain*, 81, 211-214.

Prunier A., Mounier L., Le Neindre P., Leterrier C., Mormède P., Paulmier V., Prunet P., Terlouw C., Guatteo R., 2013. Identifying and monitoring pain in farm animals: a review. *Anim.*, 7, 998-1010.

Rainville P., Duncan G.H., Price D.D., Carrier B., Bushnell C., 1997. Pain affect encoded in human anterior cingulate but not somatosensory cortex. *Science*, 277, 968-971.

Reynolds C., Engelhardt W., Leonhard-Marek S., Breves G., Giesecke D., 1995. Quantitative aspects of liver metabolism in ruminants. In *Ruminant physiology: digestion, metabolism, growth and reproduction*. *Proc. Int. Symp. Rum. Physiol.*, 351-371.

Serratrice G., Verschuere A., 2005. Système nerveux autonome. *EMC-Neurol.*, 2, 55-80.

Sitbon O., Savale L., Jaïs X., Montani D., Humbert M., Simonneau G., 2014. Traitement de l'hypertension artérielle pulmonaire. *La Presse Médicale.*, 43, 981-993.

Tranchand-Bunel D., Jégou S., Delbende C., Tonon M.C., Pelletier G., Vaudry H., 1987. La proopiomélanocortine et ses dérivés dans le système nerveux central. *Med. Sci.*, 3, 128-137.

Treede R-D., Kenshalo D.R., Gracely R.H., Jones A.K.P., 1999. The cortical representation of pain. *Pain*, 79, 105-111.

Wagh A., Grant A., 2004. Anatomie et physiologie normales et pathologiques. 9^{ème} Edition du Ross et Wilson. Maloine Editions, Paris, France, 484p.

Yee J.R., Kenkel W., Caccaviello J.C., Gamber K., Simmons P., Nedelman M., Kulkarni P., Ferris C.F., 2015. Identifying the integrated neural networks involved in capsaicin-induced pain using fMRI in awake TRPV1 knockout and wild-type rats. *Front. Syst. Neurosci.*, 9, 1-13.

Zamponi G.W., Lewis R.J., Todorovic S.M., Arneric S.P., Snutch T.P., 2009. Role of voltage-gated calcium channels in ascending pathways. *Brain Res. Rev.*, 60, 84-89.

Résumé

Qu'ils soient élevés à des fins commerciales ou expérimentales, les animaux de rente sont confrontés tout au long de leur vie à des pratiques potentiellement sources de douleurs : interventions de convenance et d'élevage (castration, écornage...) ; interventions chirurgicales (césariennes, implantation en chronique de cathéters...). L'élaboration d'outils d'évaluation des douleurs ressenties par les animaux et de traitements pharmacologiques nécessite une bonne connaissance des mécanismes impliqués dans l'apparition et la modulation de ces douleurs. L'objectif de cette revue est de rapporter les connaissances acquises au cours des dernières années qui ont de l'intérêt pour la gestion de la douleur des animaux d'élevage. Les connaissances présentées sont en grande partie issues d'études conduites chez les rongeurs dont les conclusions sont applicables aux animaux de rente. La revue est constituée de trois parties complémentaires. La première décrit les différentes étapes d'élaboration, de transmission et d'intégration sensorielle et émotionnelle des messages nociceptifs impliqués dans l'apparition de la douleur. La deuxième partie décrit les différents types de modulation qui peuvent activer ou inhiber la transmission des messages nociceptifs. La troisième partie décrit les différents processus neurophysiologiques qui accompagnent la douleur et peuvent la moduler (inflammation, activation du système nerveux autonome et du système neuroendocrinien).

Abstract

Animal pains. 1. Mechanisms

Whether bred for commercial or experimental purposes, farm animals are subjected, throughout their lives, to potentially painful practices: interventions for convenience or for livestock care (e.g. castration, dehorning) or surgery (e.g. caesarian section, implantations of permanent catheters). The development of tools to assess pain experienced by the animals and of pharmacological treatment requires good knowledge of the mechanisms involved in the onset and modulation of pain. The objective of our review is to report knowledge obtained in recent years that have an interest for pain management in livestock animals. The knowledge presented is largely derived from studies conducted on rodents and applicable to farm animals. Our review consists of three complementary parts. The first part describes the various stages of development, transmission and sensory and emotional integration of nociceptive messages involved in the onset of pain. The second part describes the different types of modulation that can activate or inhibit the transmission of nociceptive signals. The third part describes the neurophysiological processes that accompany pain and that can modulate it (inflammation, activation of the autonomic nervous system and neuroendocrine system).

PAULMIER V., FAURE M., DURAND D., BOISSY A., COGNIÉ J., ESCHALIER A., TERLOUW E.M.C., 2015. Douleurs animales. 1. Les mécanismes. *INRA Prod. Anim.*, 28, 217-230.

Annexe 2 : Publication N°2**Douleurs animales. 2. Evaluation et traitement de la douleur chez les ruminants**

M. Faure, V. Paulmier, A. de Boyer des Roches, A. Boissy, E.M.C. Terlouw, R., Guatteo, J. Cognié, C. Courteix, D.Durand

INRA Production Animales 2015, 28 (3), 231-242.

Les ruminants sont des animaux sensibles, doués de capacités émotionnelles et cognitives, pouvant être soumis à différents types de douleur (excès de nociception ou neuropathique) et ceci dans différents contextes (élevage ou expérimentation). L'évaluation de ces douleurs est souvent délicate car, dans la plupart des cas, il n'existe pas d'outil unique et spécifique mais plutôt un ensemble d'indicateurs dont les valeurs informatives sont complémentaires. Une évaluation adéquate de la douleur est essentielle afin d'optimiser sa prise en charge en utilisant au mieux l'arsenal thérapeutique actuellement à la disposition des prescripteurs. A travers cette synthèse, nous montrerons en quoi i) l'évaluation du type et du niveau de douleur est indispensable à une prise en charge optimale de la douleur, ii) une évaluation reposant sur une approche multiparamétrique est l'approche la plus adaptée à cet objectif.

Douleurs animales. 2. Evaluation et traitement de la douleur chez les ruminants

M. FAURE^{1,2}, V. PAULMIER^{1,2,4}, A. DE BOYER DES ROCHES^{3,1,2}, A. BOISSY^{1,2}, E.M.C. TERLOUW^{1,2},
R., GUATTEO^{5,6}, J. COGNIE^{7,8,9,10}, C. COURTEIX¹¹, D. DURAND^{1,2}

¹ INRA, UMR1213 Herbivores, F-63122 Saint-Genès-Champagnelle, France

² Clermont Université, VetAgroSup, UMR1213 Herbivores, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France

³ Université de Lyon, VetAgro Sup, UMR1213 Herbivores, F-69280, Marcy l'Etoile, France

⁴ ADIV, 10 rue Jacqueline Auriol – ZAC des Gravanches, F-63039 Clermont-Ferrand, France

⁵ INRA, UMR1300 BioEpAR, CS40706, F-44307 Nantes, France

⁶ LUNAM Université, Oniris, UMR BioEpAR, CS40706, F-44307 Nantes, France

⁷ INRA, UMR0085 PRC, F-37380 Nouzilly, France

⁸ CNRS, UMR7247 PRC, F-37380 Nouzilly, France

⁹ Université François Rabelais de Tours, UMR0085, F-37380 Nouzilly, France

¹⁰ IFCE, UMR0085 PRC, F-37380 Nouzilly, France

¹¹ Université d'Auvergne Clermont 1, Unité INSERM1107 Neuro-Dol, F63001 Clermont-Ferrand, France

Courriel : denys.durand@clermont.inra.fr

La douleur chez les animaux de rente, en situation expérimentale comme en élevage, doit être prise en charge pour des raisons réglementaires mais aussi éthiques. Afin d'optimiser cette prise en charge, il est indispensable de pouvoir évaluer le type et le niveau de douleur de la façon la plus précise possible.

Que ce soit en élevage ou en expérimentation, les animaux de rente sont exposés à de nombreuses sources de douleur liées à des maladies, des interventions chirurgicales ou des traumatismes accidentels. La douleur est définie, chez l'Homme, par l'« *International Association for the Study of Pain* » (IASP), comme une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable, associée à une lésion tissulaire réelle ou potentielle. La douleur comporte une composante sensori-discriminative (liée à la capacité de localiser et d'analyser la durée et l'intensité de la stimulation douloureuse), une composante émotionnelle (désignant la tonalité affective désagréable, plus ou moins supportable, et l'état d'anxiété qui accompagne la douleur) et une composante cognitive (faisant référence aux expériences passées et à la mémorisation). Il est clairement admis depuis de nombreuses années que les animaux sont des êtres sensibles, doués de capacités émotionnelles et cognitives (Boissy 2005). Les parlementaires ont tout récemment validé cette notion essentielle en adoptant un amendement dans le code civil reconnaissant les animaux comme des « êtres vivants doués de sensibilité » (amendement N° 59, article 515-14).

Rapportée aux animaux, la douleur peut se définir par « une expérience sensorielle et émotionnelle aversive, représentée par la conscience qu'il y a de la rupture ou de la menace de rupture de l'intégrité de ses tissus » (Molony et Kent 1997). L'homologie des structures nerveuses impliquées dans la perception de la douleur (cortex somesthésique impliqué dans la composante sensori-discriminative et système limbique impliqué dans la composante émotionnelle) entre les mammifères suggère très fortement que les mammifères non primates sont tous capables de ressentir une douleur (Le Neindre 2009). Dès lors que les interventions chirurgicales ou les pathologies chez les animaux de rente peuvent se révéler douloureuses, la douleur doit être prise en charge. Deux principes éthiques importants ont déjà été proposés aux expérimentateurs, praticiens et éleveurs pour limiter la douleur chez les animaux, qu'elle soit subie (maladies par exemple) ou imposée (interventions de convenance par exemple) :

- La règle des 3 R, applicable en expérimentation animale, vise à *remplacer* le modèle animal, *réduire* le nombre d'animaux ou *raffiner*, c'est-à-dire améliorer la méthodologie utilisée (Russell et Burch 1959 cités par Le Neindre *et al* 2009) ;

- La règle des 3 S applicable en élevage vise à *supprimer* les sources de douleur lorsqu'elles sont inutiles, à *substituer* les pratiques à l'origine de douleur par des pratiques moins douloureuses et, lorsqu'elles sont inévitables, *soulager* la douleur (Guatteo *et al* 2012).

Néanmoins, la prise en charge et le traitement de la douleur ne peuvent être optimaux que si la douleur est diagnostiquée précocement et si son intensité est correctement quantifiée, en tenant compte également de son étiologie, du ressenti de l'animal et du contexte. L'évaluation et la prise en charge de la douleur chez les ruminants deviennent des questions de plus en plus prégnantes en expérimentation animale et en médecine vétérinaire. Cependant, les chercheurs, les éleveurs et les vétérinaires, dans de nombreuses situations, ne disposent actuellement que de moyens limités, particulièrement chez les animaux de rente, pour :

- diagnostiquer le plus précocement possible une douleur après une chirurgie ou lors d'une maladie ;
- évaluer l'intensité douloureuse et l'efficacité d'un traitement analgésique.

La mise en place d'outils performants et simples pour détecter la douleur et évaluer son intensité permettrait de répondre aux besoins des professionnels (éleveurs, vétérinaires, chercheurs...), de répondre aux interrogations de l'opinion publique envers les douleurs animales ainsi qu'aux exigences de la réglementation quant à l'utilisation des animaux à des fins scientifiques (cf. revue bibliographique de Coetzee 2013). Des études récentes ont déjà permis d'identifier des indicateurs comportementaux, zootechniques et physiologiques qui permettraient d'identifier la présence voire d'évaluer l'intensité d'une douleur

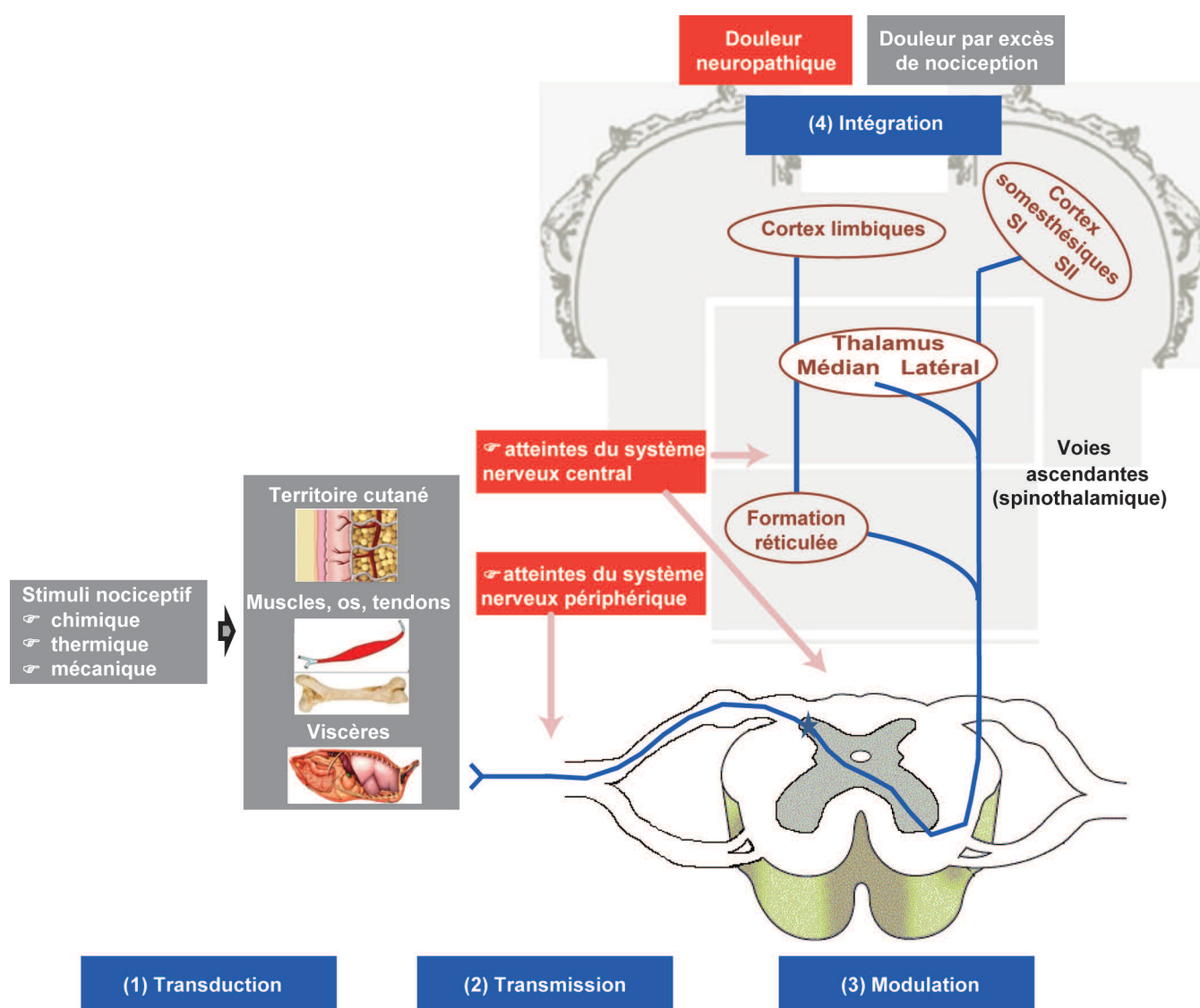
(cf. revue bibliographique de Prunier *et al* 2013). Néanmoins, aucune approche intégrée utilisant conjointement l'ensemble de ces indicateurs n'a été développée à ce jour. De plus, certains indicateurs sont inutilisables en pratique courante, et la sensibilité (Se) et la spécificité (Sp) des différents indicateurs potentiels ne sont pas toujours optimales. Une opportunité serait de combiner les indicateurs afin d'augmenter leur valeur informative. A travers cette synthèse, nous souhaitons montrer *i)* que l'évaluation du type et du niveau de douleur est indispensable à une prise en charge optimale de la douleur et *ii)* qu'une évaluation

reposant sur une approche multiparamétrique est la plus adaptée à notre objectif.

