

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire



Domaine : Sciences de la nature et de la vie
Filière : Sciences vétérinaires

Mémoire de fin d'études

Pour l'obtention du diplôme de Master
En Médecine vétérinaire

THEME

**Méthode non invasive d'évaluation du stress : analyse
de la concentration du cortisol pileire chez les chevaux
d'un centre hippique de la région d'Alger.**

Présenté par :

Melle SILI Amira.

Soutenue publiquement, le 21/09/2023 devant le jury :

Mme AINOUZ Lynda

MCA (ENSV)

Présidente

Mme BOULBINA Ibtissem

MAA (ENSV)

Examinatrice

Mme ILÈS Imène

MCA (ENSV)

Promotrice

Année : 2022/2023

Déclaration sur l'honneur

Je soussigné SILI Amira, déclare être pleinement consciente que le plagiat de documents ou d'une partie d'un document publiés sous toute forme de support, y compris l'internet, constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée. En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées pour écrire ce mémoire.

Signature

Remerciements

À Madame AINOUZ Lynda,

Maitre de conférences à l'École Nationale Supérieure Vétérinaire d'Alger,

Qui m'a fait le grand honneur d'accepter la présidence de mon jury de mon mémoire de master

Hommage respectueux

À Madame BOULBINA Ibtissem,

Maitre assistante à l'École Nationale Supérieure Vétérinaire d'Alger,

Qui m'a fait l'honneur de participer à mon jury de mon mémoire de master en qualité d'assesseur,

Hommage reconnaissant

À Madame ILÈS Imène,

Maitre de conférences à l'École Nationale Supérieure Vétérinaire d'Alger,

Qui a encadré l'élaboration de ce mémoire de master avec une disponibilité, une gentillesse, une implication et une patience.

Mes sincères remerciements

Dédicace

Mes remerciements s'adressent d'abord au bon Dieu, de m'avoir donné l'ambition et le courage pour accomplir ce travail

Je dédie ce travail en guise de respect, de reconnaissance et de remerciements :

À ma chère famille

À la famille Cherfaoui

À mon ami Khaled

À mes professeurs qui ont toujours cru en mes compétences

Au président du club équestre de Bordj El Kiffan Mr Lekouara et Dr Taleb

Et en dernier, à moi-même.

TABLE DES MATIÈRES

Introduction	1
Partie Bibliographique	3
I. Physiologie du stress	4
1. Définition du stress.....	4
2. Prise en charge du stress par le cerveau	4
3. Syndrome général d'adaptation.....	5
4. Mécanismes neuroendocriniens du stress	6
4.1 Les mécanismes centraux	6
4.2 Le système nerveux orthosympathique.....	7
4.3 L'axe corticotrope	7
4.4 Le cortisol	9
5. Facteurs et types de stress	11
5.1 Facteurs de stress	11
5.2 Types de stress	12
II. Méthodes d'évaluation du stress.....	15
1. Observation du comportement	15
2. La fonction cardiaque	16
3. La fonction respiratoire	17
4. La température corporelle	17
5. Dosage du cortisol dans les matrices biologiques	18
Partie Expérimentale	27
I. Matériel et méthodes.....	28
II. Résultats.....	38
III. Discussion.....	43
Conclusion	46
Bibliographie.....	48
Annexes	60

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I Aperçu de quelques méthodes de dosage du cortisol pilaire chez le cheval.....	26
Tableau II Résumé de la capacité de la matrice pilaire à mesurer le cortisol chez les animaux.....	27
Tableau III Caractéristiques des chevaux de l'étude.	29
Tableau IV Concentration du cortisol pilaire exprimée en pg/mg	39
Tableau V Tableau de contingence représentant le nombre des échantillons à cortisol pilaire supérieur au seuil de détection.....	40
Tableau VI Tableau de contingence représentant le nombre des échantillons à cortisol pilaire supérieur au seuil de détection en fonction de l'âge.	40
Tableau VII Tableau de contingence représentant le nombre des échantillons à cortisol pilaire supérieur au seuil de détection en fonction du sexe.	41
Tableau VIII Tableau de contingence représentant le nombre des échantillons à cortisol pilaire supérieur au seuil de détection en fonction de la couleur des robes	41
Tableau IX Valeurs moyennes du cortisol pilaire , regroupées par âge, sexe et couleur de pelage	42

LISTE DES FIGURES

Figure 1 Schéma du cerveau.....	5
Figure 2 Schéma de l'axe hypothalamo-hypophyso-corticosurrénalien	8
Figure 3 Schéma des surrénales, montrant les différentes zones du cortex.....	9
Figure 4. Schéma de biosynthèse du cortisol.	10
Figure 5 Modifications structurales et fonctionnelles du cerveau suite à un stress chronique.	14
Figure 6 Illustration du comportement d'alerte d'un cheval.	16
Figure 7 Infographie de l'incorporation de cortisol dans la matrice pilaire à partir du sang.	23
Figure 8 Voies d'incorporation du cortisol dans la tige. Le cortisol sanguin, principale source, est marqué par des hexagones verts et le cortisol provenant d'autres sources par des hexagones bleus.	24
Figure 9 Le club hippique populaire de Bordj El Kiffan.....	28
Figure 10 Logo du club hippique de Bordj El Kiffan.....	28
Figure 11 Rasage des poils avec une tondeuse électrique.	31
Figure 12 Garrot d'un cheval après rasage.	31
Figure 13 Ajout de l'isopropanol aux tubes.	32
Figure 14 Tubes polypropylènes identifiés.	32
Figure 15 Poils coupés aux ciseaux fins.	33
Figure 16 Microtubes identifiés.....	33
Figure 17 Microtubes agités au bain marie	34
Figure 18 Bain marie à agitation Julaba SW22	34
Figure 19 Microtubes sous hotte à flux d'air constant.	35
Figure 20 Microcentrifugeuse SIGMA	35
Figure 21 Emplacements des tubes à l'automate.....	36
Figure 22 Analyseur d'immunoanalyse automatique MAGLUMI 600.	36
Figure 23 Kit de dosage du cortisol (CLIA).....	37

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Abréviation	Signification
ACTH	Adrénocorticotrophine ou hormone adrénocorticotrope
CBG	Corticosteroid Binding Globuline
CLIA	Chemiluminescence immunoassay
cm	Centimètre
CRH	Corticotropin Releasing hormone
FSH	Follicle Stimulating hormone
EIA	Enzyme immunoassay
GABA	Acide gamma-aminobutyrique
GnRH	Gonadotropin Releasing hormone
GR	Récepteur des glucocorticoïdes
HD	Déshydrogénase
HO	Hydroxylase
HPLC	High performance liquid chromatography
I	Isomérase
IL-2	Interleukine 2
L	Litre
LC-MS/MS	Liquid Chromatography coupled to tandem Mass Spectrometry
LDL	Low density lipoproteins
LH	Luteinizing hormone
m ²	Mètre carré
MAX	Maximum
MIN	Minimum

mL	Millilitre
mm	Millimètre
N	Effectif de l'échantillon
ng/mL	Nanogramme par millilitre
PBS	Phosphate-buffered saline
pg/mg	Picogramme par milligramme
P450-scc	Enzyme de clivage de la chaîne latérale du cholestérol
RIA	Radioimmunoassay
RPM	Rotation par minute
UV	Ultraviolet
%	Pourcentage
°C	Degré Celsius
µg/mg	Microgramme par milligramme

Résumé

La mesure de la concentration de cortisol pilaire est une méthode non invasive qui offre des avantages dans l'évaluation du stress chronique.

Notre étude a pour objectif de déterminer les valeurs usuelles du cortisol pilaire chez les chevaux d'un centre équestre de la région d'Alger. Elle a été réalisée au niveau du Club Hippique Populaire de Bordj El Kiffan et a porté sur un effectif total de vingt-et-un chevaux, de race Barbe et Arabe-barbe. L'âge des chevaux a varié entre un mois et demi et 27 ans, avec une moyenne de $8 \pm 6,48$ ans. Des échantillons de poils d'au moins 150 mg ont été collectés, par rasage, au niveau du garrot gauche, et ont été stockés à température ambiante. Lors de la procédure d'extraction du cortisol, chaque échantillon a été lavé à l'isopropanol, séché à température ambiante puis broyé. Une quantité de 50 mg de poudre de poils de chaque échantillon a été mis en incubation avec du méthanol pour l'extraction du cortisol. Le cortisol pilaire des échantillons a été analysé en utilisant l'immunodosage par chimiluminescence.

Les résultats ont montré que 76,2% des échantillons ont présenté une concentration pilaire de cortisol inférieure au seuil de détection ($<0,18$ pg/mg). Ce taux n'a pas été influencée par l'âge, le sexe ou la couleur de la robe ($p > 0,05$). La concentration moyenne en cortisol pilaire calculée pour les valeurs supérieures au seuil de détection, a été de $13,7 \pm 20,9$ pg/mg ($n=5$). Les concentrations minimale et maximale détectées ont été respectivement de 1,25 pg/mg et 55,25 pg/mg.

Notre étude a révélé d'importantes variations entre les individus. Des investigations plus approfondies permettront de déterminer la plage physiologiquement normale du cortisol pilaire chez le cheval afin de différencier entre les variations physiologiques normales et les valeurs pathologiques.

Mots clés : Cortisol pilaire, stress chronique, cheval, bien-être.

Abstract

Measuring hair cortisol concentration is a non-invasive method that offers advantages in the assessment of chronic stress.

Our study aims to determine the usual values of hair cortisol in horses from an equestrian center in the region of Algiers. It was carried out at the Club Hippique Populaire of Bordj El Kiffan and involved a total of twenty-one horses, of the Barb and Arab-barb breed. The age of the horses varied between a month and a half and 27 years, with an average of 8 ± 6.48 years. Hair samples of at least 150 mg were collected, by shaving, from the left withers, and were stored at room temperature. During the cortisol extraction procedure, each sample was washed with isopropanol, dried at room temperature and then ground. A quantity of 50 mg of hair powder from each sample was incubated with methanol for the extraction of cortisol. The hair cortisol of the samples was analyzed using chemiluminescence immunoassay.

The results showed that 76.2% of the samples presented a hair cortisol concentration below the detection threshold (<0.18 pg/mg). This rate was not influenced by age, sex or coat color ($p>0.05$). The average hair cortisol concentration calculated for values above the detection threshold was 13.7 ± 20.9 pg/mg ($n=5$). The minimum and detected concentrations were respectively 1.25 pg/mg and 55.25 pg/mg maximum.

Our study revealed significant variations between individuals. Further investigations can determine the physiologically normal range of hair cortisol in horses in order to differentiate between normal physiological variations and pathological values.

Keywords: Hair cortisol, chronic stress, horse, well-being.

ملخص

يعد قياس تركيز الكورتيزول في الشعر طريقة غير جراحية توفر مزايا في تقييم الإجهاد المزمن تهدف دراستنا إلى تحديد القيم المعتادة لهرمون الكورتيزول في الشعر لدى الخيول من أحد مراكز الفروسية بمنطقة الجزائر العاصمة. تم تنفيذه في نادي الفروسية الشعبي ببرج الكيفان وشارك فيه واحد وعشرون حصانا من سلالاتي البربري وعربي بربري. وتراوحت أعمار الخيول بين شهر ونصف و 27 سنة بمتوسط $6.48 \pm$ سنة. تم جمع عينات شعر لا تقل عن 150 ملغ، عن طريق الحلاقة، من الحارك الأيسر، وتم تخزينها في درجة حرارة الغرفة. أثناء إجراء استخراج الكورتيزول، تم غسل كل عينة بالأيزوبروبانول، وتجفيفها في درجة حرارة الغرفة ثم طحنها. تم تحضير كمية 50 ملغ من مسحوق الشعر من كل عينة مع الميثانول لاستخلاص الكورتيزول. تم تحليل الكورتيزول العينات باستخدام المقايصة المناعية الكيميائية أظهرت النتائج أن 76.2% من العينات أظهرت تركيز الكورتيزول في الشعر أقل من عتبة الكشف ($0.18 >$) كان متوسط تركيز ($P > 0.05$) بيكوغرام/ملغ). ولم يتأثر هذا المعدل بالعمر أو الجنس أو لون المعطف الكورتيزول في الشعر المحسوب للقيم التي تزيد عن عتبة الكشف 13.7 ± 20.9 بيكوغرام / ملغ ($n = 5$). وكانت التركيزات الدنيا والمكتشفة على التوالي 1.25 بيكوغرام/ملغ و 55.25 بيكوغرام/ملغ كحد أقصى كشفت دراستنا عن اختلافات كبيرة بين الأفراد. مزيد من التحقيقات يمكن تحديد النطاق الطبيعي من الناحية الفسيولوجية للكورتيزول الشعر في الخيول من أجل التمييز بين التغيرات الفسيولوجية الطبيعية والقيم المرضية

الكلمات المفتاحية: كورتيزول الشعر، التوتر المزمن، الحصان، الرفاهية

Introduction

Biologiquement parlant, la domestication peut être considérée comme un processus évolutif conduisant à l'adaptation des animaux à leur environnement captif. Ce processus implique l'apparition de modifications génétiques entre les générations, ainsi que d'événements développementaux induits par l'environnement de façon récurrente (Price, 1999).

Après avoir été utilisé de très nombreuses années comme moyen de transport majoritaire ou encore comme outil de guerre, l'utilisation du cheval se résume aujourd'hui quasiment exclusivement au sport, au loisir et depuis peu à la thérapie via la médiation animale. Dans certaines régions du globe, les chevaux sont également toujours utilisés en agriculture comme moyen de traction (Pritchard et al. 2005). Son utilisation dans les pays industrialisés se répartit aujourd'hui entre l'équitation sportive et récréative, l'élevage et la production alimentaire (viande, lait) (Thorell et Hedenborg, 2015).

Un ensemble d'études, réalisé sur un grand nombre de chevaux vivants en conditions domestiques, ont permis d'établir un constat assez général des atteintes au bien-être directement liés à aux conditions de vie apportées aux animaux. Ainsi, des chevaux qui avaient au moins un problème de santé chronique, exprimaient au moins un comportement répété anormal et étaient agressifs envers l'homme (Rochais et al. 2016).

L'évaluation du stress chez le cheval est un besoin récurrent, tant dans le but de comparer des individus confrontés à des circonstances similaires que pour mesurer l'impact des situations dans lesquels ces animaux évoluent (Pawluski et al, 2018). Cette évaluation du stress revêt une importance cruciale, car elle peut engendrer des coûts biologiques supplémentaires pour faire face au stress, déviant ainsi les ressources de fonctions biologiques telles que l'immunité, la reproduction ou la croissance (Turner et al., 2012).

Le cortisol, considéré comme l'hormone de stress par excellence, a été largement utilisé comme mesure du stress physiologique en réponse à des conditions sociales, biologiques et/ou environnementales (Kirschbaum et al., 2009). Le cortisol augmente significativement lors de situations de stress aigu. Cependant, il est essentiel de comprendre que le bien-être d'un individu peut être grandement compromis lorsque le stress devient chronique (Pawluski et al, 2018).

Les techniques traditionnelles pour mesurer la production de cortisol (sang, matières fécales, urine et salive) se sont avérées efficaces pour évaluer de manière adéquate les réponses à court

terme aux facteurs de stress (Russell et al, 2015). La mesure de la concentration de cortisol pileux est une méthode non invasive qui offre des avantages dans l'évaluation du stress chronique et a été utilisée comme archive de l'activité hypothalamo-hypophyso-surrénalienne (Meyer et al., 2014).

Bien que les concentrations du cortisol pileux aient été évaluées chez plusieurs espèces (Roth et al. 2016), seules quelques études récentes ont analysé le cortisol pileux chez les chevaux.

Ce mémoire vise à évaluer les concentrations du cortisol pileux chez les chevaux d'un centre équestre de la région d'Alger. Notre étude abordera également les divers facteurs susceptibles d'influencer les niveaux de cortisol pileux chez les chevaux du club équestre, tels l'âge, le sexe ou la couleur de la robe.

La partie bibliographique de ce mémoire est scindée en deux chapitres. Le premier chapitre aborde la physiologie du stress et les mécanismes neuroendocriniens impliqués. Ce chapitre fournira un aperçu des différents types et facteurs de stress auxquels les chevaux peuvent être exposés.

Dans le deuxième chapitre de notre mémoire, nous nous pencherons sur les différentes méthodes d'évaluation du stress en mettant l'accent sur le dosage du cortisol pileux. Nous discuterons des avantages et des limites de chacune des méthodes, en mettant en évidence leurs spécificités et leur pertinence dans divers contextes.

La partie expérimentale de notre étude est consacrée à la détermination des concentrations du cortisol pileux chez les chevaux d'un centre équestre de la région d'Alger : la procédure de collecte des échantillons de poils des chevaux, l'analyse au laboratoire pour quantifier le taux de cortisol pileux, la comparaison des taux de cortisol entre les différents chevaux, et enfin, l'interprétation des résultats en tenant compte des facteurs de variations.

Partie Bibliographique

I. Physiologie du stress

L'objectif de la réaction de stress est de restaurer l'homéostasie de l'organisme qui subit une agression, afin de le maintenir conformément aux normes vitales (Brisville, 2006).

1. Définition du stress

La définition du terme "stress" a engendré de nombreux débats parmi les chercheurs, en partie en raison de ses multiples contextes d'utilisation et de sa variété de domaines d'application. Le stress peut être conceptualisé comme un état où l'homéostasie est perturbée suite à l'exposition à un facteur stressant (Sapolsky et al, 2000). Actuellement, le stress englobe trois aspects (Romero et Butler, 2007) :

- Le stimulus environnemental qui déclenche le stress, c'est-à-dire le facteur générateur de stress.
- La réaction physiologique et psychologique à ces stimuli.
- Les pathologies résultant de la répétition des réactions physiologiques et psychologiques face à ces stimuli

2. Prise en charge du stress par le cerveau

La gestion du stress se déroule en trois phases distinctes :

- Réception du stimulus stressant par les organes sensoriels.
- Programmation de la réaction au stress au niveau cérébral.
- Activation de la réponse au stress par le cerveau (Bartolami, 2015).

En ce qui concerne la réception, les informations sensorielles sont acheminées au cortex et au système limbique (Figure 1) par les voies afférentes. Pour la programmation, le cortex et le système limbique effectuent une analyse comparative. Cette analyse consiste à confronter les caractéristiques du stress actuel à une base de données mnésique. Cette base stocke les

expériences passées de stress, ainsi que les réactions adoptées et leur efficacité adaptative. Cette étape permet de formuler la réponse la plus appropriée pour faire face à la situation stressante. Quant au déclenchement, l'amygdale et l'hippocampe activent à la fois le système nerveux autonome orthosympathique et le système neuroendocrinien (Bartolami, 2015).

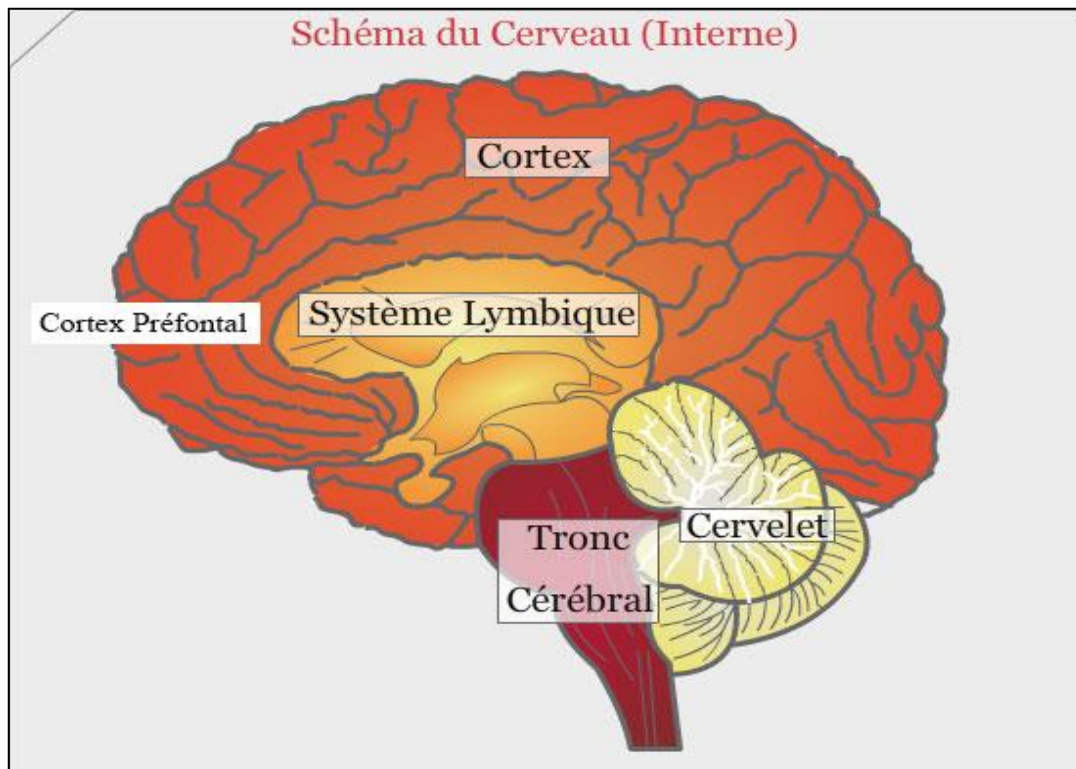


Figure 1 Schéma du cerveau.

Source : Mewtow, 2013

3. Syndrome général d'adaptation

Le syndrome général d'adaptation représente le mécanisme de la réponse au stress, qui consiste à la mise en place d'une réponse adaptée de l'organisme. Selon Hans Selye, la réponse au stress s'organise en 3 phases, de façon non spécifique quel que soit le facteur de stress (Selye, 1946) : la phase d'alarme, la phase de résistance et la phase d'épuisement.

La phase d'alarme est le premier stade ; elle correspond à l'activation du système nerveux autonome sympathique. Elle a pour conséquence de multiples effets biologiques, visant à aider l'animal à survivre face une menace comme une attaque de prédateur. Les catécholamines conduisent à des réponses de type « fight-or-flight » (combattre ou fuir) car elles ont un effet immédiat sur la réactivité et l'activité de l'animal (Romero et Butler, 2007). Elle exerce des effets immédiats sur le système cardiovasculaire, le métabolisme général et le système nerveux central (Lucarelli, 2011).

La phase de résistance succède à la réaction d'alarme. L'organisme cherche à restaurer l'homéostasie et à protéger l'organisme. Cette phase met en jeu des systèmes complexes endocriniens organisés en axes hypothalamo-hypophysaire-glandes endocrines, responsables de modifications endocrines au long terme. L'axe corticotrope mettant en jeu les glucocorticoïdes est particulièrement sollicité durant cette phase (Bartolami, 2015).

La phase d'épuisement représente la troisième phase au cours de laquelle diverses maladies vont pouvoir se développer, jusqu'à mettre en péril la survie de l'individu à l'issue du développement de carences ou à une baisse de résistance aux agents pathogènes de l'environnement (Brisville, 2006). La phase d'épuisement apparaît suite à un échec du stade de résistance, elle est caractérisée par une élévation persistante des glucocorticoïdes.

4. Mécanismes neuroendocriniens du stress

4.1 Les mécanismes centraux

Les organes sensoriels et les innervations afférentes réceptionnent les informations. Le cortex et le système limbique réalisent une analyse comparative entre le stress perçu et les expériences affectives passées, afin d'élaborer une réponse adaptée. Enfin, l'amygdale et l'hippocampe par l'intermédiaire de l'hypothalamus et de la formation réticulée déclenchent une réponse coordonnée au stress (Lucarelli, 2011), grâce à une activation du système nerveux orthosympathique et de l'axe corticotrope.