1 / Les différents types de douleur chez les ruminants

Au cours de leur vie les animaux peuvent présenter différents types de douleurs qui se distinguent, comme chez l'Homme, par leur physiopathologie, leur étiologie, leur durée d'évolution, leur intensité, mais aussi par leur localisation (tissus cutané, musculaire, viscères, système nerveux).

Figure 1. Représentation schématique des voies de la douleur (d'après Le Bars et Willer 2004 ; Meintjes *et al* 2012).



Un stimulus nociceptif (mécanique, thermique, chimique) va dans un premier temps être traduit en message nociceptif (1) puis sera transmis vers le Système Nerveux Central (2) où il sera modulé (activé ou inhibé) (3) et enfin il sera intégré comme douloureux ou non au niveau du cerveau (4).

Deux types de douleur peuvent être définis en fonction du mécanisme physiopathologique :

- La douleur par excès de nociception qui est provoquée par des stimuli (thermique, mécanique, chimique) appliqués au niveau des tissus somatiques (peau, tissu sous-cutané, muscle, os) et viscéraux ;
- La douleur neuropathique qui est provoquée, en partie, par des lésions du système somato-sensoriel.

1.1 / Douleur par excès de nociception

La douleur par excès de nociception est consécutive à l'activation de récepteurs spécifiques (les nocicepteurs périphériques) par des stimuli suffisamment intenses pour dépolariser la membrane neuronale et créer un Potentiel d'Action (PA). L'activation des nocicepteurs peut être déclenchée par des stimuli chimiques, mécaniques ou thermiques. Si les nocicepteurs appartiennent au tissu cutané, musculaire, articulaire ou osseux, on parlera de douleur somatique. S'ils sont localisés au niveau des zones thoracique, abdominale ou pelvienne, la douleur sera qualifiée de douleur viscérale (figure 1).

a) Douleur somatique

La douleur somatique peut être de type superficiel (atteinte des tissus cutanés) ou profond (atteinte des tissus musculaires, des articulations ou des os). Le message nociceptif élaboré au cours de douleur somatique sera transmis au système nerveux central par les fibres nerveuses A δ myélinisées et C amyéliniques (cf. revue bibliographique de Le Bars et Willer 2004).

En élevage, les douleurs somatiques peuvent être provoquées par des lésions tissulaires survenant au cours d'interventions chirurgicales ou de traumatismes accidentels, ou encore par des agents infectieux comme lors de pathologies induisant une réaction inflammatoire. Ainsi, des pratiques de convenance comme la caudectomie et la castration sont reconnues comme des procédures douloureuses liées à la lésion de tissus cutanés et musculaires (Molony et Kent 1997). D'autres procédures, telle que la césarienne, impliquent en plus de ces lésions, des tensions et des distensions des organes pelviens pouvant générer également des douleurs viscérales. Les blessures et les infections sont également des sources de douleurs somatiques, mettant en jeu un processus inflammatoire, comme dans le cas des mammites (infections du canal du trayon de la mamelle de la vache) ou des boiteries (lésions au niveau de l'épiderme de l'espace interdigité ou osseuses, et/ou infection articulaire).

b) Douleur viscérale

La douleur viscérale est quasi-exclusivement véhiculée par les fibres C non myélinisées impliquant une conduction des messages nociceptifs plus lente que les fibres A δ (0,2 – 1 m/s vs 4 – 30 m/s) (cf. revue bibliographique de Giamberardino 2003). Ainsi, la douleur viscérale est perçue moins rapidement que la douleur somatique (cf. revue bibliographique de Le Bars et Willer 2004).

Encadré. Sensibilisation des zones amputées.

Chez l'Homme, l'amputation peut induire des réorganisations cérébrales importantes se traduisant par la perception de douleur au niveau d'un membre qui ne fait physiquement plus partie du corps, c'est ce que l'on appelle les douleurs fantômes. L'amputation peut également induire des douleurs au niveau du moignon en lien avec la formation de névrome (développement anormal des terminaisons nerveuses sectionnées) qui rendrait la zone hypersensible (Garcia-Larrea et Magnin 2008, Martinez et al 2010).

En élevage, les douleurs viscérales peuvent être déclenchées par des tensions, dilatations, distensions des organes creux mais également par des inflammations au niveau du tractus digestif, génital et de la sphère thoracique. Par exemple, chez les bovins, la dilatation induite par une accumulation de gaz et/ou de liquide dans un segment intestinal est à l'origine de douleurs viscérales fortes (Caillat 2008). D'autres situations conduisent à des distensions fortes comme les coliques ou les déplacements de caillette, incidents particulièrement fréquents chez les bovins laitiers après le vêlage, les distensions de cette partie de l'estomac s'accompagnant parfois de torsions (cf. revue bibliographique de Walker et al 2011). D'autres situations de douleurs viscérales sont décrites dans le cadre de processus inflammatoires au niveau *i)* du tractus génital comme dans le cas des métrites (inflammation de la paroi utérine causée par une infection bactérienne, fréquente chez les bovins), des césariennes souvent pratiquées chez les vaches de race à viande ou des ovariectomies (cf. revue bibliographique de Walker et al 2011), et *ii)* de la sphère thoracique comme lors de maladies respiratoires (Heegaard et al 2000).

1.2 / Douleur neuropathique

La douleur neuropathique est consécutive à une lésion ou à une maladie affectant le système somato-sensoriel. Sa sémiologie inclut des douleurs spontanées (continues ou paroxystiques) et évoquées par des stimulations nociceptives (hyperalgésie : stimulus douloureux provoquant une sensation amplifiée de la douleur) ou non nociceptives (allodynie : stimulus habituellement non douloureux provoquant des sensations douloureuses) (cf. revue bibliographique de Le Bars et Willer 2004) (figure 1).

Chez l'animal d'élevage, les principales causes de douleurs neuropathiques sont liées à des atteintes des systèmes nerveux périphérique ou central lors de chirurgies ou suite à des maladies neurologiques. Certaines interventions comme la caudectomie ou l'écornage, qui sont des pratiques courantes, induisent, en plus d'une douleur somatique, une douleur neuropathique. En effet, ces techniques

induisent des sections et des nécroses des tissus nerveux parfois associées à une formation de névrome responsable d'une sensibilisation à long terme des zones amputées (revues bibliographiques de Vinuela-Fernandez et al 2007 et de Sutherland et Tucker 2011, cf. encadré). Les maladies nerveuses peuvent avoir plusieurs étiologies. Elles peuvent être d'origine virale comme dans le cas de l'arthrite encéphalite caprine, bactérienne (cas de la listériose), toxique (cas de l'ingestion de certains végétaux ou minéraux), métabolique (carence en vitamine B1) ou parasitaire (cas de la coenurose). L'arthrite encéphalite, provoquée par un lentivirus fréquemment rencontré chez les caprins, conduit en plus d'une démyélinisation des axones ou une nécrose de la substance blanche de la moelle épinière, à une inflammation de la glande mammaire et des articulations pouvant évoluer en tétraplégie (Lamara et al 2013). L'herpès virus bovin 5 (BoHV-5) est un alpha-herpès virus responsable de méningo-encéphalite chez les jeunes bovins. Il infecte les cellules épithéliales et provoque une infection latente dans les ganglions des nerfs sensitifs à l'origine de maladies neurologiques. Quelques cas de cette maladie ont été signalés en Europe, aux États-Unis et en Australie, l'infection se limitant principalement à l'Amérique du Sud, notamment au Brésil et en Argentine (cf. revue bibliographique de Del Médico Zajac et al 2009).

Ainsi, comme chez l'Homme, les animaux de rente peuvent être exposés à différents types de douleur incluant les douleurs par excès de nociception et les douleurs neuropathiques, ce qui complique significativement l'identification exacte de la douleur et l'évaluation fine de son intensité.

2 / Evaluation de la douleur chez les ruminants : intérêts d'une approche multiparamétrique

Suite à la perception d'une douleur, plusieurs processus directs ou indirects, comme des modifications du comportement, de l'état physiologique (hormonal, électro-physiologique, métabolique,

inflammatoire, oxydatif) ou encore des performances zootechniques, vont permettre à l'animal de s'adapter¹. C'est en s'appuyant sur l'ensemble de ces modifications que la douleur sera la plus précisément évaluée chez l'animal de rente (cf. revue bibliographique de Prunier *et al* 2013) (figure 2).

2.1 / Processus d'adaptation : comportement et physiologie

Les modifications comportementales et physiologiques permettent à l'animal d'éviter ou de limiter la douleur et de réduire ses conséquences.

a) Adaptation visant à échapper à la source douloureuse

Lors de l'application d'un stimulus nociceptif, l'animal peut adopter des comportements automatiques de retraits et/ou se soustraire de la source de douleur en adoptant un comportement de défense et/ou d'évitement.

Les comportements automatiques de retraits dépendent d'arcs réflexes spinaux provoqués par les messages nociceptifs. Les comportements de défense et/ou

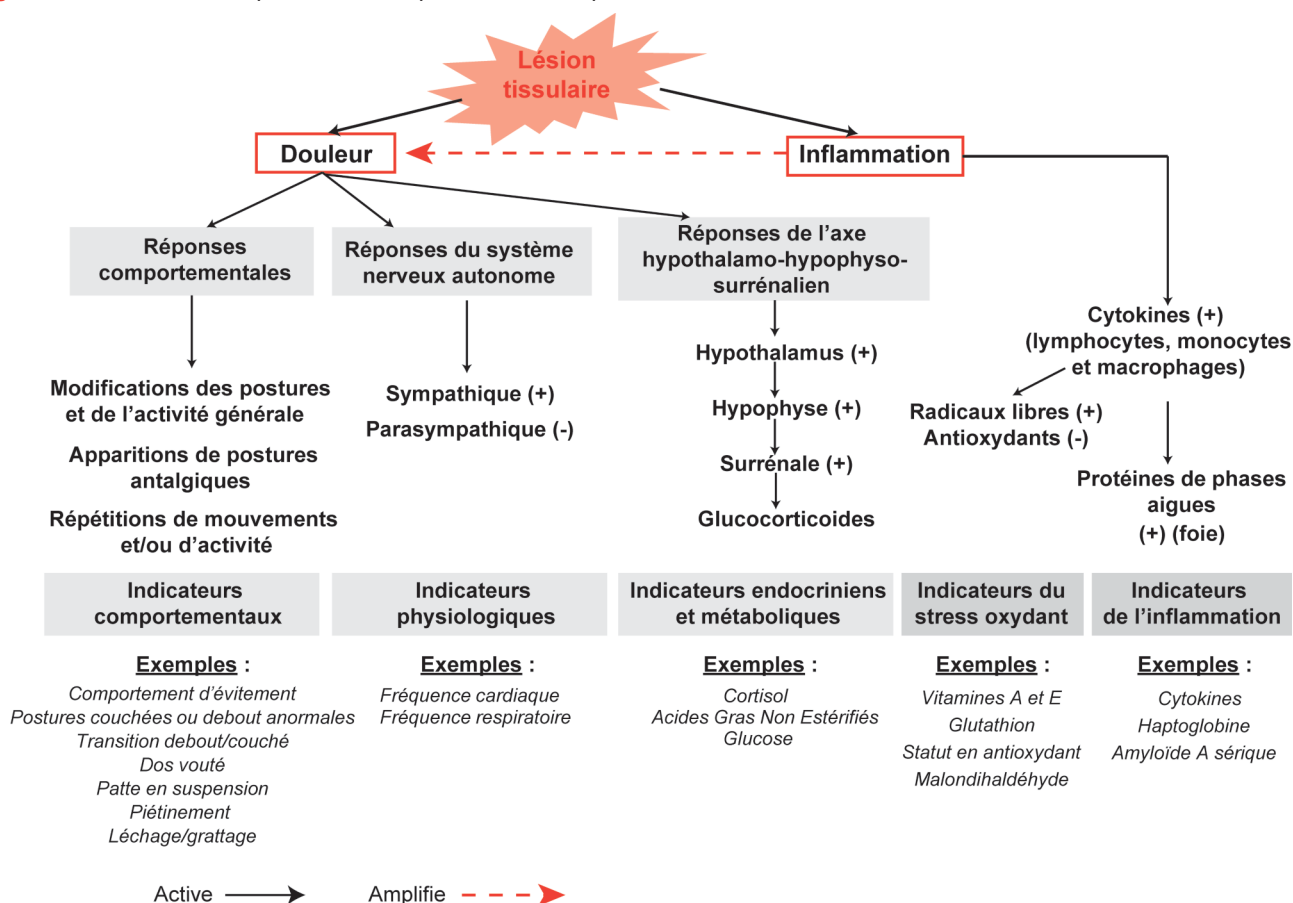
d'évitement sont induits par la perception d'une douleur intégrée au niveau des structures cérébrales. Pendant une castration, des veaux expriment des comportements de lutte, en donnant des coups de pieds et en vocalisant (revue bibliographique de Coetzee 2013). Ils sont également plus agités, piétinent et remuent fréquemment la queue : cela peut être considéré comme une tentative d'échappement au stimulus (Robertson *et al* 1994). Pendant une biopsie du foie effectuée avec une anesthésie locale mais sans analgésie, les vaches sont plus agitées et effectuent plus de mouvements de la tête (Mølgaard *et al* 2012). Néanmoins, ces comportements ne sont pas spécifiques de la douleur, ils peuvent également être observés lors d'évènement non douloureux comme lors de situations stressantes pour l'animal.

b) Adaptation visant à limiter la douleur

Dans les heures ou les jours qui suivent l'application du stimulus, l'animal modifie certaines activités générales et/ou adopte des postures/mouvements antalgiques (cf. revue bibliographique de Prunier *et al* 2013).