4.2 Le système nerveux orthosympathique

Le système nerveux orthosympathique est une composante du système nerveux végétatif. Lors d'un stress, l'activation du système nerveux orthosympathique est immédiate (Lucarelli, 2011) et utilise comme médiateurs les catécholamines (l'adrénaline, la noradrénaline et la dopamine) (Bartolami, 2015). Ce système s'active en cas d'alerte et stimule le catabolisme, afin, à l'issue de l'ensemble de ses réactions induites, de lutter ou de fuir (Rochette et Vergely, 2017). En conséquence de la production de catécholamines, une série de processus physiologiques est activée (Squires, 2003) :

- Effets sur le métabolisme : Relargage du glucose par néoglucogenèse par une activation directe des récepteurs α -adrénergiques dans le foie et lipolyse par l'intermédiaire des récepteurs β 3- adrénergiques présents sur la membrane cellulaire des adipocytes.
- Effets sur le système cardiovasculaire : une vasoconstriction périphérique induite par la stimulation des récepteurs alpha 1 adrénergiques, augmentation de la fréquence cardiaque et de la pression artérielle par stimulation des récepteurs β -adrénergiques
- Appareil respiratoire : Augmentation des échanges gazeux dans les poumons
- Système immunitaire : Prolifération des lymphocytes B, sécrétion de cytokines (IL-2) et redistribution des leucocytes sanguins
- Système gastro-intestinal : Diminution de l'activité viscérale et arrêt de la digestion

4.3 L'axe corticotrope

Également appelé l'axe hypothalamo-hypophyso-corticosurrénalien, l'axe corticotrope est le principal système impliqué dans l'initiation et la coordination de la réponse au stress (Burdett, 2019), et agit en synergie avec le système nerveux orthosympathique. L'hypothalamus est l'élément central et le point de départ d'une cascade de sécrétions hormonales (Figure 2). Après avoir intégré l'élément stressant, le CRH (Corticotropin releasing hormone ou corticolibérine) est synthétisé par les neurones du noyau paraventriculaire de l'hypothalamus. Il va être libéré dans les piliers du système porte hypothalamo-hypophysaire et stimuler l'antéhypophyse en activant la sécrétion d'ACTH (Mormede, 1988), peptide synthétisé par les cellules corticotropes de l'antéhypophyse. L'ACTH stimule ensuite le cortex surrénalien pour qu'il sécrète du cortisol,

qui est la principale hormone glucocorticoïde chez les équins (Dolomie-Fagour et Corcuff, 2008). Chez la majorité des mammifères, le cortisol est le glucocorticoïde dominant. Chez les rongeurs, le lapin et la volaille, c'est la corticostérone qui est le principal glucocorticoïde. Lorsque le taux de cortisol dans le sang est suffisant, il exerce un feedback négatif sur l'hypophyse et l'hypothalamus afin de diminuer la production de CRH et d'ACTH (Battut, 1988).

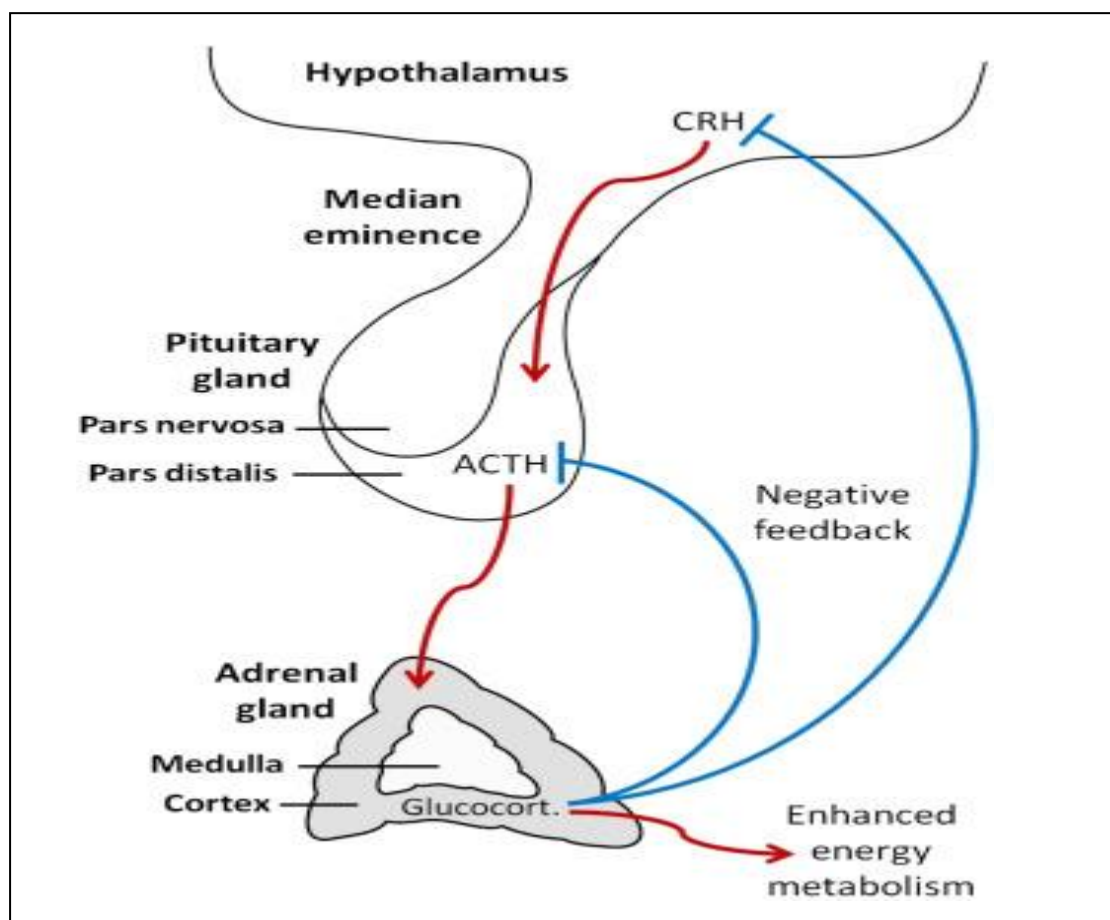


Figure 2 Schéma de l'axe hypothalamo-hypophyso-corticosurrénalien

Source : Hogg et al, 2018

4.4 Le cortisol

Le cortisol est une hormone stéroïde composée de 21 atomes de carbone. Il est synthétisé par la zone fasciculée du cortex surrénalien (Figure 3). La synthèse du cortisol débute par l'hydrolyse d'esters de cholestérol (Figure 4), stockés dans les gouttelettes lipidiques des cellules de la zone fasciculée. Sous l'action de l'ACTH, le cholestérol stocké dans les gouttelettes lipidiques entre dans les mitochondries des mêmes cellules, il est alors pris en charge par la P450-scc qui est à l'origine de la synthèse de prégnénolone, stéroïde à la base de la synthèse des glucocorticoïdes et minéralocorticoïdes. Après trois hydroxylations, le cortisol est produit et sécrété immédiatement après sa synthèse (Debuigne, 2016).

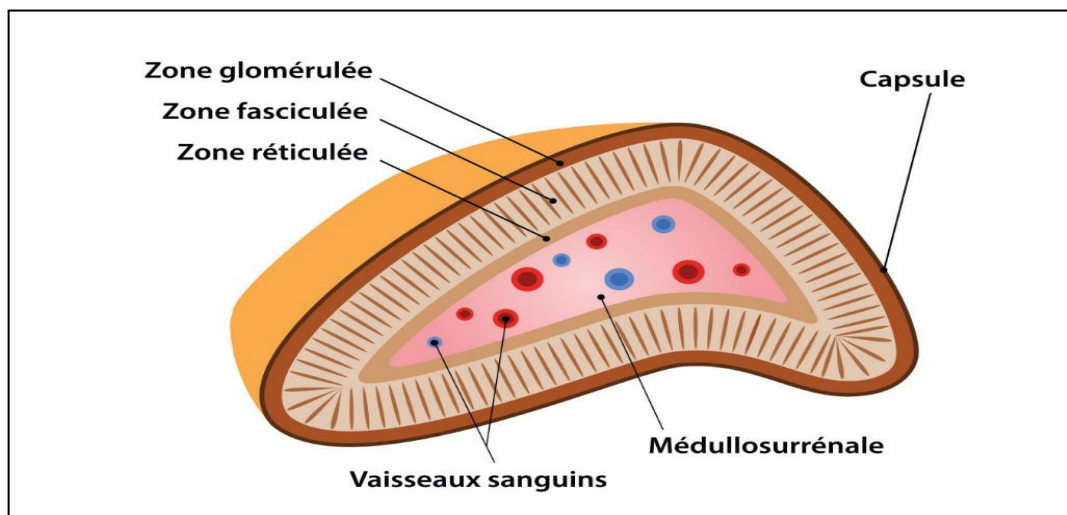


Figure 3 Schéma des surrénales, montrant les différentes zones du cortex

Source : Turquetil et Reznik, 2019

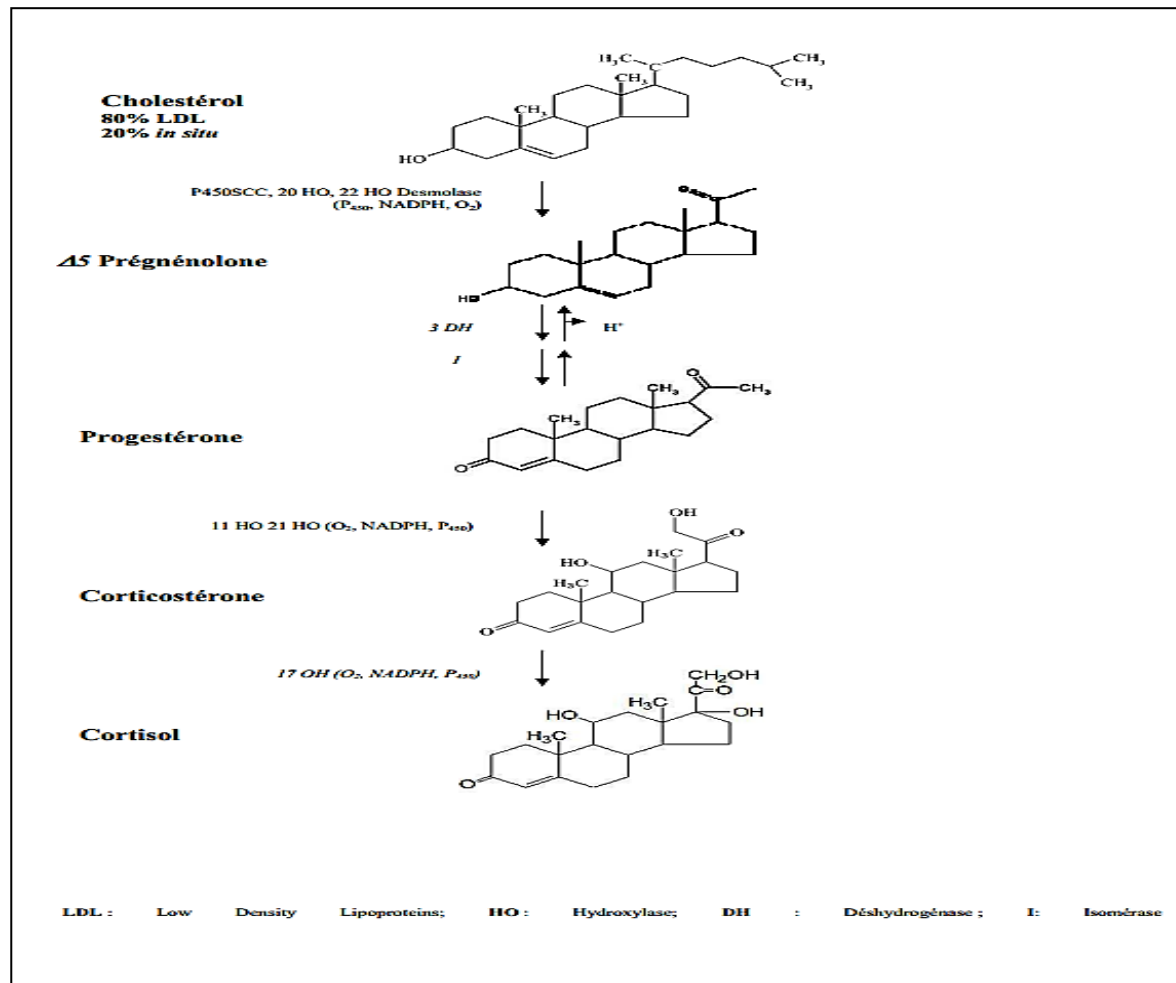


Figure 4. Schéma de biosynthèse du cortisol.