Concernant les modifications d'activités de l'animal, certains auteurs ont montré des modifications du budget temps après une intervention douloureuse. Par exemple, après une biopsie hépatique, les vaches passent plus de temps debout que les témoins (266 ± 137 s vs 168 ± 77 s) (Mølgaard *et al* 2012). Le 1^{er} jour suivant une césarienne réalisée uniquement sous anesthésie locale, sans prise en charge de la douleur post-opératoire, Kolkman *et al* (2010) montrent que les vaches changent plus souvent de posture debout/couchée ($5,5 \pm 2$ vs $3,7 \pm 0,9$) et passent plus de temps couchées ($80 \pm 32,4$ min vs $39,5 \pm 41,2$ min) que des vaches ayant vélé par voie naturelle. Les animaux peuvent également adopter des postures antalgiques. Par exemple, dans le cas de boiteries, les bovins voussent le dos, écartent leurs membres et reportent leur poids du corps sur les membres non douloureux (Yunta *et al* 2012). Les animaux qui ressentent une douleur peuvent répéter certains mouvements comme par exemple des comportements auto-dirigés tels que le léchage ou le grattage de la zone douloureuse. Sur une période d'une heure après une castration effectuée sans

Figure 2. Processus d'adaptation et de réparation mis en place chez l'animal suite à une lésion tissulaire.



¹ Adaptation à une douleur : ajustement de l'organisme en réponse à une douleur afin d'en atténuer les processus qui se traduisent par des modifications comportementales et physiologiques.

anesthésique ni analgésique, les agneaux se lèchent plus souvent la plaie que les agneaux non castrés (nombre de léchages : 1,8 vs 0) (Paull *et al* 2012). Les animaux peuvent également modifier leurs interactions sociales en s'isolant des congénères ou en devenant plus agressifs vis-à-vis de leurs congénères ou de l'Homme.

c) Adaptation physiologique

Les changements comportementaux sont associés à des modifications physiologiques. Le système nerveux autonome, sympathique et parasympathique, régule les fonctions des organes et de l'appareil circulatoire pour les adapter aux besoins immédiats. Les organes (cœur, poumons, viscères...) sont innervés par les fibres de ces deux systèmes qui jouent un rôle activateur ou inhibiteur assurant leur bon fonctionnement (Serratrice et Verschuere 2005). Une douleur, tout comme un stress émotionnel ou physique, peut induire une augmentation de l'activité du système nerveux sympathique, qui peut être mesurée par l'augmentation de la fréquence cardiaque et du taux de catécholamines chez les bovins pendant la castration. L'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien est également activé lors d'une situation douloureuse (revue de Prunier *et al* 2013). Son activation peut être évaluée par le dosage des glucocorticoïdes. Ainsi, le taux de cortisol plasmatique peut être multiplié par 11 après une castration par pose d'élastique chez des agneaux (Mellema *et al* 2006). Ces modifications physiologiques induisent des modifications métaboliques. En effet, la stimulation du système sympathique et de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien lors d'un événement douloureux, augmente la néoglucogenèse et le catabolisme protéique et lipidique modifiant les concentrations plasmatiques de glucose, de lactate et d'acides gras non estérifiés (Otto et Short 1998).

Cependant, ces indicateurs physiologiques sont sensibles, mais restent peu spécifiques car ils peuvent être exprimés aussi bien après un stress émotionnel ou physique qu'à la suite d'une douleur (cf. revue de Prunier *et al* 2013). Ils sont également difficilement utilisables sur le terrain.

2.2 / Processus de réparation après une agression : inflammation et stress oxydant

Suite à des situations douloureuses liées à des atteintes tissulaires aiguës ou

chroniques d'origine inflammatoire, lésionnelle ou infectieuse, l'organisme met en place des processus de réparation visant essentiellement à contrôler l'inflammation et à cicatrifier les tissus lésés. Ces processus incluent en particulier la production d'Espèces Réactives Oxygénées (ERO), de cytokines et d'autres médiateurs comme le facteur de coagulation et les protéines de la phase aiguë de l'inflammation. Toutes ces réponses peuvent être utilisées pour évaluer la présence et/ou l'intensité des atteintes tissulaires en question.

Ainsi, la réponse inflammatoire suite à une lésion comporte trois phases : une phase d'initiation permettant d'alerter l'organisme d'un danger en activant les nocicepteurs, une phase d'amplification à l'origine des phénomènes de sensibilisation périphérique et centrale et une phase de réparation permettant la cicatrification des tissus lésés. Au cours de la phase d'initiation, les cellules phagocytaires comme les macrophages libèrent des ERO permettant une action bactéricide locale. La production de ces radicaux oxygénés, dangereux pour l'organisme à forte concentration, est contrôlée par les antioxydants endogènes comme le glutathion. Le glutathion en passant de sa forme réduite (GSH) à sa forme oxydée (GSSG) stabilise les ERO. Ainsi, le rapport GSH/GSSG peut être considéré comme excellent indicateur indirect du processus inflammatoire (Gladine 2006). Au cours de la phase d'amplification, des cytokines anti-inflammatoires (interleukines 10, IL-10) et pro-inflammatoires (IL-1, -6 et -8, TNF α) agissent d'abord de façon paracrine au niveau du site inflammatoire, puis certaines cytokines comme l'IL-6 agissent au niveau du foie pour augmenter ou diminuer la production des protéines de phase aiguë (APP) synthétisées. Plus précisément, la synthèse des protéines de phase aiguë positive (APP+), comme par exemple l'haptoglobine ou l'amyloïde A sérique (SAA), est stimulée alors que la synthèse des protéines de phase aiguë négative (APP-), comme l'albumine, est diminuée lors d'une inflammation (Petersen *et al* 2004). L'haptoglobine ou la SAA exercent différentes fonctions dont des fonctions antioxydantes et de réparation tissulaire (cf. revue bibliographique de Humblet et Godeau 2005). L'haptoglobine est donc utilisée comme indicateur de l'inflammation permettant ainsi de mesurer la sévérité de la réponse inflammatoire chez les ruminants lors de pathologies ou après une chirurgie. Lors de pathologies respiratoires chez les bovins, les concentrations en haptoglobine sont corrélées à la sévérité des signes cliniques (Heegaard *et al* 2000). L'haptoglobine est également utilisée chez les bovins pour diagnostiquer les mammites et les métrites (Ohtsuka *et al* 2001, Murata

et al 2004, Petersen *et al* 2004). Dans un contexte chirurgical, comme par exemple après une castration chirurgicale chez des taurillons, la concentration en haptoglobine trois jours après l'intervention est neuf fois plus élevée que chez les animaux non opérés (Earley et Crowe 2002). Les cytokines sont également utilisées en tant que marqueurs directs du processus inflammatoire.

2.3 / Altération des performances zootechniques

La douleur peut également altérer les performances zootechniques des animaux. En effet, la douleur, comme le stress émotionnel, peut induire des modifications comportementales (diminution de l'appétit) et physiologiques (stimulation du système sympathique et de l'axe corticotrope) modifiant ainsi le métabolisme des animaux (augmentation de la mobilisation des réserves, modification de la partition des nutriments entre les différents tissus...), cette cascade d'événements entraînant une altération des performances zootechniques. Les modifications comportementales et physiologiques peuvent, par exemple, induire une baisse de la production laitière, une diminution du gain de poids (Gain Moyen Quotidien = GMQ) ou encore une réduction des performances de reproduction (cf. revue bibliographique de Le Neindre *et al* 2009). Différentes pathologies, comme les métrites ou les boiteries ont été associées à des retards de reproduction allant de 6 à 30 jours (Fourichon *et al* 2000). La production laitière est également diminuée (de 0,3 à 2,5 kg/jour) par certaines pathologies comme les boiteries ou les déplacements de caillotte (Fourichon *et al* 1999). Les périodes de vèlages, et particulièrement les vèlages difficiles, induisent une diminution de la production laitière (cf. revue bibliographique de Mainau et Manteca 2011). Ainsi, l'altération des performances zootechniques peut être utilisée pour détecter une douleur, néanmoins c'est un indicateur peu sensible pouvant apparaître tardivement par rapport à l'apparition d'une douleur. Il est également peu spécifique car un stress émotionnel peut également entraîner les mêmes effets (revue de Le Neindre *et al* 2009). Des études ont montré que la prise en charge de la douleur permettait de limiter les altérations des performances zootechniques. Par exemple, l'application d'un traitement antalgique (anesthésie locale et/ou une analgésie) lors de castration chez le veau limitait significativement la chute du GMQ comparativement à une castration sans prise en charge de la douleur (Earley et Crowe 2002).

En résumé, l'ensemble des réponses décrites précédemment (processus d'adaptation et de réparation, altération

des performances) peut être utilisé comme indicateurs de douleur chez l'animal de rente. L'utilisation de marqueurs de l'activation du système sympathique et de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien comme seuls indicateurs de douleur pose un problème d'interprétation car ces systèmes peuvent également être activés par un stress émotionnel seul voire même par une activité physique importante. Ces indicateurs sont non spécifiques et doivent être évalués en fonction du contexte potentiellement générateur de douleur ou non. Les indicateurs comportementaux sont largement utilisés dans l'évaluation de la douleur animale parce qu'ils sont facilement utilisables sur le terrain, peu coûteux et sensibles. Néanmoins les postures antalgiques semblent être les plus spécifiques d'une douleur. Les indicateurs zootechniques sont peu sensibles, non spécifiques, et souvent tardifs par rapport à l'émergence de la douleur. Ainsi, comme nous venons de le voir, l'évaluation de la douleur chez l'animal ne peut pas être appréhendée à partir d'un seul indica-

teur, mais plutôt à partir d'un ensemble d'indicateurs mis en jeu dans les différentes réponses à un processus douloureux. Il apparaît donc évident que cette combinaison d'indicateur est nécessaire pour discriminer le type et le niveau de douleur, ces éléments étant primordiaux pour établir un protocole analgésique approprié, thème que nous allons développer dans la partie suivante.

3 / Traiter la douleur chez les ruminants : modalités et intérêts d'une prise en charge optimale

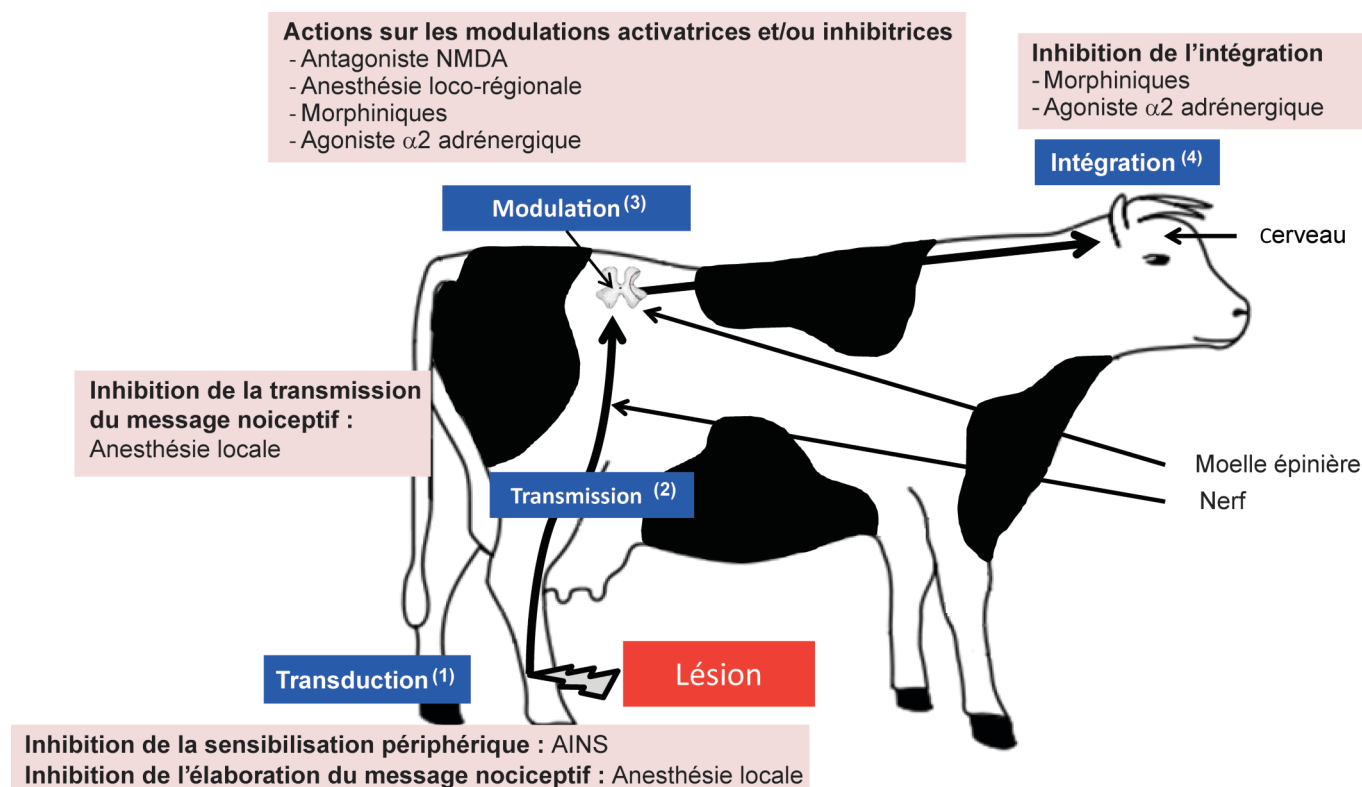
Le choix du protocole médicamenteux doit tenir compte de l'étiologie de la douleur, de son intensité, mais aussi du contexte dans lequel se trouve l'animal (stade physiologique, conditions d'hébergement...). Ainsi, il est important de connaître précisément les mécanismes d'action des médicaments utilisables en pharmacie vétérinaire. Après

avoir rapporté les mécanismes d'action des principales molécules thérapeutiques utilisables chez les ruminants, nous montrerons le bénéfice qu'il y a à réaliser une analgésie multimodale.

3.1 / Anesthésiques et analgésiques disponibles chez les ruminants

Les molécules disponibles chez les ruminants appartiennent à trois grandes classes : les anesthésiques (locaux ou dissociatifs), les analgésiques (compré- nant les anti-inflammatoires non stéroïdiens et les morphiniques) et les sédatifs analgésiques (comme les alpha 2-agonistes) (cf. revues bibliographiques de Boreve 2010 et de Meintjes 2012). Ces molécules se distinguent par leurs mécanismes d'action : les anesthésiques agissent au niveau de l'élaboration et de la transmission du message nociceptif alors que les analgésiques et sédatifs agissent au niveau de la modulation et au niveau de l'intégration du message nociceptif (figure 3).

Figure 3. Principes et cibles d'action des différentes familles de molécules anesthésiques et analgésiques disponibles dans la pharmacopée vétérinaire.