Source : Lapeyrade., 2014

Dans le sang, le cortisol circule majoritairement sous forme liée à une protéine spécifique, la transcortine ou Cortisol Binding Globulin (CBG) et de manière minoritaire, sous forme libre (Hawley et al, 2016). La CBG est une glycoprotéine monomérique essentiellement synthétisée par le foie et qui lie avec une haute affinité le cortisol. Dans des conditions corporelles normales, le cortisol est soumis à des rythmes circadiens, étant les plus élevés tôt le matin et diminuant tout au long de la journée (Oster et al, 2017).

Le cortisol exerce de nombreux effets biologiques :

- Effets métaboliques : le cortisol possède un effet hyperglycémiant, il favorise la néoglucogenèse par dégradation des protéines d'origine musculaire et qui seront des précurseurs

glucidiques (acides aminés glucoformateurs). Il a un effet hyperlipidémiant en augmentant la lipomobilisation (Bret, 2008).

- Effet sur l'équilibre hydro-électrolytique : le cortisol agit comme un agoniste partiel de l'aldostérone, il induit la rétention sodée et hydrique et permet de rétablir la volémie et la pression artérielle (Ganong, 2005).

- Effet sur la reproduction : le cortisol agit en réprimant la synthèse de GnRH et des gonadotrophines hypophysaires (FSH, LH), à l'origine d'un phénomène de castration chimique (Nedelec, 2012).

- Effet sur le système immunitaire : le cortisol a un effet immunosuppresseur, il réprime la production d'immunoglobulines (Fairen, 2006) et la synthèse de cytokines inflammatoires et réduit le nombre de lymphocytes circulant.

- Effet sur la réponse inflammatoire : le cortisol possède une action anti-inflammatoire; il inhibe la production de cytokines pro inflammatoires et stimule au contraire les cytokines anti-inflammatoires, d'où une diminution de la réaction inflammatoire. (Fairen, 2006).

- Effet sur l'appareil cardio-vasculaire : il sensibilise ce système à l'action de la noradrénaline. Il conduit de ce fait à un renforcement de la vasoconstriction (Grossman, 1983).

5. Facteurs et types de stress

5.1 Facteurs de stress

Le stress est perçu par l'organisme comme une menace pour l'homéostasie (Chrousos, 1995). Des stimuli externes et internes en sont à l'origine, que l'on regroupe sous le terme de facteurs stressants. Il existe une grande diversité au sein de ces facteurs, allant de l'hémorragie à l'approche d'un prédateur. On les classe en fonction de leurs effets physiologiques (Farland, 1999). Trois concepts du stress ont été donnés, le stress comme stimulus environnemental, le stress comme réponse subjective et le stress comme réponse biologique (Dumont et Plancherel, 2001).

La complexité de la notion de stress s'explique par la diversité de la nature de certains stimuli. Ils peuvent avoir une origine physique traduite par une atteinte de l'intégrité corporelle qui suscite des modifications organiques à plusieurs niveaux. Une visite médicale, une odeur inhabituelle et inconfortable, un déménagement, un transport, la présence d'un nouveau congénère dans le foyer, un changement d'alimentation de par sa composition ou sa fréquence de distribution, un stress sonore manifesté par des bruits aigus et stridents, une douleur traumatique liée à une altercation avec un autre individu ou post-chirurgicale, une palpation transrectale, une modification de la température ambiante peuvent constituer des facteurs physiques stressants. On peut également envisager des facteurs stressants endogènes, correspondant à une pathologie, comme par exemple un diabète, une pancréatite, ou encore lors d'une alimentation déséquilibrée. Il existe aussi des facteurs stressants de nature psychique dont on ne dispose que de très peu d'informations scientifiques concernant l'animal. Il s'agit plutôt de stress d'ordre psychologique, associé à un syndrome dépressif lors de situations extrêmes comme l'abandon par le propriétaire, le décès de ce dernier ou encore le décès d'un des congénères du foyer (Faure, 2007). Une seconde classification reprend les mêmes éléments mais en distingue deux groupes :

- Les stimuli externes à l'organisme : il s'agit de stimuli physiques appliqués à l'individu, comme les variations de température (qu'elle soit trop élevée ou trop basse), l'apparition d'une plaie traumatique, et également tous types de stimuli sociaux tels que la surpopulation, le confinement voire même l'isolement.
- Les stimuli internes à l'organisme : il s'agit de stimuli d'ordre biochimiques tels que l'hypoglycémie, l'hypovolémie ou l'hypoxie mais on y trouve également les stimuli psychologiques tels la peur ou la douleur (Brisville, 2006).

5.2 Types de stress

Durant la période de stress, l'organisme atteint un nouvel état d'équilibre, qualifié d'allostatique avec l'établissement de nouvelles valeurs de consigne. Quand le stress se maintient ou s'intensifie, l'allostasie ne peut pas se mettre en place et les boucles de régulation sont débordées (Boucher et Plusquellec, 2019). Ce déséquilibre peut s'installer immédiatement ou, sur un temps long.

Selon la condition de la durée des effets, le stress est appelé stress à court terme ou à long terme (Ataallahi et al, 2022). Lorsque le système nerveux central perçoit une menace, une série de réponses de défense biologique générale s'active chez l'animal pour répondre à la menace. Une réaction de stress aiguë se produit généralement après que l'animal a perçu une brève menace,

physique, émotionnelle ou psychologique. Ensuite, l'équilibre physiologique de l'animal se rétablit rapidement, conduisant à une adaptation complète (Hughes et al, 2014). Lors du stress aigu, l'hypothalamus produit une décharge de CRH proportionnelle à celle du stress. Cette décharge engendre la sécrétion d'ACTH elle aussi proportionnelle et modérée. Les glandes surrénales, sensibles à l'ACTH, produisent une sécrétion importante de cortisol qui entraîne l'augmentation détectable de la cortisolémie. Lorsque l'intensité du stimulus stresser augmente, la cortisolémie plafonne. Lors de faible stress, les perturbations de l'axe corticotrope sont discrètes et ne peuvent pas être identifiées par des valeurs ponctuelles de cortisolémie (Mormède, 1995). Le stress aigu entraîne des effets physiologiques et métaboliques tels qu'une augmentation de la fréquence cardiaque, de la fréquence respiratoire, de la pression artérielle, du débit intestinal, de la mobilisation de l'énergie, de la stimulation de la fonction immunitaire, la diminution de l'appétit, la diminution de certains minéraux plasmatiques (potassium, magnésium) et ralentissement du flux digestif dans l'estomac (Trevisi et Bertonni, 2009).

Contrairement au stress aigu, le stress chronique se produit suite à un événement d'excitation physiologique continue (Ataallahi et al, 2022) lorsque le corps subit de multiples facteurs de stress où le système nerveux autonome est incapable d'activer les fonctions physiologiques et comportementales normales d'adaptations (Burnard et al, 2016). Le taux de cortisol restant élevé, le rétrocontrôle négatif ne s'exerce plus correctement. Les taux de CRH et l'ACTH restent élevés et agissent sur les neurones du système limbique (amygdale et hippocampe) et sur l'hypothalamus, en réduisant leur nombre de dendrites et donc de connexions synaptiques (Figure 5). Les neurones GABA qui atténuent le transfert des messages sont moins actifs, favorisant un transfert massif d'informations donc le maintien de l'anxiété. Les excès de ces hormones modifient l'organisation fonctionnelle de ces zones cérébrales. Cette réorganisation est négative pour le cerveau car elle induit des perturbations physiologiques. L'excès de cortisol entraîne le maintien des modifications biologiques constatées durant la gestion de la crise aiguë du stress, or ces troubles favorisent l'hyperglycémie (peut induire un diabète surrénalien), les maladies cardiovasculaires, les infections dues à un déficit immunitaire, donc sont dangereuses pour la santé (Ohayon, 2021)

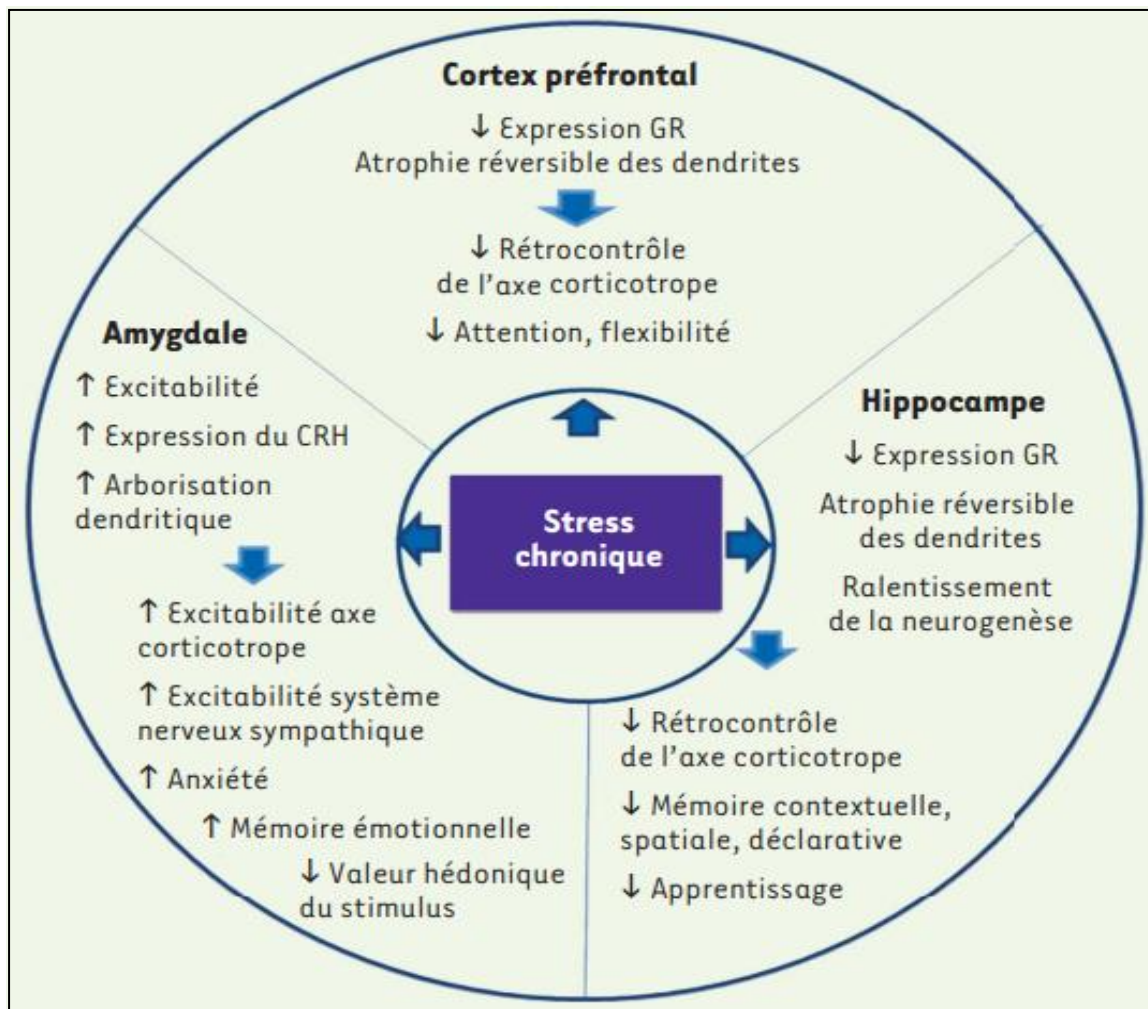


Figure 5 Modifications structurales et fonctionnelles du cerveau suite à un stress chronique.

Source : Moisan et Le Moal, 2012

II. Méthodes d'évaluation du stress

1. Observation du comportement

Le public est sensibilisé aux situations stressantes extrêmes pour le cheval, comme lors d'épuisement en fin de course. Mais le cheval est confronté à d'autres éléments stressants, moins visibles aux personnes non sensibilisées à l'éthogramme et aux besoins naturels du cheval.

Chez le cheval, le stress est associé à des comportements de peur et de réactivité émotionnelle. En situation stressante, une augmentation des comportements locomoteurs (nombre de pas, vitesse et fréquence des déplacements) et une diminution des comportements de repos (immobilité, appui tripédal, yeux mi-clos ou fermés, tête basse) sont observées (Werhahn et al., 2011).

Les comportements d'alerte, de vigilance (Figure 6) (tête relevée, oreilles mobiles, yeux grand ouverts, peu d'appui tripédal, soufflements fréquents, naseaux dilatés, position haute du corps, frissonnements musculaires) augmentent en situation stressante (Heleski et al., 2002). La position en arrière des oreilles serait un indicateur de stress aigu (von Borstel et al., 2009) ou chronique chez le cheval (Fureix et al., 2010).

Le hennissement est une vocalisation de salutation ou de séparation. Il est le plus souvent entendu lorsque deux chevaux sont séparés (Houpt et al., 1982). Lors d'un test d'isolement, des chercheurs ont obtenu une augmentation des vocalisations émises (Harewood et al., 2005). Une étude sur le bien-être des poulains a montré que les individus dont les conditions d'hébergement ont été enrichies ont moins henni (Lansade et al., 2011).

Les comportements d'alimentation tels que la prise de nourriture, les mâchonnements, le temps passé à manger, à brouter, peuvent varier selon le niveau de stress. Une étude a mesuré que le confinement et l'isolement social augmentaient le temps passé ainsi que la fréquence des prises de nourriture dans le box (Mal et al., 1991). D'autres études ont obtenu l'effet inverse et associent une augmentation du temps passé à manger avec l'absence de peur (Viérin et al., 1998). En considérant uniquement les juments hébergées en pâture, Mal et al. (1991) observent que les juments les plus nerveuses broutent des laps de temps plus courts. Les comportements de défécations sont plus fréquents lors d'un test d'isolement (McCall et al., 2006).

Bagshaw et al. (1994) concluent en proposant les comportements suivants lors d'études sur l'évaluation du stress : un cheval marchant en reniflant le sol (comportement exploratoire), la marche ou l'immobilité en position d'alerte (comportement de vigilance). Ils proposent également d'utiliser les fréquences de défécations et de souffles (expiration d'air en position d'alerte) comme indicateurs de stress (Bagshaw et al., 1994).



Figure 6. Illustration du comportement d'alerte d'un cheval.

Source : Haase, 2010

2. La fonction cardiaque

Lorsque l'organisme est soumis à un stress, la stimulation du système nerveux sympathique entraîne la libération de catécholamines, dont la noradrénaline et l'adrénaline, induisant, entre autres, une tachycardie et une hypertension artérielle. De nombreuses études utilisent les variations de ces deux paramètres pour évaluer le stress ressenti par un individu. La mesure de la fréquence cardiaque est une méthode souvent utilisée car elle est non invasive et les données peuvent être facilement collectées. Il faut toutefois se montrer prudent lors de l'utilisation de la

fréquence cardiaque car elle est influencée par de nombreux paramètres comme l'âge, l'activité physique, le comportement du cheval, la douleur, le stress ... C'est bien la variation de cette fréquence cardiaque qui nous donne des indications sur l'état de l'animal (Rietmann et al., 2004).

3. La fonction respiratoire

La fréquence respiratoire est un des paramètres qui peut être modifié lorsque l'organisme subit un stress. Le stress peut induire une bronchodilatation et une hyperventilation. Cette dernière se traduit extérieurement par une augmentation de la fréquence respiratoire. Mais cette tachypnée n'est pas spécifique d'un état de stress, on la retrouve également lorsque l'animal est soumis à un effort physique ou lorsqu'il présente une hyperthermie (De Kermenguy, 2007). Très peu d'études utilisent cet indicateur pour juger de l'état de stress d'un animal car il est peu spécifique et peu sensible.

4. La température corporelle

Les chevaux sont homéothermes grâce à des mécanismes de régulations permettant d'augmenter la production de chaleur ou au contraire d'augmenter les pertes. Grâce à ces mécanismes, les chevaux adultes maintiennent une température corporelle entre 37 et 38.5°C. Le centre de régulation se situe dans la région pré-optique de l'hypothalamus antérieur. Quand un individu est stressé, deux mécanismes entraînent une augmentation de la température corporelle, les contractions musculaires et la stimulation de l'hypothalamus, et elle revient à la normale plusieurs dizaines de minutes voire plusieurs heures après la fin de l'épisode stressant. La température rectale est une valeur proche de la température corporelle et permet de manière relativement simple de suivre l'évolution de ce paramètre. Le suivi de la température semble intéressant pour évaluer l'état de stress d'un individu mais il ne faut pas oublier que, comme les autres paramètres, il est loin d'être spécifique. En effet on peut noter une hyperthermie lors d'un stress mais également lors d'une infection, d'un processus néoplasique, d'une maladie immunitaire, d'une intoxication, d'une maladie inflammatoire non infectieuse etc ... (Desjardins et Cadore, 2004).

5. Dosage du cortisol dans les matrices biologiques

Pour assurer une bonne maîtrise de l'étude, la matrice biologique doit être sélectionnée et préparée avec soin, car chaque type de matrice a ses propres propriétés qui peuvent influencer l'étude. En général, les matrices biologiques animales peuvent être classées en matrices liquides (Le sang, l'urine et la salive), semi-solides (Les excréments) et solides (Les poils). Des études ont montré que le cortisol peut être mesuré dans toutes les matrices susmentionnées. Pour garantir une fiabilité et une précision maximales, la sélection de la matrice pour une étude doit être basée sur les propriétés physicochimiques, le type de la matrice (liquide, semi-solide ou solide), la facilité de collecte et la méthode d'analyse (Ataallahi et al, 2022).

5.1 Les matrices biologiques liquides

Le cortisol peut être mesuré dans tous les types de matrices fluides biologiques car sa composition chimique et propriétés lui permettent de traverser toutes les membranes du corps sans encombre (Smyth, 2013). Il est normal que les taux sanguins de ces biomarqueurs fluctuent tout au long de la journée, et le moment de l'échantillonnage doit être pris en compte lors de l'interprétation des résultats.

5.1.1 Le sang

Le sang est la matrice biologique la plus fréquemment utilisée pour le suivi des biomarqueurs de stress (cortisol, corticostérone). Seulement 5 à 10 % du cortisol sanguin est libre et biologiquement actif ; le reste est lié à des protéines telles que la globuline (Thau et al, 2021). Le sang permet un rendu de résultat rapide et une cadence de dosages importante. Néanmoins, lors de l'analyse des niveaux de stress, il faut tenir compte de la quantité à prélever, de la procédure de centrifugation, et les conditions de stockage. Le prélèvement sanguin lui-même et l'administration d'analgésiques peuvent induire un stress, ce qui va influencer l'interprétation des résultats (Enard, 2008).

5.1.2 La salive

Les progrès technologiques récents ont facilité la mesure du cortisol à partir de fluides biologiques autres que le sang, comme la salive. Un des avantages non négligeables de l'utilisation de la salive

est que son augmentation provoquée par un stress aigu y est plus importante que dans le sang. Son retour à la concentration de base y est également plus rapide que dans le sang (Peeters, 2011). Il existe d'important biais dus à la composition de la salive : les enzymes, la mucine, le pH, le flux salivaire qui chez les jeunes animaux est réduit, et qui peut provoquer des petites lésions buccales à la manipulation (Greenwood et al., 1992). Avant le prélèvement salivaire, l'animal doit rester pendant un délai d'au moins trente minutes sans prise de nourriture ou d'eau (Matos 2015).

5.1.3 L'urine

L'urine est une matrice biologique couramment utilisée pour le dosage de cortisol. Le site majeur de la dégradation des corticoïdes s'effectue dans le foie où ils sont essentiellement réduits sous forme de dérivés hydroxylés et puis éliminés par voie urinaire (Nussey et Whitehead, 2001). La collecte d'urine chez la plupart des animaux domestiques est non invasive et simple. Cependant, recueillir l'urine des animaux sauvages peut être difficile, car ils sont susceptibles d'être moins coopératifs. Le volume urinaire est variable selon les individus, chaque miction présente une concentration hormonale qui est fonction d'un volume émis, la dilution des urines doit donc impérativement être prise en considération (Lapeyrade, 2014). En outre, le cortisol urinaire a une sécrétion pulsatile, le recueil des urines sur 24 heures est pratiquement impossible sans cage à métabolisme (Diquelou, 2009).

5.2 Les matrices biologiques semi-solides

Généralement, les instruments de mesure des biomarqueurs de stress sont conçus pour les mesurer des matrices liquides. Ainsi, les matrices semi-solides biologiques peuvent nécessiter une dilution ou une dissolution avant que la mesure puisse être effectuée.

5.2.1 Les excréments

Les prélèvements de fèces sont principalement utilisés pour évaluer le bien-être et les stress chroniques d'animaux sauvages dans les zoos (Moreira et al., 2007), dans des élevages extensifs (Rehbinder et al., 2006) ou d'animaux difficiles à manipuler. Après défécation spontanée, les matières fécales sont séchées et broyées pour l'extraction du cortisol. Le prélèvement d'échantillons fécaux présente l'avantage d'être non invasif et de ne pas nécessiter d'approbation éthique (Zannoni et al, 2020). Les matières fécales peuvent être facilement collectées dans des sacs appropriés et stocké de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ jusqu'à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Hansen, 2015). Il faut cependant noter qu'un des désavantages est que la concentration du cortisol des fèces varie rapidement à température ambiante. Les échantillons fécaux peuvent contenir des agents pathogènes zoonotiques tels que Salmonella, ce qui peut augmenter le risque de contracter une maladie. Le délai entre la production du cortisol et l'excrétion dans les matières fécales est variable et dépend de l'espèce étudiée (Mormède et al., 2007).

5.3 Les matrices biologiques solides

La mesure des biomarqueurs de stress dans les matrices solides biologiques, comme les tissus kératinisés tels que les poils et la laine, a été validée comme méthode d'évaluation du stress chronique chez les animaux.

5.3.1. Les poils

La mesure du cortisol dans les poils est une méthode innovante pour déterminer l'élévation du cortisol à long terme (Dowlati et al. 2010). La méthode a été introduite afin de surveiller la réponse au stress chronique sans que le résultat ne soit affecté par les conditions d'échantillonnage, telles que l'heure de l'échantillonnage, la prise alimentaire et le stress causé par l'échantillonnage. Le cortisol pileaire reflète le taux sanguin de l'hormone pendant la croissance pileaire, permettant aux poils d'être une matrice biologique utile pour surveiller le bien-être et la santé des chevaux exposés aux stressseurs (Hayashi et al, 2021).