(1,2) Système nerveux périphérique

(3,4) Système nerveux central

Suite à une lésion (au niveau de la patte par exemple), le message nociceptif est élaboré et transmis de la périphérie jusqu'aux structures supra-spinales grâce à 4 processus physiologiques : la transduction, la transmission, la modulation et l'intégration. Au niveau du système nerveux périphérique, les anesthésiques locaux et les Anti-Inflammatoires Non Stéroïdiens (AINS) permettent de limiter les processus de transduction et de transmission. Au niveau du système nerveux central, les morphiniques, les agonistes $\alpha 2$ -AD, les bloqueurs de canaux sodiques et les antagonistes du N-Méthyl-D-Aspartate (NMDA) s'opposent à la transmission et à l'intégration du message nociceptif.

a) Molécules agissant sur l'élaboration et la transmission des messages nociceptifs : les anesthésiques locaux

Les anesthésiques locaux, en bloquant les canaux sodiques, s'opposent aux décharges d'activité neuronale ectopique, au niveau périphérique. L'anesthésique est soit déposé à la surface de la zone cutanée, soit injecté par voie sous-cutanée ou intramusculaire. Il permet d'insensibiliser les nocicepteurs, l'anesthésie est dite locale. L'anesthésique peut également être injecté en amont de la zone à anesthésier, bloquant la transmission du message nociceptif jusqu'à la moelle épinière, l'anesthésie est dite régionale ou loco-régionale (Holopherne et Guatteo 2008). Chez les ruminants, la procaine est une molécule bénéficiant d'une Autorisation de Mise sur le Marché (AMM). Elle est utilisée en préopératoire dans des situations de chirurgie de terrain comme la castration ou la césarienne. Peu d'effets secondaires ont été rapportés hormis une toxicité si une dose trop importante est administrée (cf. revue bibliographique de Valverde 2005).

b) Molécules agissant sur la modulation activatrice des messages nociceptifs : anti-inflammatoires non stéroïdiens et antagonistes des récepteurs au N-méthyl-D-aspartate

L'activation exagérée et l'abaissement du seuil d'activation des nocicepteurs par des facteurs algogènes et/ou sensibilisants (prostaglandines, histamine, substance P, protons (H^+), sérotonine, bradykinine) libérés au cours de la réponse inflammatoire sont responsables d'un phénomène de sensibilisation se traduisant par de l'hyperalgésie ou de l'allodynie. Ces modulations activatrices peuvent avoir lieu au niveau du site d'élaboration du message nociceptif (sensibilisation périphérique) ou au niveau de la transmission synaptique dans la moelle épinière (sensibilisation centrale) (Paulmier *et al* 2015 ce numéro). Au cours du processus inflammatoire, la phospholipase A2 est activée et provoque la libération d'acide arachidonique (à partir des phospholipides membranaires) qui sera lui-même transformé en ProstaGlandine (PG) sous l'action des cyclo-oxygénases. Les prostaglandines synthétisées vont participer à la sensibilisation des nocicepteurs augmentant le nombre de messages nociceptifs élaborés et transmis vers les neurones spinaux (cf. revue de Le Bars et Willer 2004). L'action anti-inflammatoire et antalgique des Anti-Inflammatoires Non Stéroïdiens (AINS) est liée à leur action inhibitrice vis-à-vis des cyclo-oxygénases bloquant ainsi la synthèse des prostaglandines (cf. revue bibliographique de Blain *et al* 2000) (figure 4).

Les AINS bénéficiant d'une AMM chez le bovin sont la flunixin, le kétoprofène,

Figure 4. Mécanismes d'action des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS).

Suite à une lésion tissulaire, la phospholipase A2 libère de l'acide arachidonique à partir des phospholipides qui sous l'action des cyclo-oxygénase se transforme en prostaglandines. Ces prostaglandines induisent une sensibilisation des nocicepteurs. Les AINS ont la propriété de limiter la sensibilisation des nocicepteurs en inhibant la synthèse des prostaglandines par limitation de l'accès de l'acide arachidonique par les sites actifs des cyclo-oxygénases (COX) (Blain *et al* 2000, Le Bars et Willer 2004).

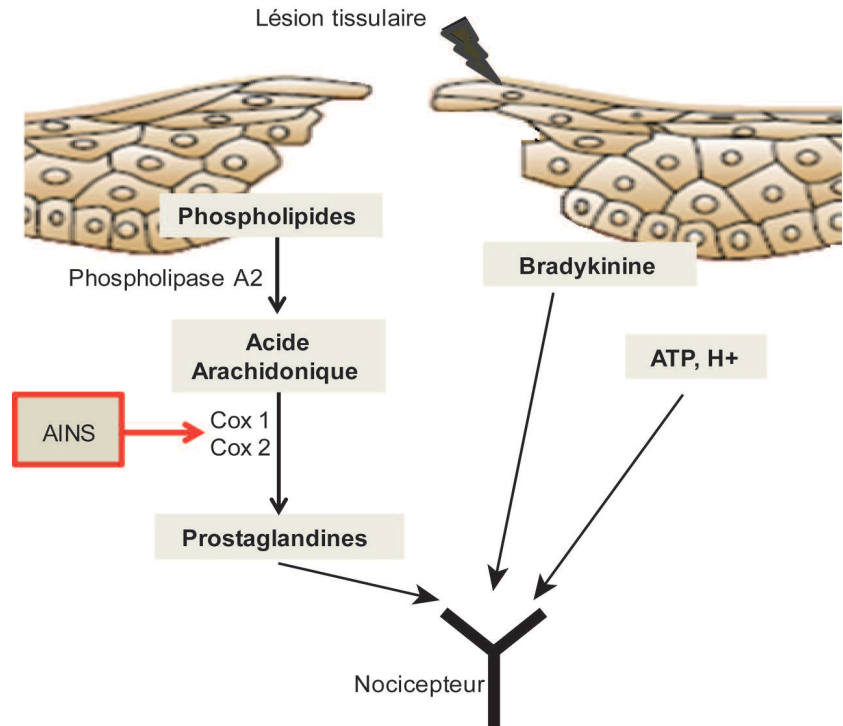
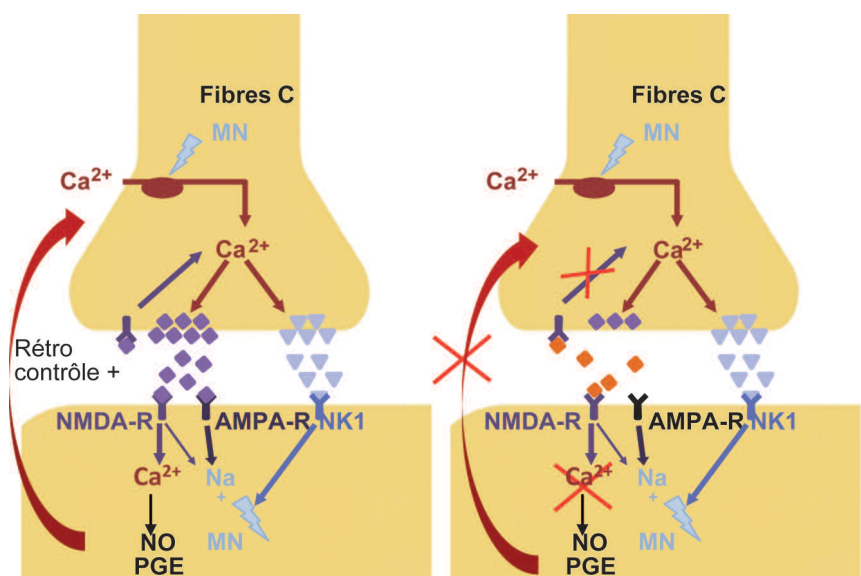


Figure 5. Mécanismes d'action de la kétamine.

Le récepteur NMDA, perméable au calcium, est présent sur les neurones pré et post-synaptiques. Le glutamate libéré dans la fente synaptique, suite à un message nociceptif, va se fixer sur des récepteurs NMDA post-synaptiques induisant l'entrée de calcium, mais aussi pré-synaptiques favorisant sa propre libération. Par ailleurs, le calcium en se fixant à des protéines de liaison va induire la synthèse de monoxyde d'azote (NO) et de prostaglandines (PG). Le NO et les PG vont à leur tour diffuser vers le neurone pré-synaptique et favoriser l'entrée de calcium. Ces rétrocontrôles positifs liés aux récepteurs NMDA sont à l'origine du phénomène de sensibilisation centrale. L'action antagoniste de la kétamine sur les récepteurs NMDA inhibe ces mécanismes et limite le phénomène de sensibilisation centrale (Le Bars et Willer 2004).



MN : Messages Nociceptifs ◆ Glutamate ♦ Antagoniste NMDA ▼ Substance P

le carprofène, le méloxicam, l'acide tolfénamique, le métamizole et l'acide acétylsalicylique. Ces molécules sont utilisées pour des douleurs générées par excès de nociception préférentiellement d'origine somatique (douleurs musculo-squelettique, mammites, boiteries...), mais certaines molécules comme la flunixin sont également conseillées dans le cadre de douleurs viscérales (Fitzpatrick *et al* 1998, Heinrich *et al* 2010, Coetzee 2011, Lizarraga et Chambers 2012) (tableau 1). Les AINS peuvent induire des effets secondaires comme des érosions gastro-intestinales ou une toxicité rénale, néanmoins ceux-ci sont limités chez les ruminants si la posologie est respectée.

La sensibilisation centrale observée lors des états douloureux chroniques neuropathiques ou inflammatoires est caractérisée par une facilitation de la transmission synaptique excitatrice spinale, sous-tendue par les récepteurs-

canaux du glutamate, en particulier le récepteur au N-Méthyl-D-Aspartate (NMDA), dont l'activité est augmentée. Dans des conditions de douleur soutenue, le glutamate libéré par les fibres afférentes primaires, en se liant au récepteur NMDA provoque une entrée massive de Ca^{2+} dans le neurone post-synaptique. Une cascade de signalisation est mise en place au niveau du neurone post-synaptique, induisant l'activation de l'activité de deux enzymes : la NO Synthase (NOS) et les Cyclo-Oxygénases (COX). Ces enzymes vont catalyser la formation de monoxyde d'azote (NO) et de Prostaglandines (PG). Le NO et les PG diffusent vers le neurone présynaptique renforçant la libération de glutamate dans la fente synaptique (cf. revue de Le Bars et Willer 2004). L'effet résultant est une facilitation de la transmission glutamatergique se traduisant par une augmentation du nombre de récepteurs NMDA sur la membrane postsynaptique et de leur activité. Les

antagonistes des récepteurs NMDA réduisent donc la sensibilisation centrale en inhibant l'action excitatrice du glutamate (Meintjes 2012) (figure 5).

Parmi les antagonistes aux récepteurs NMDA, la kétamine, qui bénéficie d'une AMM chez les ruminants, a une action anesthésique à forte dose ou analgésique à faible dose (cf. revue de Valverde 2005) (tableau 1). L'administration de la kétamine est bénéfique en pré- ou peropératoire. La kétamine permet également de potentialiser les effets analgésiques d'autres molécules administrées conjointement comme les morphiniques (cf. revue de Boreve 2010). De plus, elle permet de diminuer la douleur post-opératoire dans des situations de douleurs chroniques répondant mal au traitement initial comme les douleurs neuropathiques chez l'animal (cf. revue bibliographique de Vinuela-Fernandez *et al* 2007) et chez l'Homme (cf. revue bibliographique de Hocking et Cousins 2003).

Tableau 1. Principales molécules à propriétés analgésiques et anesthésiques utilisées chez les animaux d'élevage (d'après Valverde 2005).

Molécules	Voies d'administrations	Principes actifs	Mode d'action	Type de douleur ciblé	AMM bovin
Anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)	Intraveineuse Intramusculaire	Flunixin	Inhibiteur non sélectif des COX	Douleur viscérale	oui
		Kétoprofène	Inhibiteur préférentiel des COX 1	Douleur musculo-squelettique	oui
		Carprofène	Inhibiteur préférentiel des COX 2	Douleur par excès de nociception (Infections respiratoires et mammites aiguës)	oui
		Méloxicam	Inhibiteur préférentiel des COX 2	Douleur par excès de nociception (Infections respiratoires et mammites aiguës)	oui
		Acide tolfénamique	Inhibiteur non sélectif des COX	Douleur par excès de nociception (Syndromes respiratoires, mammites aiguës et boiteries)	oui
Sédatifs	Intraveineuse Intramusculaire Péridurale	Xylazine	Agoniste des récepteurs $\alpha 2$ -AD	Douleur viscérale et orthopédique (cheval)	oui
		Détomidine	Agoniste des récepteurs $\alpha 2$ -AD		oui
Dérivés morphiniques	Intraveineuse Intramusculaire Epidurale Transdermal Intra-articulaire	Morphine	Agoniste μ	Douleur orthopédique (cheval) Douleur somatique et viscérale (mouton)	non
		Fentanyl			
		Meperidine			
		Butorphanol	Agoniste κ et antagoniste μ	Douleur viscérale (cheval) Douleur somatique (mouton)	utilisation de la « cascade »
		Buprénorphine	Agoniste μ partiel et antagoniste κ	Douleur somatique	non
Antagonistes du récepteur NMDA	Epidurale Intraveineuse Intramusculaire Sous-cutanée	Kétamine	Antagoniste NMDA	Douleur par excès de nociception et neuropathique	oui
Anesthésiques locaux	Locale Loco-régionale	Procaïne	Bloque les canaux sodiques	Douleur par excès de nociception et neuropathique	oui

c) Molécules agissant sur la modulation inhibitrice et sur l'intégration des messages nociceptifs : les morphiniques et les agonistes $\alpha 2$ -adrénergiques

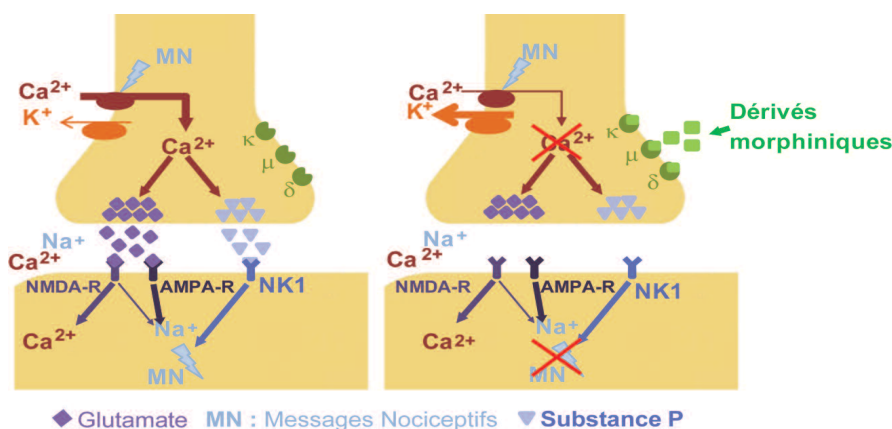
Le message nociceptif est soumis à divers systèmes de contrôles inhibiteurs lors de sa transmission au cerveau (Paulmier *et al* 2015 ce numéro). Les morphiniques agissent au niveau spinal et supra-spinal en déprimant la transmission synaptique et/ou en activant la modulation inhibitrice. Les récepteurs aux morphiniques sont des récepteurs opioïdes μ , κ et δ . La fixation des morphiniques sur ces récepteurs va induire la fermeture des canaux calciques et l'ouverture des canaux potassiques induisant une hyperpolarisation du neurone bloquant ainsi la transmission des potentiels d'action et donc des messages nociceptifs (Lizarraga et Chambers 2012) (figure 6).