Toutes les matrices ont leurs propres limites en matière d'échantillonnage. L'analyse du cortisol pilaire est de plus en plus utilisée pour étudier l'activité de l'axe hypothalamo-hypophyso-corticosurrénalien en réponse à des conditions de stress prolongées et s'est avérée être un outil très informatif pour évaluer le stress chronique. Les résultats ont été influencés par de nombreux facteurs, tels que :

- La race : Les taux de cortisol ont été comparés pour les races de chevaux islandais, poneys Shetland et trotteurs Standardbred. Des différences significatives ont été trouvées sur les poils du garrot. Les chevaux trotteurs Standardbred ont montré un taux plus élevé que les chevaux islandais, et ces derniers encore plus élevé que les poneys Shetland (Sauveroche et al., 2020).
- L'âge : La concentration moyenne de cortisol dans les poils prélevés à l'âge de trente jours était significativement inférieure à celle trouvée à la naissance, mais aucun des facteurs environnementaux évalués (la température, la pluie ou les conditions d'éclairage) n'a influencé les concentrations de cortisol dans les poils des poulains nouveau-nés. Les explications possibles de cette baisse des niveaux de cortisol incluent l'adaptation progressive à la vie extra-utérine ; la fin de la relation fœto-maternelle qui s'est produite par le placenta. C'est probablement dû au fait que pendant la grossesse, les effets des facteurs externes sont filtrés par la mère, ce qui diminue leur impact (Montillo et al., 2014).
- Région du corps : De nombreuses études chez les animaux sauvages et domestiques ont révélé des différences de concentration du cortisol pilaire selon la région du corps notamment chez les chevaux. Lelláková et al. (2022) ont montré des différences entre les sites corporels. Les niveaux de cortisol étaient les plus bas dans les poils de la poitrine, la région du boulet et la région de la selle, sans différences significatives entre eux. Les niveaux de cortisol étaient les plus élevés dans la crinière près du garrot, mais il n'y avait pas de différences significatives dans la crinière derrière les oreilles ou dans la queue.
- La saison : Les valeurs les plus élevées de cortisol pilaire ont été détectées en automne et en été. Les valeurs automnales sont les plus élevées et sont en accord avec le cycle circannuel de la glande pituitaire de l'équin, qui a la production d'ACTH la plus élevée en l'automne. Les plus faibles niveaux de cortisol ont été relevés au printemps ; ces résultats

sont conformes aux observations d'Aurich et al., qui ont rapporté des niveaux de cortisol salivaire plus bas en mars et avril (Mazzola et al., 2021).

Le mécanisme par lequel le cortisol est incorporé dans les poils n'est pas encore connu. Par conséquent, étant donné que le cortisol et d'autres hormones stéroïdes sont des substances lipophiles, elles sont ainsi incorporées tout comme les médicaments lipophiles dans la tige pileuse en croissance. La figure 7 décrit le mécanisme d'incorporation du cortisol dans la matrice pileuse à partir du sang. La croissance des poils se produit en trois phases : phase active (anagène), phase de transition (catagène) et phase de repos (télogène) (Harkey, 1993). Le cortisol sanguin ne peut être incorporé dans la tige pileuse en croissance à partir des vaisseaux sanguins que par diffusion passive pendant la phase anagène (Meyer et Novak, 2012). Dans ce cas, l'incorporation se produit dans le follicule pileux qui est situé à plusieurs millimètres sous la surface de la peau (Harkey, 1993). Ainsi, il existe un délai entre l'incorporation du cortisol dans le poil et le moment où cette mèche arrive à la surface de la peau (Montillo et al., 2014). Ce délai dépend de la vitesse de croissance des poils, peut varier selon les espèces et les régions du corps (Trevisan et al., 2017) et doit être pris en compte lors de l'utilisation du cortisol pileux comme indicateur de stress. Pour l'utilisation du cortisol pileux comme biomarqueur du stress, il est important que l'échantillon contienne suffisamment de poils en croissance active, ce qui peut être obtenu par la méthode de rasage-rerasage ou « shave-reshave ». Une certaine zone est rasée au début de la période d'intérêt, et les poils qui repoussent dans la même zone sont rasés à nouveau à la fin de cette période (Davenport et al., 2008; Meyer et Novak, 2012).

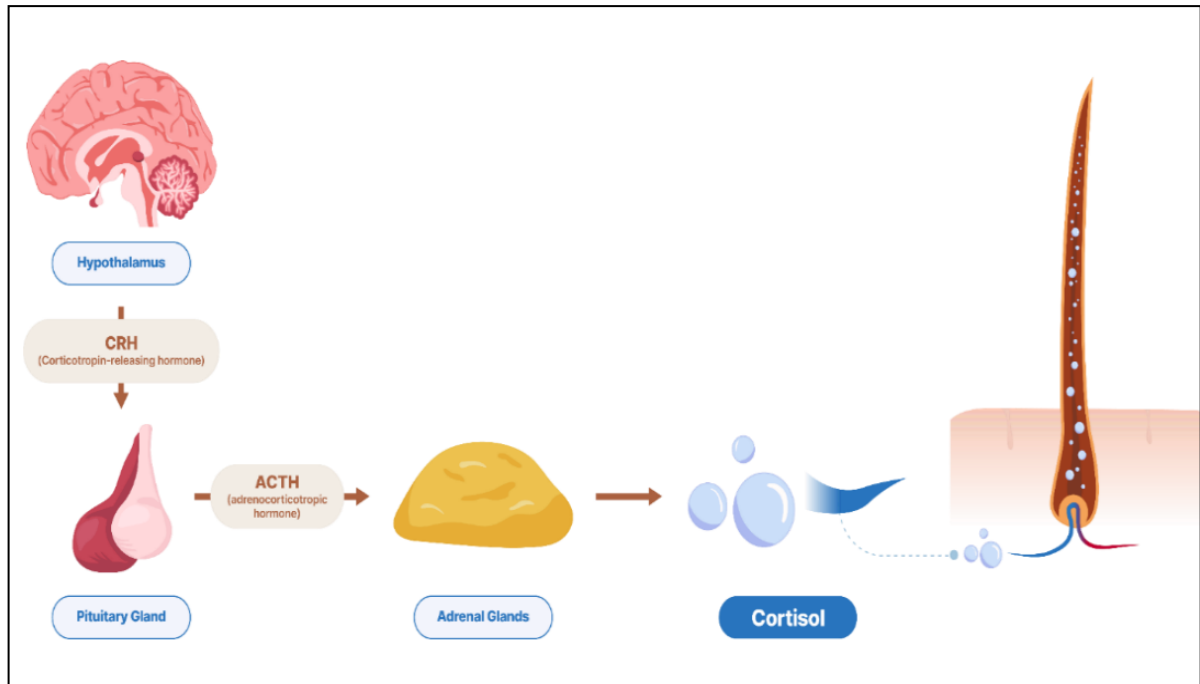


Figure 7 Infographie de l'incorporation de cortisol dans la matrice pilaire à partir du sang.

Source : Nejad et al., 2022

La diffusion à partir des tissus entourant le follicule est susceptible d'être une voie supplémentaire par laquelle le cortisol finit par atteindre les poils. Une fois que la tige en croissance émerge du cuir chevelu, elle est recouverte de sébum provenant de la glande sébacée associée ainsi à la sueur sécrétée par les glandes sudoripares voisines. Par conséquent, il y a probablement un dépôt de cortisol de ces fluides sur l'extérieur de la tige pilaire (Meyer et Novak, 2012) (figure 8).

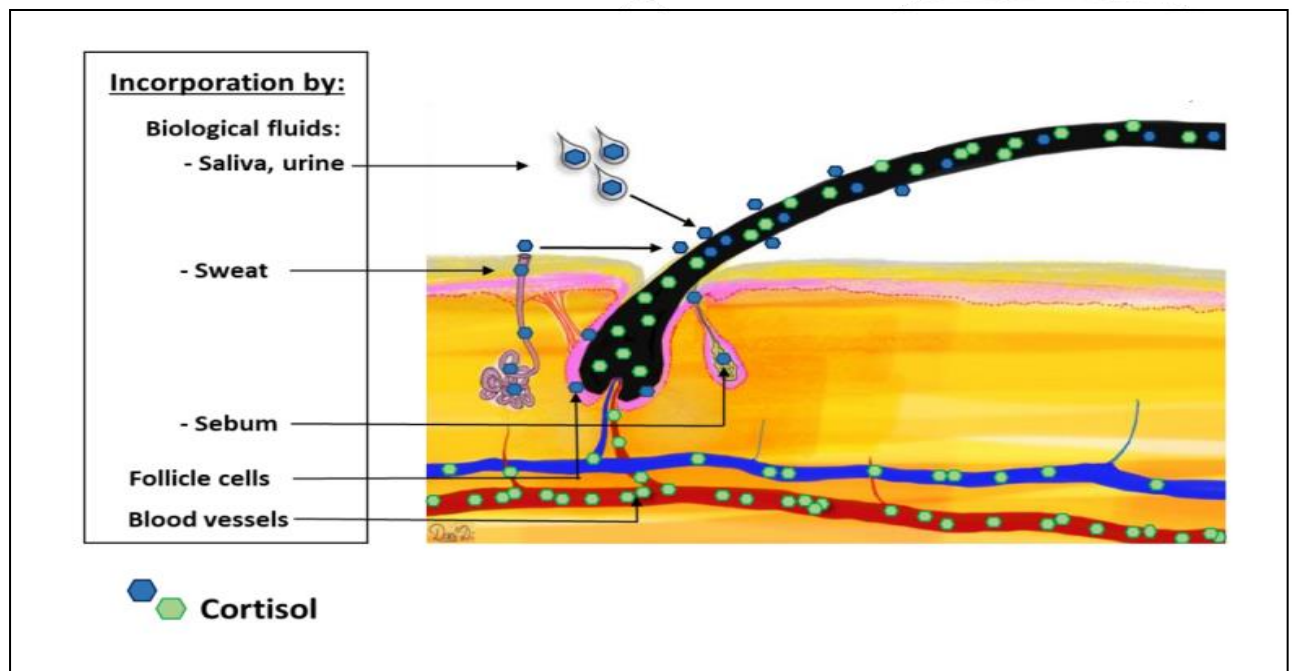


Figure 8 Voies d'incorporation du cortisol dans la tige. Le cortisol sanguin, principale source, est marqué par des hexagones verts et le cortisol provenant d'autres sources par des hexagones bleus.

Source : Heimbürge, 2021

5.3.1.1 La méthode de dosage du cortisol pilaire

Il existe une grande variabilité dans les approches expérimentales de l'extraction du cortisol utilisées chez les animaux (Tableau I). Il y a eu énormément d'articles publiés sur la mesure du cortisol pilaire, qui diffèrent par la quantité de poils collectés, la technique de collecte des poils, la durée d'extraction ou le mode d'évaporation de l'extrait.

L'extraction du cortisol pilaire se fait selon les étapes suivantes :

- Collecte des poils : Les quantités de poils à utiliser pour l'extraction varient entre 40 mg (Emmy et al., 2022) et 250 mg (Davenport, 2006) de différentes régions du corps. Les poils sont souvent prélevés du garrot (Meyer, 2014) ; (Davenport, 2006) ; (Mazzola et al., 2021), du front (Ghassemi, 2019) (Comin et al., 2012), région ischiatique (Mesarcova, 2017). Les échantillons de poils sont soigneusement rasés avec une tondeuse électrique selon Meyer (2014), Mazzola

(2021) et Comin (2012) ou bien coupés aux ciseaux fins (Mesarcova, 2017) le plus près possible de la peau.

- Stockage des échantillons : Les échantillons des poils collectés sont stockés soit dans des feuilles de papier aluminium pour les protéger de la lumière du soleil (Meyer, 2014), soit dans des sacs en plastique (Moya et al., 2013), soit placés dans des tubes secs en polypropylène (Mazzola et al., 2021). Les échantillons peuvent être stockés à température ambiante dans un environnement sombre (Emmy et al., 2022) ou indéfiniment à -20 °C (Bargaâ, 2016).

- Lavage des échantillons : Le lavage des échantillons est réalisé avec de l'isopropanol (Meyer et al., 2013). Certains auteurs remplacent l'isopropanol par de l'eau distillée (Mesarcova, 2017) ou bien du méthanol à 80% (Bargaâ, 2016). Le lavage permet d'éliminer toutes les substances hydrosolubles telles que les urines et les matières fécales ainsi que le sébum et la sueur qui pourraient gêner l'analyse. Cette procédure est répétée deux fois.

- Séchage des échantillons : Le séchage des échantillons de poils s'effectue à température ambiante, pendant au moins 2-3 jours (Meyer, 2014) ou jusqu'à 7 jours selon Ghassemi (2019) pour assurer une évaporation complète de l'isopropanol.

- Broyage des poils : Les poils séchés sont pulvérisés dans un broyeur à billes en acier inoxydable pendant 6 min à une vitesse de 25 Hz (Meyer, 2014) ou coupés en petits segments avec des ciseaux fins stérilisés (Ghassemi, 2019), dans le but d'augmenter la surface d'extraction. Peser de 50 mg (Comin et al., 2012) jusqu'à 300 mg (Bargaâ, 2016) de la poudre sur une balance analytique, puis les transférer dans des micros tubes de 2,0 ml pour une extraction ultérieure.

- Extraction du cortisol pileaire : Le méthanol est le solvant utilisé pour la phase d'extraction du cortisol (Bargaâ, 2016 ; Davenport, 2008). La poudre de poils et le méthanol sont placés en incubation (Davenport, 2008) (Bargaâ, 2016) pendant 18 à 24 heures (Acker et al., 2018) soit à température ambiante (Ghassemi et al., 2014), soit à 37°C (Comin et al., 2012) ou à 50°C (Mazzola et al., 2021) avec inversion constante à l'aide d'un rotateur (Ghassemi et al., 2014). Après l'incubation, les tubes sont centrifugés et le surnageant est placé dans un évaporateur sous vide (Meyer, 2014). Certains auteurs utilisent des hottes à 37°C (Comin et al., 2012) pour l'évaporation du méthanol, tandis que d'autres optent pour des bains à sec à 37°C (Lamari, 2018). Après élimination du méthanol, l'extrait est reconstitué dans un volume de 0,2ml

(Mazzola et al., 2021) jusqu'à 0,6ml (Comin et al., 2012) de tampon phosphate salin de dosage EIA (diluant de dosage).

- Analyse du taux de cortisol pileire : L'approche majeure qui est actuellement utilisée est le dosage immunoenzymatique (EIA). Le dosage immunoenzymatique a comme avantage la disponibilité commerciale des kits qui sont relativement peu coûteux, et l'équipement nécessaire (lecteur de microplaques et laveur) se retrouve dans de nombreux laboratoires. Les inconvénients de l'EIA incluent la réactivité croisée potentielle de l'anticorps avec d'autres analytes présents dans l'extrait de poils, et la sensibilité éventuellement insuffisante pour mesurer des niveaux extrêmement bas de cortisol pileire (Hodes et al., 2018).

Tableau I Aperçu de quelques méthodes de dosage du cortisol pileire chez le cheval

Espèce	Région d'échantillonnage	Broyage	Lavage	Extraction	Technique	Concentration détectée	Référence
Cheval	Poitrine, selles, thorax, boulets, crinière, derrière les oreilles, queue, garrot	Découpage (1-3mm)	Isopropanol (3 fois)	Méthanol	ELISA	9,40 à 21,25 pg/mg	Lelláková et al. (2022)
Cheval	Crinière, garrot	Broyeur à billes	Non mentionné	Méthanol	ELISA	4,2–14,0	Sauveroché et al. (2020)
Cheval	Crinière	Découpage (1-3mm)	Isopropanol (1 fois)	Méthanol	RIA	0,19–0,90	Placci et al. (2019)
Cheval	Garrot	Découpage (1cm)	Isopropanol (1 fois)	Méthanol	RIA	4,57–156,51	Comin et al. (2012)

Les poils offrent une alternative intéressante pour évaluer le stress pour de nombreuses raisons (Tableau II). Le cortisol pileire renseigne sur les anomalies des animaux souffrant pendant plusieurs mois. Comparé aux autres matrices telles que le sang ou la salive, l'échantillonnage de la matrice pileire est une méthode non invasive, elle ne nécessite ni expérience ni expertise et qui peut facilement être transféré au laboratoire pour analyse. Elle ne se limite pas aux animaux vivants, elle peut être prélevée sur des animaux non vivants. Dans certaines circonstances, les poils peuvent être le seul échantillon disponible pour examen, comme dans les études de restes squelettiques ou de blessures traumatiques (Levine et Kerrigan, 1999). De plus, le cortisol pileire

fournit un calendrier rétrospectif de la sécrétion de cortisol permettant d'évaluer le stress chronique ou le stress de longue durée. Ces aspects rendent la matrice pileuse beaucoup plus adaptable que les autres matrices biologiques pour le suivi de la santé et le bien-être animal (Ataallahi et al. 2022).

Tableau II Résumé de la capacité de la matrice pileuse à mesurer le cortisol chez les animaux.

Avantages	Inconvénients
-La procédure de prélèvement pileuse est une méthode non invasive et simple. -Au maximum, 1g d'échantillon de cheveux est requis. -Facilité de stockage et stabilité à température ambiante pendant des années -Les poils sont résistants à la décomposition chimique en comparaison des autres matrices biologiques. -Calendrier rétrospectif de la sécrétion de cortisol -L'échantillonnage est possible par le chercheur. -Peut facilement être transféré au laboratoire pour analyse.	-Difficulté de la collecte d'espèces à poils courts ou de progéniture. -Nécessité d'envelopper les échantillons de poils dans du papier d'aluminium pour maintenir l'intégrité et pour éviter une contamination supplémentaire lors du stockage. -Les échantillons de poils ne reflètent pas l'exposition immédiate ou récente de la sécrétion du cortisol. -Facteurs de confusion possibles : âge, sexe, taux de croissance et le poids des poils. - les méthodes d'extraction du cortisol diffèrent d'une étude à l'autre.

Source : Nejad et al, 2022

Partie Expérimentale

Objectif

Le cortisol pileire est un marqueur rétrospectif du stress sur de longues périodes. Sa quantification est de plus en plus utilisée dans la recherche sur le stress et le bien-être animal.

L'objectif de notre étude est de déterminer les valeurs usuelles du cortisol pileire chez les chevaux d'un centre équestre de la région d'Alger.

I. Matériel et méthodes

A. Lieu de l'étude expérimentale

L'étude a été réalisée de Janvier 2023 à Aout 2023 au niveau d'un Club Hippique Populaire, Bordj El Kiffan. Créé en 1988, le Club Hippique Populaire de Bordj El Kiffan abrite une cinquantaine de chevaux pratiquant le saut d'obstacles comme activité sportive.



Figure 9 Le club hippique populaire de Bordj El Kiffan.

Photographie personnelle

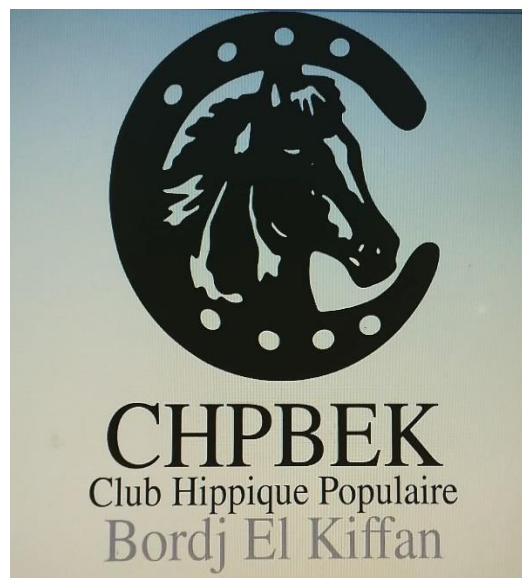


Figure 10 Logo du club hippique de Bordj El Kiffan

Source : Page Facebook

B. Animaux

L'étude a porté sur un effectif total de vingt-et-un (21) chevaux : sept mâles et quatorze femelles (Tableau III). Les chevaux sont de race Barbe et Arabe-barbe. L'âge des chevaux varie entre un mois et demi et 27 ans, avec une moyenne de $8 \pm 6,48$ ans (en tenant compte l'âge au premier rasage). Les animaux ont été logés dans des box individuels (Surface de 8 m²). Leur alimentation a été basée essentiellement sur le foin et l'orge.

Tableau III Caractéristiques des chevaux de l'étude.

Nom	Sexe	Age	Robe
Illustre	Mâle (Castré)	27 ans	Alezan brulé
Léa	Femelle	6 ans	Bai
Trèfle	Mâle	14 ans	Blanc
Mordjane	Mâle	3 ans	Bai
Assryan	Mâle	12 ans	Noir
Zinou	Mâle	13 ans	Bai cerise
Loubna	Femelle	11 ans	Gris clair pommelé
Isabella	Femelle	1mois et 1/2	Bai
Cookie	Femelle	18 ans	Gris clair pommelé
Amira	Femelle	8 ans	Blanc
Atena	Femelle	12 ans	Bai foncé
Queen	Femelle	7 mois	Bai
Djazira	Femelle	6 ans	Gris
Soltana	Femelle	6 ans	Souris pommelé
Victoria	Femelle	7 ans	Gris truité
Abilardo	Mâle	2 mois	Bai
Nour	Femelle	5 ans	Gris
Silmya	Femelle	3 ans	Gris
Bitrèse	Mâle	3 ans	Souris foncé pommelé
Ahlam	Femelle	7 ans	Gris
Bella	Femelle	6 ans	Bai foncé

Les critères de choix des chevaux ont été faits sur la base de :

- Leur état de santé : les chevaux devaient être de bon état de santé, pour l'échantillonnage. Ils ne devaient avoir reçu aucun traitement à base de corticoïdes.
- La coopération des chevaux : les chevaux choisis devaient être habitués aux différentes manipulations vétérinaires.
- L'accord des propriétaires : les chevaux choisis n'appartenaient qu'aux propriétaires intéressés par cette étude.

2. Matériel

Afin de réaliser cette étude, nous avons eu recours au matériel suivant :

- Matériel de contention : licol
- Matériel nécessaire pour la collecte des poils : une tondeuse électrique, des feuilles de papier aluminium et des sacs en plastiques.
- Matériel de laboratoire : tubes polypropylènes 15mL, balance de précision avec un degré de précision de 0,01g, isopropanol 99.8%, pipette 1mL, ciseaux fins, microtubes 2 mL, support de microtubes, méthanol 80%, bain marie à agitation JULABO SW22, microcentrifugeuse SIGMA, hotte à flux constant KIT LAB, solution PBS, vortex, lunettes de protection, alcool chirurgical, gants, masque chirurgical.
- Matériel de dosage : Analyseur d'immunoanalyse automatique Maglumi 600, Kit cortisol Maglumi (CLIA).

3. Protocole experimental

3.1. Collecte des poils

Pour la collecte des poils, nous avons opté pour la méthode du rasage-resasage (shave-reshave) (Meyer et Novak, 2012). En effet, la tige pileaire atteint une certaine longueur, après quoi la croissance s'arrête jusqu'à ce que les poils tombent. Par conséquent, les échantillons obtenus sans rasage préalable contiendront un mélange de poils ayant incorporé du cortisol sur différentes périodes de temps. Ce problème peut être surmonté en utilisant une approche de rasage-rerasage

I. Matériel et méthodes

qui établit une chronologie connue de l'incorporation de cortisol. Ainsi, la collecte des poils a été réalisée en deux temps :

1^{er} temps : Après contention du cheval avec un licol, la tondeuse électrique a été utilisée (Mazzola, 2021). Elle a été allumée pendant un moment afin que le cheval s'habitue à son bruit puis le rasage a été réalisé (Figure 11). Pour garantir une quantité suffisante d'échantillon, la zone rasée mesurait 5×5 cm (échantillon d'au moins 150 mg) au niveau du garrot gauche des 21 chevaux (Figure 12). La collecte a été réalisée, pour l'ensemble des chevaux, le 26 janvier 2023.

2^e temps : Le 26 mars, après la repousse des poils, un rerasage des chevaux a eu lieu sur la même zone du rasage initial. Les échantillons de poils ont été soigneusement rasés avec une tondeuse électrique.