La fixation des morphiniques sur leurs récepteurs μ , κ et δ explique les effets analgésiques mais également certains effets indésirables comme la sédation, l'euphorie, la dépression respiratoire, la diminution du transit digestif et du diamètre de la pupille. Ils agissent également en renforçant les voies descendantes inhibitrices par leur action sur des récepteurs opioïdes présents au niveau de la substance grise périaqueducule (Bille 2008). Les morphiniques peuvent être utilisés par voie intraveineuse, intramusculaire, intra-articulaire ou par voie périurale. Ils sont efficaces dans la plupart des douleurs modérées à sévères par excès de nociception. Ils ont un intérêt plus limité pour traiter les douleurs neuropathiques. Chez les ruminants, aucun morphinique ne possède d'AMM. Seul le butorphanol peut être utilisé dans le cadre du principe de la « cascade » (cf. revue bibliographique de Boreve 2010). Le butorphanol, grâce à son action antagoniste μ , est intéressant car ses effets indésirables sont moins marqués que ceux de la morphine (cf. revue bibliographique de Coetzee 2011).

Les agonistes des récepteurs $\alpha 2$ -adrénergiques ($\alpha 2$ -AD) induisent une sédation, une analgésie et un relâchement musculaire (Otto et Short 1998). Ces récepteurs sont présents au niveau du bulbe (*locus coeruleus*) et au niveau du système limbique impliqués entre autres dans les régulations de l'état de veille/sommeil et des émotions. Comme pour les morphiniques, la fixation des agonistes $\alpha 2$ -AD sur leurs récepteurs spinaux induit une hyperpolarisation des neurones bloquant ainsi la transmission des messages nociceptifs. En se liant aux récepteurs $\alpha 2$ -AD du système nerveux sympathique, les agonistes $\alpha 2$ -AD induisent une diminution de l'activité de ce système qui explique le relâchement

Figure 6. Mécanismes d'action des morphiniques.

Les récepteurs opioïdes μ , κ et δ sont les cibles des morphiniques ; leur activation induit la fermeture de canaux calciques et l'ouverture de canaux potassiques membranaires. Ces deux actions au niveau membranaire vont entraîner une hyperpolarisation de la membrane des neurones, bloquant ainsi la transmission des potentiels d'action et donc des messages nociceptifs (Lizarraga et Chambers 2012).



musculaire et les effets secondaires sur les systèmes cardiovasculaires, respiratoires (bradycardie et hypotension) et digestifs (diminution de la motilité intestinale) (Lizarraga et Chambers 2012). Les agonistes $\alpha 2$ -AD peuvent être utilisés par voie intraveineuse, intramusculaire ou périurale. Chez les bovins, les agonistes $\alpha 2$ -AD possédant une AMM sont la xylazine et la detomidine (cf. revue de Boreve 2010). Ils sont principalement utilisés chez les ruminants comme sédatifs facilitant la contention de l'animal. Chez le cheval, ils sont utilisés comme analgésiques dans le traitement des douleurs somatiques (douleurs orthopédiques) et viscérales (coliques) (cf. revue de Valverde 2005).

3.2 / Intérêts et modalités d'une prise en charge optimale de la douleur chez les ruminants

Une prise en charge optimale de la douleur doit à la fois limiter l'élaboration et la transmission des messages nociceptifs mais également limiter la modulation activatrice à l'origine des processus de sensibilisation périphériques et centraux, on dit alors qu'elle est multimodale. Elle doit aussi être adaptée au type de douleur et à l'intensité douloureuse. L'emploi concomitant de différents principes actifs permet en outre d'optimiser leurs actions respectives et ce, à moindre dose : les effets secondaires de chacun d'entre eux s'en trouvent également limités. Enfin, il apparaît qu'une prise en charge la plus précoce possible d'une douleur améliore sa réduction.

a) Comment limiter de façon précoce les processus de sensibilisation périphérique et centrale ?

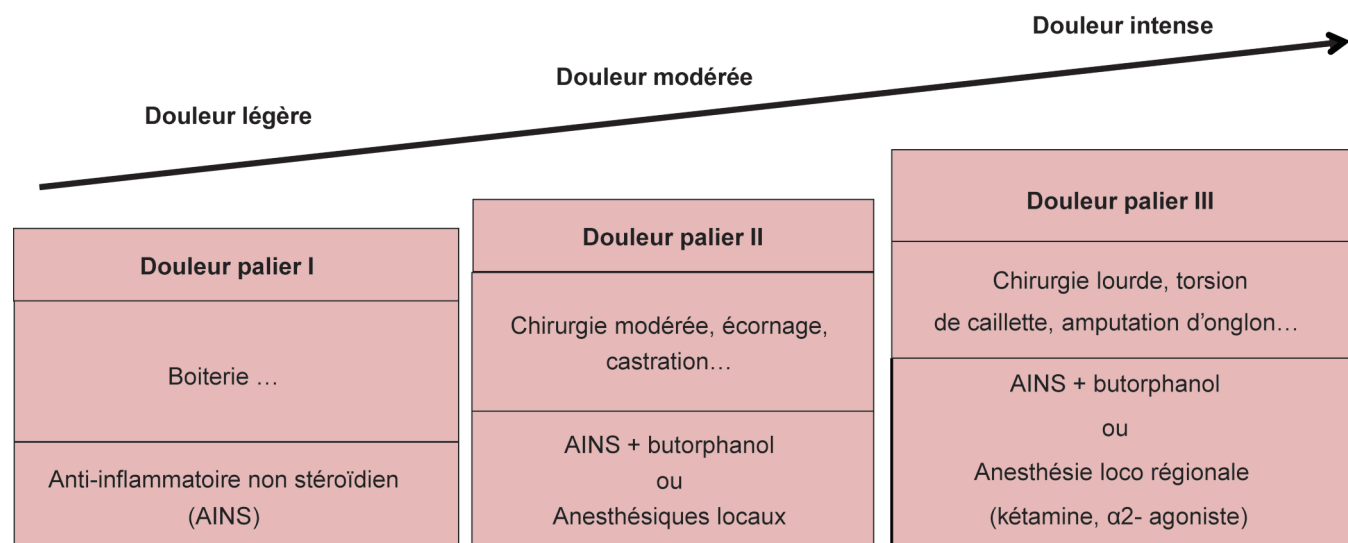
L'intérêt d'une prise en charge précoce de la douleur est de limiter les processus

d'hyperalgésie et d'allodynie (cf. revue de Le Bars et Willer 2004). Certaines molécules peuvent être administrées juste avant une intervention chirurgicale afin de limiter les modulations activatrices. La kétamine ou les AINS par exemple, utilisés en pré-opératoire permettent de limiter efficacement les processus de sensibilisation par une action périphérique et centrale (Levionnois 2008). En périphérie, les AINS permettent de limiter l'action sensibilisatrice des prostaglandines. Au niveau central, l'action antagoniste de la kétamine permet de limiter la douleur pouvant se prolonger plusieurs heures après l'arrêt du stimulus initial (revue de Boreve 2010).

b) Comment s'adapter au type de douleur et pourquoi préconiser une analgésie multimodale ?

Le traitement pharmacologique des douleurs par excès de nociception repose sur l'utilisation des anesthésiques locaux, des morphiniques, des AINS et des antagonistes des récepteurs NMDA. Le choix du traitement est réalisé en fonction de l'étiologie, du type et de la localisation de la douleur. Ainsi, les AINS présentent l'avantage d'être utilisés en cas de douleurs somatiques et viscérales. Dans des situations de douleurs plus intenses les AINS peuvent être associés à des agonistes $\alpha 2$ -AD ou à des morphiniques permettant d'obtenir une action synergique et d'améliorer l'analgésie (cf. revue de Valverde 2005). Les morphiniques, bien que peu utilisés en pratique, sont préconisés dans le cas des douleurs viscérales dont l'origine est de type tension/distension.

Le traitement pharmacologique des douleurs neuropathiques repose, chez les ruminants, sur l'utilisation des anesthésiques locaux (bloquant la transmission

Figure 7. Protocoles analgésiques en fonction de l'intensité douloureuse (Boreve 2010).

des messages nociceptifs et les décharges ectopiques) et des antagonistes des récepteurs NMDA (bloquant l'action activatrice du glutamate et limitant la sensibilisation centrale).

Il est maintenant bien admis que l'inhibition des messages nociceptifs à plusieurs niveaux (transduction, transmission, modulation, intégration) est la méthode la plus efficace pour réduire la douleur (analgésie multimodale). L'association d'un sédatif aux AINS est beaucoup plus efficace pour limiter des douleurs de type somatique et probablement neuropathique comme dans les situations d'écornage (cf. revue bibliographique de Stafford et Mellor 2005). Cette association permet de limiter les processus de sensibilisation périphérique et centrale. L'association du butorphanol, des AINS et des agonistes $\alpha 2$ -AD permet de potentialiser leurs effets analgésiques et sédatifs respectifs, mais également de réduire les doses administrées. De même, l'association d'un AINS et d'un anesthésique local administrés avant une castration est plus efficace pour réduire la douleur que la monothérapie (Earley et Crowe 2002, Stafford *et al* 2002).

c) S'adapter à l'intensité de la douleur (antalgésiques de paliers I, II et III)

Comme chez l'Homme et les animaux de compagnie, les différentes douleurs rencontrées en élevage ont été classées en trois paliers (cf. revue de Boreve 2010). Les protocoles médicamenteux potentiels ont ensuite été proposés selon

le palier de douleur considéré (figure 7). Ainsi, pour des douleurs de palier I, comme par exemple dans le cas des boiteries, des AINS seuls sont préconisés. Pour des douleurs de paliers II, comme par exemple lors de l'écornage, l'anesthésie locale ou un AINS associé à un morphinique léger sont conseillés. L'anesthésie loco-régionale, la sédation et le butorphanol sont, eux, recommandés pour des douleurs de palier III comme par exemple lors de torsion de caillette (cf. revue de Boreve 2010). Cependant ce classement par palier n'a été proposé, chez les animaux de rente, que dans le cadre de quelques pathologies les plus courantes, comme les boiteries ou lors de chirurgies de terrain.

En définitive, l'arsenal thérapeutique disponible en médecine vétérinaire est assez large pour pouvoir intervenir sur les différents mécanismes de la douleur, de la transduction du stimulus à l'intégration du message nociceptif. Sur la base des connaissances disponibles chez les ruminants, il apparaît que l'approche d'une thérapie multimodale est plus apte à limiter au mieux la douleur. La prise en charge de la douleur, la plus efficace possible, implique d'évaluer à la fois le type et l'intensité de la douleur.

Conclusion

En élevage, comme en expérimentation animale, les ruminants peuvent être exposés à différents types de douleur (par excès de nociception ou neuropathique)

qui sont à l'origine de modifications comportementales, physiologiques et zootechniques. Les pathologies infectieuses et virales, les interventions chirurgicales et les traumatismes représentent la majorité des sources de douleur. Par ailleurs, en raison de l'absence d'indicateurs spécifiques susceptibles de caractériser chaque type de douleur, l'évaluation multiparamétrique d'une situation douloureuse apparaît comme indispensable. Des grilles d'évaluation basées principalement sur des indicateurs comportementaux et quelques indicateurs physiologiques ont été développées pour les animaux de compagnies (Laboissière 2006) et certains animaux de laboratoire comme les rongeurs (Langford *et al* 2010). Elles sont beaucoup plus rares chez les animaux de rente et sont le plus souvent spécifiques d'une espèce ou d'une pathologie/chirurgie. Une approche multiparamétrique intégrant des indicateurs comportementaux, physiologiques, inflammatoires, métaboliques, oxydatifs et zootechniques pourrait être envisagée au vue des indicateurs rapportées par la bibliographie. Cette évaluation, en discriminant plus précisément des profils de réponses en fonction du type de douleur et/ou de l'intensité devrait conduire à une utilisation plus ciblée et plus adaptée de l'arsenal thérapeutique actuellement à disposition des praticiens.

Références

- Bille C., 2008. Morphine and its derivatives systemic administration in the treatment of perioperative pain in dogs and cats. *Pratique médicale et chirurgicale de l'animal de compagnie*, 43, 97-107.
- Blain H., Jouzeau J.Y., Netter P., Jeandel C., 2000. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens inhibiteurs sélectifs de la cyclooxygénase 2. Intérêt et perspectives. *Rev. Méd. Int.*, 21, 978-88.
- Boissy A., 2005. Emotions and cognition: an original approach to study the emotions in animal. *Bull. Acad. Vét., France*, 158, 3.
- Boreve guide, 2010. Prise en charge de la douleur chez les bovins. Recommandations pour le vétérinaire, 67p.
- Caillat L.C., 2008. La chirurgie de l'intestin du veau et de la vache. Thèse, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Faculté de Médecine Créteil, France, 122p.
- Coetzee J.F., 2011. Review of pain assessment techniques and pharmacological approaches to pain relief after bovine castration: Practical implications for cattle production within the United States. *Appl. Anim. Behav. Sci.*, 135, 192-213.
- Coetzee J.F., 2013. Assessment and management of pain associated with castration in cattle. *Vet. Clin. Food Anim.*, 29, 75-101.
- Del Médico Zajac M.P., Ladelfa M.F., Kotsias F., Muylkens B., Thiry J., Thiry E., Romera S.A., 2010. Biology of bovine herpesvirus 5. *Vet. J.*, 184, 138-145.
- Earley B., Crowe M.A., 2002. Effects of ketoprofen alone or in combination with local anesthesia during the castration of bull calves on plasma cortisol, immunological and inflammatory responses. *J. Anim. Sci.*, 80, 1044-1052.
- Fitzpatrick J.L., Young F.J., Eckersall D., Logue D.N., Knight C.J., Nolan A., 1998. Recognising and controlling pain and inflammation in mastitis. *Anim. Health*, 36-44.
- Fourichon C., Seegers H., Bareille N., Beaudeau F., 1999. Effects of disease on milk production in the dairy cow: a review. *Preventive Vet. Med.*, 41, 1-35.
- Fourichon C., Seegers H., and Malher X., 2000. Effect of disease on reproduction in the dairy cow: a meta-analysis. *Theriogenology*, 53, 1729-1759.
- Garcia-Larrea L., Magnin M., 2008. Physiopathologie de la douleur neuropathique : revue des modèles expérimentaux et des mécanismes proposés. *Presse Med.*, 37, 315-340.
- Giamberardino M.A. 2003. La douleur viscérale : de la physiopathologie au diagnostic et au traitement. La lettre de l'Institut UPSA de la Douleur n°21.
- Guatteo R., Levionnois O., Fournier D., Guemene D., Latouche K., Leterrier C., Mormède P., Prunier A., Servière J., Terlouw C., Le Neindre P., 2012. Minimising pain in farm animals: the 3S approach 'Suppress, Substitute, Soothe'. *Animal*, 6, 1261-1274.
- Heegaard P.M.H., Godson D.L., Toussaint M.J.M., Tjørnhøj K., Larsen L.E., Viuff B., Rønsholt L., 2000. The acute phase response of haptoglobin and serum amyloid A (SAA) in cattle undergoing experimental infection with bovine respiratory syncytial virus. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 77, 151-159.
- Heinrich A., Duffield T.F., Lissemore K.D., Millman S.T., 2010. The effect of meloxicam on behavior and pain sensitivity of dairy calves following cautery dehorning with a local anesthetic. *J. Dairy Sci.*, 93, 2450-2457.
- Hocking G., Cousins M.J., 2003. Ketamine in Chronic Pain Management : An Evidence-Based Review. *Anesth. Analg.*, 97, 1730-1739.
- Holopherne D., Guatteo R., 2008. Techniques d'anesthésie locale et locorégionale chez les bovins. *Bull. G.T.V.*, 44, 35-44.
- Humblet M.F., Godeau J.M., 2005. L'haptoglobine, marqueur protéique de l'inflammation aiguë dans l'espèce bovine. *Ann. Med. Vet.*, 149, 20-33.
- Kolkman I., Aerts S., Vervaecke H., Viccal J., Vandeloek J., Kruif A., Opsomer G., Lips D., 2010. Assessment of differences in some indicators of pain in double muscled Belgian Blue cows following naturally calving vs caesarean section. *Reprod. Dom. Anim.*, 45, 160-167.
- Laboissiere B., 2006. Validation statistique des grilles 4A-Vet d'évaluation de la douleur post-opératoire chez le chien et le chat. Thèse Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes, 247p <http://hdl.handle.net/10068/810809>.
- Lamara A., Fieni F., Chatagnon G., Larrat M., Dubreil L., Chebloune Y., 2013. Caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) replicates productively in cultured epididymal cells from goats. *Comp. Immunol., Microbiol. Infect. Dis.*, 36, 397-404.
- Langford D.J., Bailey A.L., Chanda M.L., Clarke S.E., Drummond T.E., Echols S., Glick S., Ingrao J., Klassen-Ross T., LaCroix-Fralish M.L., Matsumiya L., Sorge R.E., Sotocinal S.G., Tabaka J. M., Wong D., Van den Maagdenberg A.M.J.M., Ferrari M.D., Craig K.D., Mogil J.S., 2010. Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse. *Nature Method.*, 7, 447-449.
- Le Bars D., Willer J.C., 2004. Physiologie de la douleur. *EMC-Anesth. Reanim*, 1, 227-266.
- Le Neindre P., Guatteo A., Guéméné D., 2009. Douleurs Animales, les identifier, les comprendre, les limiter chez les animaux d'élevage. INRA Edition, Expertises collectives, 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, 339p.
- Levionnois O., 2008. Thérapeutique antidouleur chez les bovins : données pratiques. *Bull. GTV*, 44, 8p.
- Lizarraga I., Chambers J.P., 2012. Use of analgesic drugs for pain management in sheep. *New Zealand Vet. J.*, 60, 87-94.
- Mainau E., Manteca X. 2011. Pain and discomfort caused by parturition in cows and sows. *App. Anim. Behav. Sci.*, 135, 241-251.
- Martinez V., Attal N., Bouhassira D., Lanteri-Minet M., 2010. Chronic neuropathic pain: Diagnosis, evaluation and treatment in outpatient services. Guidelines for clinical practice of the French society for the study and treatment of pain. *Douleurs-Evaluation-Diagnostic-Traitement*, 11, 3-21.
- Meintjes R.A., 2012. An overview of the physiology of pain for the veterinarian. *The Vet. J.*, 193, 344-348.
- Mellema S.C., Doherr M.G., Wechsler B., Thueer S., Steiner A., 2006. Influence of local anaesthesia on pain and distress induced by two bloodless castration methods in young lambs. *Vet. J.*, 172, 274-283.
- Mølgaard L., Damgaard B.M., Bjerre-Harpøth V., Herskin M.S., 2012. Effects of percutaneous needle liver biopsy on dairy cow behavior. *Res. Vet. Sci.*, 93, 1248-1254.
- Molony V., Kent J.E., 1997. Assessment of acute pain in farm animals using behavioral and physiological measurements. *J. Anim. Sci.*, 75, 266-272.
- Murata H., Shimada N., Yoshioka M., 2004. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. *The Vet. J.*, 168, 28-40.
- Ohtsuka H., Kudo K., Mori K., Nagai F., Hatsugaya A., Tajima M., Tamura K., Hoshi F., Koiwa M., Kawamura S., 2001. Acute phase response in naturally occurring coliform mastitis. *J. Vet. Med.*, 63, 675-678.
- Otto K.A., Short C.E., 1998. Pharmaceutical control of pain in large animals. *App. Anim. Behav. Sci.*, 59, 157-169.
- Paull D.R., Small A.H., Lee C., Palladin P., Colditz I.G., 2012. Evaluating a novel analgesic strategy for ring castration of ram lambs. *Vet. Anaesth. Anal.*, 39, 539-549.
- Paulmier V., Faure M., Durand D., Boissy A., Cognie J., Eschallier A., Terlouw C., 2015. Douleurs animales. 1. Les mécanismes. *INRA Prod. Anim.*, 28, 217-230.
- Petersen H.H., Nielsen P.J., Heegaard P.M.H. 2004. Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. *Vet. Res.*, 35, 163-187.
- Prunier A., Mounier L., Le Neindre P., Leterrier C., Mormède P., Paulmier V., Prunet P., Terlouw C., Guatteo R., 2013. Identifying and monitoring pain in farm animals: a review. *Anim.*, 7, 998-1010.
- Robertson I.S., Kent J.E., Molony V., 1994. Effect of different methods of castration on behaviour and plasma cortisol in calves of three ages. *Res. Vet. Sci.*, 56, 8-17.
- Serratrice G., Verschuere A., 2005. Système nerveux autonome. *EMC-Neurol.*, 2, 55-80.
- Stafford K.J., Mellor D.J., Todd S.E., Bruce R.A., Ward R.N., 2002. Effects of local anaesthesia or local anaesthesia plus a non-steroidal anti-inflammatory drug on the acute cortisol response of calves to five different methods of castration. *Res. Vet. Sci.*, 73, 61-70.

Stafford K.J., Mellor D.J., 2005. Dehorning and disbudding distress and its alleviation in calves. *Vet. J.*, 169, 337-349.

Stewart M., Verkerk G.A., Stafford K.J., Schaefer A.L., Webster J.R., 2010. Noninvasive assessment of autonomic activity for evaluation of pain in calves, using surgical castration as a model. *J. Dairy Sci.*, 93, 3602-3609.

Sutherland M. A., Tucker C.B., 2011. The long and short of it: A review of tail docking in farm animals. *Appl. Anim. Behav. Sci.*, 135, 179-191.

Valverde A., 2005. Pain management in horses and farm animals. *J. Vet. Emerg. Crit. Care.*, 15, 295-307.

Viñuela-Fernandez I., Jones E., Welsh E.M., Fleetwood-Walker S.M., 2007. Pain mechanisms and their implication for the management of pain in farm and companion animals. *Vet. J.*, 174, 227-239.

Walker K.A., Duffield T.F., Weary D.M., 2011. Identifying and preventing pain during and after surgery in farm animals. *Appl. Anim. Behav. Sci.*, 135, 259-265.

Yunta C., Guasch I., Bach A., 2012. Short communication: Lying behavior of lactating dairy cows is influenced by lameness especially around feeding time. *J. Dairy Sci.*, 95, 6546-6549.

Résumé

Les ruminants sont des animaux sensibles, doués de capacités émotionnelles et cognitives, pouvant être soumis à différents types de douleur (excès de nociception ou neuropathique) et ceci dans différents contextes (élevage ou expérimentation). L'évaluation de ces douleurs est souvent délicate car, dans la plupart des cas, il n'existe pas d'outil unique et spécifique mais plutôt un ensemble d'indicateurs dont les valeurs informatives sont complémentaires. Une évaluation adéquate de la douleur est essentielle afin d'optimiser sa prise en charge en utilisant au mieux l'arsenal thérapeutique actuellement à la disposition des prescripteurs. A travers cette synthèse, nous montrerons en quoi i) l'évaluation du type et du niveau de douleur est indispensable à une prise en charge optimale de la douleur, ii) une évaluation reposant sur une approche multiparamétrique est l'approche la plus adaptée à cet objectif.

Abstract

Animal pains. 2. Assessment and treatment in ruminants

Ruminants are sentient beings, endowed with emotional and cognitive abilities, which can perceive different types of pain (nociceptive or neuropathic) in different types of contexts (breeding / experimentation). Assessing pain is often difficult because, in most situations of pain, there is not a unique and specific tool but rather a set of complementary indicators. An accurate assessment of pain is essential to optimize care and use of the therapeutic arsenal currently available to prescribers. Indeed, since the therapeutic arsenal has different mechanisms of action, it is necessary to quantify pain intensity and the type of pain assessment. Through this review, we will show how: i) accurate assessment is essential for optimal management of pain, ii) an evaluation based on a multi-approach is best suited to this purpose.

FAURE M., PAULMIER V., DE BOYER DES ROCHES A., BOISSY A., TERLOUW E.M.C., GUATTEO R., COGNIÉ J., COURTEIX C., DURAND D., 2015. Douleurs animales. 2. Evaluation et traitement de la douleur chez les ruminants. *INRA Prod. Anim.*, 28, 231-242.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Ashley F.H., Waterman-Pearson A.E., Whay H.R., 2005. Behavioural assessment of pain in horses and donkeys : application to clinical practice and future studies. *Equine Veterinary Journal* 37, 565-575.
- Barroux G., 2011. La santé des animaux et l'émergence d'une médecine vétérinaire au XVIIIème siècle. *Revue d'histoire des sciences* (tome 64), p. 349-376.
- Bath G.F., 1998. Management of pain in production animals. *Applied Animal Behaviour Science* 59, 147–156.
- Basbaum A.I., Bautista .M., Scherrer G., Julius D., 2009. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell*, 139, 267-284.
- Betley M., Sutherland S.F., Gregoricka M.L., Pollet R.A., 1991. The analgesic effect of ketorprofen for use in treating equine colic as compared to flunixin meglumine. *Equine pract.*, 1991, 13 (6), 11-16.
- Benson G.J., Wheaton L.G., Thurmon J.C., Tranquilli L.G., Olson W.A., Davis C.A., 1991. Postoperative catecholamine response to onychectomy in isoflurane-anesthetized cats. *Vet surg.* 20 (3) : 222-225.
- Bicalho R.C., Vokey F., Erb H.N., Guard C.L., 2007. Visual locomotion scoring in the first seventy days in milk: impact on pregnancy and survival. *Journal of dairy science* 90(10): 4586-4591.
- Bille C., 2008. Morphine and its derivatives systemic administration in the treatment of perioperative pain in dogs and cats. *Pratique médicale et chirurgicale de l'animal de compagnie*, 43, 97-107.
- Boland and Poncet 2010. Guide pratique d'analgésie, Sogéval, 200p.
- Boreve guide, 2010. Prise en charge de la douleur chez les bovins, Recommandations pour le vétérinaire, 67 pp.
- Breuer K., Hemsworth P.H., Coleman G.J., 2003. The effect of positive or negative handling on the behavioural and physiological responses of nonlactating heifers. *Applied Animal Behaviour Science* 84, 3–22.
- Bridgestock C., and Rae C.P., 2013. Anatomy, physiology and pharmacology of pain. *Anaesthesia and Intensive Care Medicine* 14:11, 480-483.
- Brondani J.T., Luna S.P.L., Padovani C.R., 2011. Refinement and initial validation of a multidimensional composite scale for use in assessing acute postoperative pain in cats. *Am. j. vet. res.* 72, (2), 174–183.
- Bussières G., Jacques C., Lainay O., Beauchamp G., Leblond A., Cadore J.L., Desmaizieres L.M., Cuvelliez S.G., Troncy E., 2008. Development of a composite orthopaedic pain scale in horses. *Research in Veterinary Science* 85(2), 294-306.

- Caillat L.C., 2008. La chirurgie de l'intestin du veau et de la vache. Thèse, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort (Faculté de Médecine Créteil), 122 pp.
- Cattell J.H., Dobson H., 1990. A survey of caesarean operations on cattle in general veterinary practice. *Veterinary research* 127, 395–399.
- Coetzee J.F., 2011. A review of pain assessment techniques and pharmacological approaches to pain relief after bovine castration: practical implications for cattle production within the united states. *Applied animal behaviour science* 135(3), 192-213.
- Coetzee J.F., 2013. Assessment and Management of Pain Associated with Castration in Cattle. *Veterinary Clinical Food Animal* 29, 75-101.
- Conner J.G., Eckersall P.D., Wiseman A., Aitchison T.C., Douglas T.A., 1988. Bovine acute phase response following turpentine injection. *Research in Veterinary Science* 44, 82-88.
- Cruccu G., Sommer C., Anand P., Attal N., Baron R., Garcia-Larrea L., Haanpaa M., Jensen T.S., Serra J., Treede R.D., 2010. EFNS guidelines on neuropathic pain assessment: revised 2009. *European Journal of Neurology* 17(8), 1010-8.
- Dalla Costa E., Minero M., Lebelt D., Stucke D., Canali E., Leach M.C., 2014. Development of the Horse Grimace Scale (HGS) as a Pain Assessment Tool in Horses Undergoing Routine Castration. *PloS one*, 9(3), e92281.
- Darnis A., 2008. Impact de la douleur sur les performances reproductrices des bovins. *Bulletin des GTV*, 44, 13-18.
- Dartevielle G., 2014. Etude des pratiques analgésiques des vétérinaires ruraux chez les bovins en France. Thèse vétérinaire école nationale vétérinaire université de Toulouse. 132pp.
- Delattre S., Touzot-jourde G., 2016. Méthodes d'évaluation de la douleur chez les équidés. *équidée* - article 2.
- Del Médico Zajac M.P., Ladelfa M.F., Kotsias F., Muylkens B., Thiry J., Thiry E., Romera S.A., 2010. Biology of bovine herpesvirus 5. *The Veterinary Journal* 184 (2), 138-145.
- De Oliveira F.A., Luna S.P.L., Do Amaral J.B., Rodrigues K.A., Sant'Anna A.C, Daolio M., Brondani J.T., 2014. Validation of the UNESP-Botucatu unidimensional composite pain scale for assessing postoperative pain in cattle. *BMC Veterinary Research* 10, 200.
- Dondi F., Lukacs R.M., Gentilini F., Rinnovati R., Spadari A., Romagnoli N., 2015. Serum amyloid A, haptoglobin, and ferritin in horses with colic: Association with common clinicopathological variables and short-term outcome. *The Veterinary Journal* 205, 50–55.
- Done S.H., Guise J., Chennells D.J., 2003. Tail biting and tail docking in pigs. *Pig Journal* 51: 136-154.
- Dupas F., 2005. Le statut juridique de l'animal en France et dans les états membres de l'union européenne : historique, bases juridiques actuelles et conséquences pratiques. Thèse vétérinaire école nationale vétérinaire université de Toulouse. 127pp.
- Dupreez P., 2002. Pelvic fractures: diagnosis and management. In: *proceedings of the 41st british equine veterinary association. Congress* 71-72.

- Earley B., and Crowe MA., 2002. Effects of ketoprofen alone or in combination with local anesthesia during the castration of bull calves on plasma cortisol, immunological and inflammatory responses. *Journal of Animal Science* 80, 1044-1052.
- Faulkner D.B., Eurell T., Tranquillit J., 1992. Performance and health of weanling bulls after butorphanol and xylazin administration at castration. *Journal Animal of Science* 70, 2970-2974.
- Faulkner P.M., Weary. D.M., 2000 Reducing Pain After Dehorning in Dairy Calves, *J Dairy Sci* 83:2037–2041.
- Faure M., Paulmier V., De Boyer Des Roches A., Boissy A., Terlouw C., Guatteo R., Cognie J., Courteix C., Durand D., 2015. Douleurs animales. 2. Evaluation et traitement de la douleur chez les ruminants. *INRA Productions Animales* 28 (3), 231-242.
- Fitzpatrick J.L., Young F.J., Eckersall D., Logue D.N., Knight C.J., Nolan A., 1998. Recognising and controlling pain and inflammation in mastitis. *Anim. Health*, p36-44.
- Fisher A.D., Crowe M.A., Alonso de la Varga M.E., Enright W.J., 1996. Effect of castration method and the provision of local anesthesia on plasma cortisol, scrotal circumference, growth, and feed intake of bull calves. *Journal of Animal Science* 74, 2336-2343.
- Flecknell P.A., 1994. Refinement of animal use-assessment and alleviation of pain and distress. *Lab Anim* 28: 222–231.
- Fleming P., 2002. Non traditional approaches to pain management. *vet. clin. north. am. equine. pract.*, 18, 83-105.
- Foucras G., Tabouret G., 2012. Les différentes phases de l'inflammation aigüe. *Le nouveau praticien vétérinaire* 5,(22), 20-26.
- Fournichon C., Seegers H., Beaudeau F., Bareille N., 1999. Effects of disease on milk production in the dairy cow: a review. *Prev. vet. med.*, 29, 1-35.
- Fournichon C., Seegers H., Malher X., 2000. Effect of disease on reproduction in the dairy cow: a meta-analysis. *Theriogenology*, 53, 1729-1759.
- Fouquet S., Orset M., 2012. Prise en charge des patients douloureux chroniques : analyse de besoins des patients vis-a-vis de leurs médicaments antalgiques. Thèse de docteur à l'Université Joseph Fourier, 179pp.
- Fox S.M., 2013. Pain management in small animal medicine CRC press., 415p.
- Garcia-Larrea L., Magnin M., 2008. Physiopathologie de la douleur neuropathique : revue des modèles expérimentaux et des mécanismes proposés. *Presse Med.*, 37, 315-340.
- Gladine C., 2006. Intérêt des extraits végétaux riches en polyphénols dans la prévention de la lipoperoxydation chez le rat et le mouton recevant des régimes supplémentés en AGPI n-3. Thèse, école doctorale science de la vie et de la santé (université d'auvergne), 307 pp.
- Gleerup BK., Andersen PH., Munksgaard L., Forkmana B., 2015. Pain evaluation in dairy cattle. *Applied Animal Behaviour Science* 171, 25–32.

- Giamberardino M.A., 2004. La douleur viscérale : de la physiopathologie au diagnostic et au traitement. La lettre de l'Institut UPSA de la Douleur n°21.
- Gielen M., 2010. Fonctionnement des récepteurs canaux du glutamate : des protéines responsables de la transmission synaptique excitatrice. Méd. Sci., 1(26).
- Goff J.P., Kinura K. and Florst R.L., 2002. Effect of mastectomy on milk fever, energy and vitamins A, E and β -carotene at parturition. Journal of Dairy Science 85, 1427–1436.
- Goudeau J., 1932. De la douleur en pathologie vétérinaire, imprimerie toulousaine lion et fils, Toulouse.
- Graubner C., Gerber V., Doherr M., Spadavecchia C., 2011. Clinical application and reliability of a post-abdominal surgery pain assessment scale (PASPAS) in horses. The Veterinary Journal 188(2), 178-183.
- Grondahl-nielsen C., Simonsen H.B., Lund J.D., Hesselholt M., 1999. Behavioural, endocrine and cardiac responses in young calves undergoing dehorning without and with use of sedation and analgesia. The Veterinary Journal 158, 14-20.
- Guatteo R., Levionnois O., Fournier D., Guemene D., Latouche K., Leterrier C., Morme P., Prunier A., Serviere J., Terlouw C., Le Neindre P., 2012. Minimising pain in farm animals: the 3S approach – ‘Suppress, Substitute, Soothe’. Animal 6, 1261-1274.
- Guezennec A., 2006. Gestion pratique de la douleur chez le cheval. Thèse vétérinaire école nationale vétérinaire université de Toulouse. 173pp
- Guirimand F., LeBars D., 1996. Physiologie de la nociception. Ann. Fr. Anesth. Réanim., 15, 1048-1079.
- Guirimand F., 2003. Physiologie de la douleur : données récentes. Néphrologie 7 :401-407.
- Heegaard P.M.H., Godson D.L., Toussaint M.J.M., Tjørnehøj K., Larsena L.E., Viuff B., Rønsholt L., 2000. The acute phase response of haptoglobin and serum amyloid A (SAA) in cattle undergoing experimental infection with bovine respiratory syncytial virus. Vet. Immunology and Immunopathology 77, 151-159.
- Heinrich A., Duffield T.F., Lissemore K.D., and Millman S.T., 2010. The effect of meloxicam on behavior and pain sensitivity of dairy calves following cautery dehorning with a local anesthetic. Journal of Dairy Science 93, 2450-2457.
- Hellyer P., Rodan I., Brunt J., et al., 2007. AAHA/AAFP pain management guidelines for dogs and cats. J Feline Med Surg 9(6), 466–80.
- Hendrix P.K, Raffe M.R, Robinson E.P, Felice L.J, Randall D.A., 1996. Epidural administration of bupivacaine, morphine, or their combination for postoperative analgesia in dogs. j am vet med assoc. aug 1 ; 209 (3) : 598-607.
- Hocking G., Cousins M.J., 2003. Ketamine in Chronic Pain Management : An Evidence-Based Review. Anesth. Analg., 97, 1730-9.
- Holopherne D., Guatteo R., 2008. Techniques d'anesthésie locale et locorégionale chez les bovins. Bulletin des G.T.V., 44, 35-44.

- Holton L., Reid J., Scott E.M., 2001. Development of a behaviour-based scale to measure acute pain in dogs. *Vet. Rec.* 148, (17), 525–531.
- Hopster H., Van der Werf J.T.N., and Blokhuis H.J., 1998. Stress enhanced reduction in peripheral blood lymphocyte numbers in dairy cows during endotoxin-induced mastitis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 66(1):83-97. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0165-2427\(98\)00189-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0165-2427(98)00189-5)
- Hudson C., Whay H., Huxley J., 2008. recognition and management of pain in cattle. In *practice* 30, 126-134.
- Jiankang L., Akitane M., 1999. *Stress, Aging, and Brain Oxidative Damag.* Plenum Publishing Corporation.
- Johnson CB., Sylvester SP., Stafford KJ., 2009. Effects of age on the electroencephalographic response to castration in lambs anaesthetized with halothane in oxygen from birth to 6 weeks old. *Veterinary ...*, 2009
- Juarbe-diaz S.V., Houpt K.A., Kusunose R., 1998. Prevalence and characteristics of foal rejection in arabian mares. *Equine Veterinary Journal* 30, 424- 428.
- Julius D., 2013. TRP channels and pain. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 29,355-384.
- Junot S., 2005. Comment diagnostiquer la douleur ? *La dépêche vétérinaire, supplément technique n° 96 : gestion de la douleur*, 11-18.
- Kania B.F., Kania K., Romanowicz K., Tomaszewska D., Sutiak V., Wronska-Fortuna D., 2006. Centrally administered PD 140.548 N-methyl-D-glucamine prevents the autonomic responses to duodenal pain in sheep. *Research in Veterinary Science* 81, 109–118.
- Keating S.C.J., Thomas A.A., Flecknell P.A., Leach M.C., 2012. Evaluation of EMLA Cream for Preventing Pain during Tattooing of Rabbits: Changes in Physiological, Behavioural and Facial Expression Responses. *Plos One* 7, 9.
- Kolkman I, Aerts S, Vervaecke H, Vicca J, Vandeloock J, Kruif A, Opsomer G, and Lips D 2010. Assessment of Differences in Some Indicators of Pain in Double Muscled Belgian Blue Cows Following Naturally Calving vs Caesarean Section. *Reproduction in Domestic Animals* 45, 160-167.
- Laboissiere B., 2006. Statistical validation of 4A-VET's postoperative pain scale in dogs and cats. *Thèse Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes*, 229 pp.
- Lamara A., Fieni F., Chatagnon G., Larrat M., Dubreil L., Chebloune Y., 2013. Caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) replicates productively in cultured epididymal cells from goats. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 36, 397-404.
- Langford D.J., Bailey A.L., Chanda M.L., Clarke S.E., Drummond T.E., Echols S., Glick S., Ingrao J., Klassen-Ross T., LaCroix-Fralish M.L., Matsumiya L., Sorge R.E., Sotocinal S.G., Tabaka J. M., Wong D., Van den Maagdenberg A.M.J.M., Ferrari M.D., Craig K.D., Mogil J.S., 2010. Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse. *Nature Method.*, 7, 447-449.

- Larrère C., Larrère R., 2000. Animal rearing as a contract? *Journal of Agricultural & Environmental Ethics* 12(1): 51-58.
- Lazorthes Y., cours : http://www.medecine.ups-tlse.fr/dcem2/module6/arielle/chapitre_01.pdf
- Le bars D., Adam F., 2002. Nocicepteurs et médiateurs dans la douleur aigue inflammatoire. *ann. fr. anesth. réanim*, 21, 315-335.
- Le Bars D., Willer J-C., 2004. Physiologie de la douleur. *EMC-Anesth. Réanim*, 1, 227-266.
- Le Maire M., 2011. Les affections podales des ovins. Thèse Vétérinaire école Nationale vétérinaire d'Alfort. 177pp.
- Le Neindre P., Guatteo A., Guéméné D. [et al.]. 2009. Douleurs Animales, les identifier, les comprendre, les limiter chez les animaux d'élevage, INRA Edition, Expertises collectives, 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, 339 pp.
- Levionnois O., 2008. Thérapeutique anti-douleur chez les bovins : données pratiques. *Bulletin des GTV*, n°44.
- Liron M., 2011. Écornage du chevreau : procédure, anesthésie et analgésie école nationale vétérinaire d'Alfort. 116pp.
- Lizarraga I., and Chambers J.P., 2012. Use of analgesic drugs for pain management in sheep. *New Zealand Vet. J.*, 60, 87-94.
- Mathews K., Kronen P.W., Lascelles D., 2014. Guidelines for recognition, assessment and treatment of pain WSAVA Global Veterinary Community. *J. Small Anim. Pract.* 55, (6), 10-68.
- McLennan K.M., Rebelo C.J.B., Corke M.J., Holmes M.A., Leach M.C., Constantino- Casas F., 2016. Corrigendum to "Development of a facial expression scale using footrot and mastitis as models of pain in sheep". *Appl. Anim. Behav. Sci.* 176 ;19-26.
- Melches S., Mellema S.C., Doherr M.G., Wechsler B., Steiner A., 2007. Castration of lambs: A welfare comparison of different castration techniques in lambs over 10 weeks of age. *The Veterinary Journal* 173, 554-563.
- Melendez P., Bartolome J., Archbald L.F., Donovan A., 2003. The association between lameness, ovarian cysts and fertility in lactating dairy cows. *Theriogenology* 59(3-4): 927-937.
- Mellema S.C., Doherr M.G., Wechsler B., Thueer S., Steiner A., 2006. Influence of local anaesthesia on pain and distress induced by two bloodless castration methods in young lambs. *The Vet. J.*, 172, 274-283.
- Meintjes R.A., 2012. An overview of the physiology of pain for the veterinarian. *The Vet. J.*, 193, 344-348.
- Mølgaard L., Damgaard B.M., Bjerre-Harpøth V., Herskin M.S., 2012. Effects of percutaneous needle liver biopsy on dairy cow behavior. *Res. in Vet. Sci.*, 93, 1248-1254.

- Molony V., Kent J.E., Robertson I.S., 1995. Assessment of acute and chronic pain after different methods of castration of calves. *Applied Animal Behaviour Science*, 46, 33-48.
- Molony V., Kent J.E., 1997. Assessment of acute pain in farm animals using behavioral and physiological measurements. *J. Anim. Sci.*, 75, 266-272.
- Moreira L.R., Brum E.S., Silva A.R.H., Lutchemeyer de Freitas M., Piccini Teixeira T., Augusti Boligon A., Athayde M., Duarte T., Frescura Duarte M.M.M., Marchesan Oliveira S., Brandão R., 2016. Antinociceptive and anti-inflammatory effect of the *Scutia buxifolia* Reissek stem barks extract. *Phytomedicine* 23, 1021–1028.
- Morton D.B., Griffiths P.H.M., 1985. Guidelines on the Recognition of Pain, Distress and Discomfort in Experimental-Animals and An Hypothesis for Assessment The Veterinary record 431-436.
- Morton, C.M., Reid, J., Scott, E.M., et al. 2005. Application of a scaling model to establish and validate an interval level pain scale for assessment of acute pain in dogs. *am. j. vet. res.* 66, (12), 2154–2166.
- Mormède P., Andanson S., Aupérin B., Beerda B., Guémené D., Malmkvist J., Manteca X., Manteuffel G., Prunet P., Van Reenen CG., Richard S., Veissier I., 2007. Review Exploration of the hypothalamic–pituitary–adrenal function as a tool to evaluate animal welfare. *Physiology & Behavior* 92, 317–339.
- Mialon M.M., Martin C., Garcia F., Menassol J.B., Dubroeucq H., Veissier I., and Micol D., 2008. Effects of the forage-to-concentrate ratio of the diet on feeding behaviour in young Blond d'Aquitaine bulls. *Animal* 2:11, pp 1682–1691.
- Mialon, M.-M., V. Deiss, S. Andanson, F. Anglard, M. Doreau, and I. Veissier. 2012. An assessment of the impact of rumenocentesis on pain and stress in cattle and the effect of local anaesthesia. *Vet. J.* 194(1):55-59
- Murata H., Shimada N., Yoshioka M., 2004. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. *The Vet. J.*, 168, 28-40.
- Nakao J., and Grunet E., 1990. Effects of dystocia on postpartum adrenocortical function in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 73, 2801–2806.
- Newby N.C., Tucker C.B., Pearl D.L., LeBlanc S.J., Leslie K.E., von Keyserlingk M.A.G., Duffield T.F. 2014. An investigation of the effects of ketoprofen following rumen fistulation surgery in lactating dairy cows *Canadien Veterinary Journal* 55, 442–448.
- Ohtsuka H., Kudo K., Mori K., Nagai F., Hatsugaya A., Tajima M., Tamura K., Hoshi F., Koiwa M., Kawamura S., 2001. Acute phase response in naturally occurring coliform mastitis. *J. Vet. Med.*, 63, 675-678.
- Otto K.A., Short C.E., 1998. Pharmaceutical control of pain in large animals. *App. Anim. Behav. Sci.*, 59, 157-169.
- Paulmier, V., Faure, M., Durand, D., Boissy, A., Cognie, J., Eschalier, A., Terlouw, C., 2015. Douleurs animales. 1. Les mécanismes. *INRA Productions Animales* 28 (3), 217-230.

- Paull D.R., Small A.H., Lee C., Palladin P., Colditz I.G., 2012. Evaluating a novel analgesic strategy for ring castration of ram lambs. *Veterinary Anesthesia and Analgesia* 39, 539-549.
- Petersen H.H., Nielsen P.J., Heegaard P.M.H., 2004. Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. *Vet. res.*, 35, 163-187.
- Pepys M.B., Baltz M.L., and Tennent G.A., 1989. Serum amyloid A protein (SAA) in horses: objective measurement of the acute phase response. *Equine Veterinary Journal* 21 (2), 106-109.
- Pibarot P., Dupuis J., Grisneaux E., Cuvelliez S., Plante J., Beauregard G., Bonneau N.H., Bouffard J., Blais D., 1997. Comparison of ketoprofen, oxymorphone hydrochloride, and butorphanol in the treatment of postoperative pain in dogs. *J am vet med assoc.* 15 ; 211 (4) : 438-444.
- Pineteau M., 1933. Comment les bovidés extériorisent la douleur, Vigot frères, paris.
- Pinheiro M.M.G., Miltojevi A.B., Radulovi N.S., Abdul-Waha I.R., Boylan F., Fernandes P.D., 2015. Anti-Inflammatory activity of *Choisya ternate* Kunth Essential Oil, Ternanthranin, and its two Synthetic Analogs (Methyl and PropylN-Methylanthranilates). *Plos One* 2510 (3), 0121063.
- Plas A., 2011. Synthèse stéréosélective de bispindines : vers la conception de nouvelles molécules antalgiques. Thèse doctorale, Université Blaise Pascal Clermont-Ferrand II, France, 242p.
- Politis I., Hidioglou N., White J.H., Gilmore J.A., Williams S.N., Scherf H. and Frigg M., 1996. Effects of vitamin E on mammary and blood leukocyte function, with emphasis on chemotaxis in periparturient dairy cows. *American Journal of Veterinary Research* 57, 468–471.
- Popilskis S., Kohn D., Sanchez JA., Gorman P., Epidural VS., 1991. Intramuscular oxymorphone analgesia after thoracotomy in dogs. *Vet surg.* 20 (6) 462-467.
- Price J., Catriona S., Welsh E.M., Waran N.K., 2003. Preliminary evaluation of post-operative pain in horses following arthroscopic surgery. *vet. anaesth. analg.*, 30, 124-137.
- Pritchett C., et al 2003. Identification of potential physiological and behavioral indicators of postoperative pain in horses after exploratory celiotomy for colic. *Applied animal behaviour science*, 80, p31-43.
- Prunier A., Hay M., Servièrre J., 2002. Evaluation et prévention de la douleur induite par les interventions de convenue chez le porcelet. *Journées de la Recherche Porcine*, 34, 257-268.
- Prunier A., Mounier L., Le Neindre P., Leterrier C., Mormède P., Paulmier V., Prunet P., Terlouw C., Guatteo R., 2013. Identifying and monitoring pain in farm animals: a review. *Animal* 7(06), 998-1010.
- Rialland P., Authier S., Guillot M., 2012. Validation of orthopedic postoperative pain assessment methods for dogs: a prospective, blinded, randomized, placebo-controlled study (ed. g. f. gilestro). *Plos one* 7, (11), e49480.

- Rialland P., 2013. Métrologie de la douleur animale : Validation sur des modèles de douleur viscérale bovine et articulaires canins. Thèse de Docteur en sciences vétérinaires, Université de Montréal, 495pp.
- Richard D., 2013. Livre : neuroscience Edition Dunod
- Robertson I.S., Kent J.E., Molony V., 1994. Effect of different methods of castration on behaviour and plasma cortisol in calves of three ages. Res. in Vet. Sci., 56, 8-17.
- Robin D. Bourgelat et les écoles vétérinaires
http://sfhmsv.free.fr/SFHMSV_files/Textes/Activites/Bulletin/Txts_Bull/B1/Robin_B1.pdf
- Russell W.M.S., Burch R.L., 1959. The principles of human experimental technique, Universities Federation for Animal Welfare (UFAW), Herts, UK : Potters Bar, 1992 (special edition), 238.
- Salonen M., Hirvonen J., Pyorala S., Sankari S., Sandholm M., 1996. Quantitative determination of bovine serum haptoglobin in experimentally induced Escherichia coli mastitis. Research in Veterinary Science 60, 88-91.
- Salter M.W., and Pitcher G.M., 2012. Dysregulated Src upregulation of NMDA receptor activity: a common link in chronic pain and schizophrenia. PubMed Central Canada 279(1), 2–11.
- Salvemini D., Little J.W., Doyle T., Neumann W.L., 2011. Roles of reactive oxygen and nitrogen species in pain. Free Radical Biology and Medicine 51, 951-966.
- Sanford J., Ewbank R., and al. 1986. Guidelines for the recognition and assessment of pain in animals. Vet. rec. 118 (12): 334-338.
- Seksel K., 2009. la douleur et sa gestion : perspectives cliniques, les effets de la douleur sur le comportement de l'animal. rev. sci. tech. oie. vol. 10: 79-91
- Short C.E., 1998. Fundamentals of pain perception in animals. Appl. anim. behav. sci., 59, 125-133.
- Simonsen H.B., Klinken L., Bindseil E., 1991. Histopathology of intact and docked pig tails. British. Veterinary Journal 147(5): 407-412.
- Site Agreste conjoncture: <http://agreste.agriculture.gouv.fr/la-statistique-agricole/>
- Sutton G.A., Paltiel O., Soffer M., Turner D., 2013. Validation of two behaviour-based pain scales for horses with acute colic. The Veterinary Journal 197 ; 646–650.
- Site de l'ANSE: <https://www.anses.fr/fr/thematique/m%C3%A9dicament>
- Smith J.D., Allen S.W., Quandt J.E., Tackett R.L. 1996. Indicators of postoperative pain in cats and correlation with clinical criteria. Am j vet res. 57 (11): 1674-1678.
- Sotocinal S.G., Sorge R.E., Zaloum A., Tuttle A.H., Martin L.J., Wieskopf J.S., (2011). The rat grimace scale: a partially automated method for quantifying pain in the laboratory rat via facial expressions. Molecular pain, 7(55), 1-10.
- Stafford K.J., Mellor D.J., Todd S.E., Bruce R.A., Ward R.N., 2002. Effects of local anaesthesia or local anaesthesia plus a non-steroidal anti-inflammatory drug on the acute cortisol response of calves to five different methods of castration. Research in Veterinary Science 73, 61-70.

- Stafford K.J., Mellor D.J., 2005. Dehorning and disbudding distress and its alleviation in calves. *The Veterinary Journal*, 169, 337–349.
- Starshak T.S., 1987. Diagnosis of lameness. In: Adams et al., editors. *Adams's lameness in horses*. 4th ed. Philadelphia : Lea and Febiger, 100-155.
- Steeds C.E., 2013. The anatomy and physiology of pain. *Surgery* 31:2, 49-53.
- Stewart M., Stafford, K.J., Dowling S.K., Schaefer A.L., Webster J.R., 2008. Eye temperature and heart rate variability of calves disbudded with or without local anaesthetic. *Physiology and Behaviour* 93, 78-797.
- Stoebel D.P., Moberg G.P., 1982. Repeated acute stress during the follicular phase and luteinizing hormone surge of dairy heifers. *Journal of dairy science* 65(1): 92-96.
- Stubsjøen S.M., Knappe-Poindecker M., Langbein J., Fjeldaas T., Bohlin J., 2015. Assessment of chronic stress in sheep (part II): Exploring heart rate variability as a non-invasive measure to evaluate cardiac regulation. *Small Ruminant Research* 133, 30-35.
- Sutherland M.A., Tucker C.B., 2011. The long and short of it : A review of tail docking in farm animals. *App. Anim. Behav. Sci.*, 135, 179-191.
- Taffarel M.O., Luna S.P.L., de Oliveira F.A., Schiess Cardoso G., de Moura Alonso J., Pantoja J.C., Tabarelli Brondani J., Love E., Taylor P., White K., Murrell J.C., 2015. Refinement and partial validation of the UNESP-Botucatu multidimensional composite pain scale for assessing postoperative pain in horses. *BMC Veterinary Research* 11:83
- Taylor P.M., Pascoe P.J., Mama K.R., 2002. Diagnosing and treating pain in the horse: where are we today ? *Vet. Clin. North. Am. Equine Pract.*, 18, 1-19.
- Thüer S., Mellema S., Doherr MG, Wechsler B., Nuss K., Steiner A., 2007. Effect of local anaesthesia on short- and long-term pain induced by two bloodless castration methods in calves. *The Veterinary Journal* 173, 333-342.
- Vaculin S., Franek M., Vejrazka M., 2010. Role of oxidative stress in animal model of visceral pain. *Neuroscience Letters* 477, 82–85.
- Valverde A., 2005. Pain management in horses and farm animals. *J. of Vet. Emerg. and Crit. Care.*, 15, 295-307.
- Van Loon J P.A.M., Jonckheer-Sheehy V.S.M., Back W., René van Weeren P., Hellebrekers L J., 2014. Monitoring equine visceral pain with a composite pain scale score and correlation with survival after emergency gastrointestinal surgery. *The Veterinary Journal* 200, 109–115.
- Viñuela-Fernandez I., Jones E., Welsh E.M., Fleetwood-Walker S.M., 2007. Pain mechanisms and their implication for the management of pain in farm and companion animals. *The Veterinary Journal* 174, 227-239.
- Walkera K.A., Duffield T.F, Weary D.M., 2011. Identifying and preventing pain during and after surgery in farm animals. *Applied Animal Behaviour Science* 135, 259-265.

- Welsh TH., Johnson BH., 1981. Stress-induced alterations in secretion of corticosteroids, progesterone, luteinizing hormone, and testosterone in bulls. *Endocrinology* 109(1): 185-190.
- Yunta C., Guasch I., and Bach A., 2012. Short communication: Lying behavior of lactating dairy cows is influenced by lameness especially around feeding time. *J. Dairy Sci.*, 95, 6546-6549.

Evaluation et soulagement de la douleur chez les ruminants : Intérêt d'une approche multiparamétrique

Résumé : La question du bien-être des animaux d'élevage et plus particulièrement celle de la douleur fait l'objet d'une attente sociétale grandissante. Cependant, l'évaluation de la douleur chez l'animal, et par voie de conséquence de l'efficacité des traitements antalgiques, reste très complexe en médecine vétérinaire, en expérimentation ou en élevage. Elle s'appuie principalement sur les modifications de comportement ou de paramètres physiologiques du système nerveux autonome, de l'axe hypothalamo-hypophysaire ou encore des processus inflammatoires. Néanmoins, les indicateurs généralement utilisés ne sont pas tous spécifiques de la douleur "ressentie" par l'animal mais peuvent également indiquer un niveau de stress ou de perturbations physiologiques et métaboliques liés au traumatisme. Chez les carnivores domestiques ou les chevaux, une approche combinant des indicateurs spécifiques de chacune des voies sollicitées dans les processus douloureux a été développée. Aucune démarche équivalente n'a été validée chez les animaux de rente. Cette thèse conduite sur ovin et bovin avait pour objectifs : 1) de développer une approche multiparamétrique d'évaluation de la douleur, ou de situations potentiellement douloureuses, 2) de tester ses performances dans différentes situations considérées douloureuses (douleurs somatiques et/ou viscérale : mammites, castration et pose de canules digestives), et 3) sur la base de cette approche d'évaluer l'efficacité de protocoles antalgiques utilisés en élevage ou en expérimentation animale. Nous montrons que (i) l'approche multiparamétrique est plus performante qu'une approche voie par voie, (ii) les modifications du comportement, de l'axe hypothalamo-hypophysaire et de l'inflammation discriminent des situations potentiellement douloureuses quel que soit le type de douleur alors que les modifications liées au stress oxydant sont davantage liées aux situations présentant des douleurs d'origine viscérale et somatique, (iii) l'approche multiparamétrique différencie les périodes les plus critiques à prendre en charge en fonction de la douleur ressentie et (iv) il est possible de proposer des ajustements des traitements antalgiques en utilisant les renseignements fournis par chacune des voies évaluées. En prenant en compte l'ensemble des principales voies impliquées dans les processus douloureux, l'évaluation de la douleur ressentie, peut donc être plus sensible et spécifique. Néanmoins, l'approche multiparamétrique gagnera à être simplifiée et devra être validée dans d'autres situations douloureuses, notamment dans le cas de douleurs neuropathique, avant d'être proposée sur le terrain aux vétérinaires, éleveurs ou expérimentateurs.

Mots clés : *douleurs animales, approche multiparamétrique, ruminants, évaluation*

Pain assessment and its relief in ruminants: benefits of a multiparametric approach

Summary: There is a growing societal concern regarding farm animal welfare and especially pain assessment. However, pain assessment in animals and the efficiency of analgesic treatments remains very complex in veterinary medicine, animal experimentation or farming. Pain assessment is mainly based on behavioural changes or physiological responses related to the autonomic nervous system, hypothalamic-pituitary axis or inflammatory processes. Nevertheless, the indicators usually used do not always reflect pain experienced by animals but can also reflect the level of stress or physiological and metabolic disturbances related to trauma. Combinations of pathway-specific indicators involved in pain have been developed in various animal species (carnivore pets and horses), but no equivalent approach has been validated for farm ruminants yet. The main objectives of this thesis were 1) to develop a multiparametric approach to assess pain in sheep and cattle, 2) to test its performances in different painful situations (somatic and/or visceral pain: mastitis, castration and digestive cannulas), and 3) to assess the efficiency of analgesic treatments currently used in farming or research. We showed that (i) the multiparametric approach is more efficient than a single pathway approach (ii) changes in behaviour, hypothalamic-pituitary axis, and inflammation discriminate potentially painful situations regardless of the type of pain, whereas changes related to oxidative stress are related to visceral and somatic painful situations, (iii) the multiparametric approach differentiates the most critical periods requiring specific pain management (to be managed according to the pain), and (iv) it is possible to adjust the analgesic treatments according to the information provided by the assessment of each pathway. In conclusion, taking into account the main pathways involved in painful processes, allows a more sensitive and specific pain evaluation. Further research should aim at simplifying the multiparametric approach and validating it against other painful situation (especially neurological pain) before proposing it for practical-use on field by veterinarians, farmers and researchers.

Key words: *animal pains, multiparametric approach, ruminants, assessing processes*