Figure 11 Rasage des poils avec une tondeuse électrique.

Photographie personnelle



Figure 12 Garrot d'un cheval après rasage.

Photographie personnelle

3.2. Stockage des échantillons

Les échantillons des poils collectés ont été enveloppés dans des feuilles de papier aluminium (Meyer et al., 2014) pour les protéger de la lumière du soleil, puis ont été mis dans des sacs en

plastique. Les échantillons ont ensuite été stockés à température ambiante dans un environnement sombre jusqu'à l'analyse.

3.3. Lavage des échantillons

Les échantillons ont été pesés à l'aide d'une balance de précision électronique afin d'avoir 150mg de poils. Ils ont ensuite été placés dans des tubes de polypropylène de 15mL qui ont été identifiés avec un numéro et l'initial de chaque cheval (Figure 13). Le lavage des échantillons a été réalisé avec 5 mL d'isopropanol qui ont été ajoutés à chaque tube (Moya et al., 2013) (Figure 14). Les échantillons ont été agités par inversion manuelle durant 3 minutes. L'isopropanol a été enlevé à l'aide d'une pipette, cela doit être fait avec soin pour s'assurer qu'aucun poil n'est enlevé avec l'isopropanol. Cette procédure a été répétée deux fois.

Le lavage permet d'éliminer toutes les substances hydrosolubles telles que les urines et les matières fécales ainsi que le sébum et la sueur qui pourraient gêner l'analyse (Davenport, 2006).

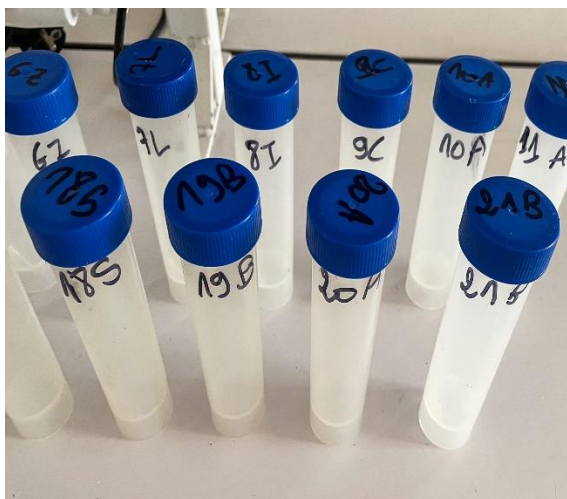


Figure 14 Tubes polypropylènes identifiés.

Photographie personnelle



Figure 13 Ajout de l'isopropanol aux tubes.

Photographie personnelle

3.4. Séchage des échantillons

Le séchage des échantillons de poils a été effectué à température ambiante, pendant au moins 2-3 jours pour assurer une évaporation complète de l'isopropanol des tubes polypropylènes non fermés (Meyer et al., 2014).

3.5. Broyage des poils

Les poils séchés ont été coupés en petits segments de 2-3mm avec des ciseaux fins stérilisés (Ghassemi, 2019) (Figure 15), dans le but d'augmenter la surface d'extraction. Pour chaque échantillon, 50 mg de la poudre de poils ont été pesés sur une balance de précision, puis soigneusement transférés dans des microtubes de 2 mL pour une extraction ultérieure (Figure 16).

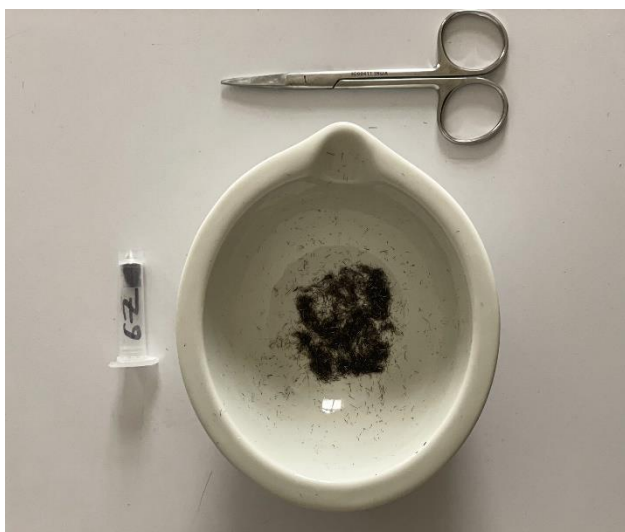


Figure 15 Poils coupés aux ciseaux fins.

Photographie personnelle



Figure 16 Microtubes identifiés

Photographie personnelle

3.6. Extraction du cortisol pileire

Le méthanol a été le solvant utilisé pour la phase d'extraction du cortisol ; 1,5 mL de méthanol ont été ajoutés à chaque microtube. La poudre de poils et le méthanol ont été placés en incubation pendant 18 heures (Acker et al., 2018) dans un bain marie (Figure 17) à 37°C avec /une faible agitation constante de 100 rpm pour extraire le cortisol (Figure 18). Après l'incubation, les microtubes ont été centrifugés à 3500 rpm pendant 10 min à l'aide d'une microcentrifugeuse (Figure 19), puis 1 mL de surnageant a été pipeté et placé dans un microtube de 2 mL. Ces microtubes ont été placés sous une hotte à flux d'air constant (Comin et al., 2012) (Figure 20) pendant 3 jours afin d'assurer l'évaporation complète du méthanol. Une fois que le méthanol a été complètement évaporé, l'extrait sec de l'échantillon a été remis en suspension dans 0,2 ml de phosphate salin (PBS) tamponnée à un pH de 7,5 (Mazzola et al., 2021). La solution PBS a été préparée selon AAT Bioquest, Inc (2023). Les échantillons ont été soumis à un vortex pendant 30 secondes jusqu'à ce qu'ils soient bien mélangés.

Les échantillons ont été congelés à -20 °C jusqu'à l'analyse.



Figure 18 Bain marie à agitation Julaba SW22

Photographie personnelle

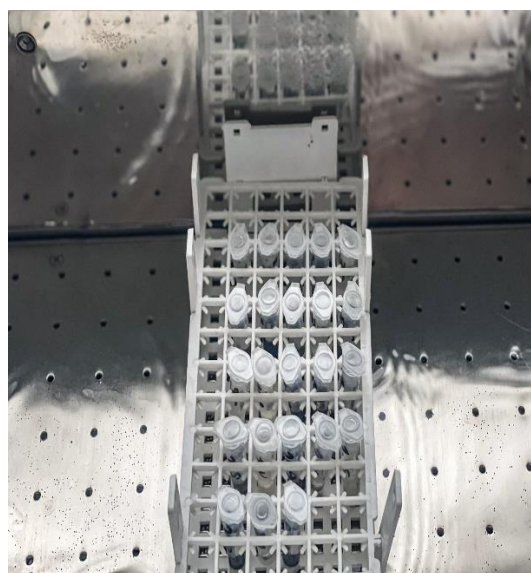


Figure 17 Microtubes agités au bain marie

Photographie personnelle



Figure 20 Microcentrifugeuse
SIGMA

Photographie personnelle



Figure 19 Microtubes sous hotte à flux
d'air constant.

Photographie personnelle

Les différentes procédures de lavage des échantillons, de séchage, broyage et extraction du cortisol ont été réalisées à l'ENSV d'Alger, dans le laboratoire de Physiologie Animale, dans le Laboratoire d'Anatomie-pathologie, et dans le Laboratoire de Recherche Santé et Production Animales.

3.7. Analyse des échantillons

Le taux de cortisol pileire de tous les échantillons a été analysé au cours de la même journée et les échantillons ont été dosés en double. Nous avons utilisé l'analyseur d'immunoanalyse automatique Maglumi 600 (Figure 21), avec une capacité de 16 échantillons pendant 20 minutes à la fois. Des kits pour le cortisol MAGLUMI Cortisol (CLIA) ont été utilisés (Figure 23). Le dosage du cortisol est un immunodosage compétitif par chimiluminescence (CLIA). Le kit est

I. Matériel et méthodes

basé sur un CLIA compétitif en phase solide. Les échantillons et le cortisol enzymatique conjugué sont ajoutés aux puits recouverts d'anticorps monoclonal anti-cortisol. Le cortisol dans l'échantillon entre en compétition avec le cortisol enzymatique conjugué pour les sites de liaison. Le cortisol non lié et le cortisol enzymatique conjugué sont lavés par un tampon de lavage. Lors de l'ajout d'une solution de substrat de chimiluminescence, l'intensité de la lumière émise est inversement proportionnelle à la concentration de Cortisol dans les échantillons. Par référence à une série de normes de cortisol dosées de la même manière, la concentration dans l'échantillon inconnu est quantifiée. La méthode peut être utilisée pour des échantillons dans une plage de 2,5 à 600 ng/ml.

Les échantillons ont été préalablement décongelés puis mis dans des tubes spécifiques à l'automate qui est calibré et contrôlé. Les tubes de dosage et le kit de cortisol ont été placés dans leur emplacement spécifique (Figure 22). Nous avons réalisé un double dosage et lecture à chacun des échantillons (dans le but de vérifier la répétabilité de l'analyseur). Dans l'écran de l'automate, nous avons identifié chaque numéro d'emplacement d'échantillon avec son propre code.



Figure 22 Analyseur d'immunoanalyse automatique MAGLUMI 600.

Photographie personnelle

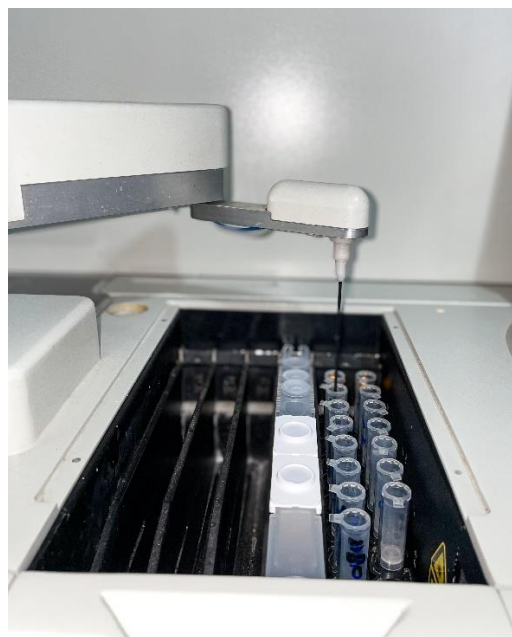


Figure 21 Emplacements des tubes à l'automate.

Photographie personnelle

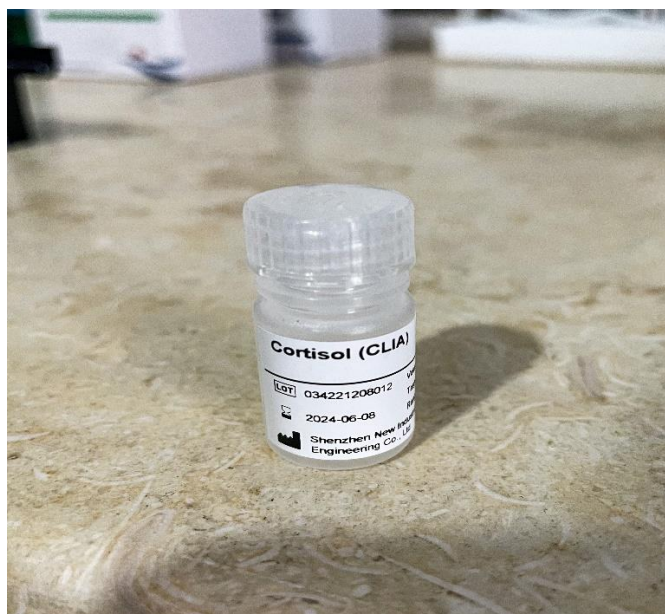


Figure 23 Kit de dosage du cortisol (CLIA).

Photographie personnelle

Les kits utilisés sont conçus pour mesurer les valeurs de cortisol dans des échantillons liquides tels que la salive ou le plasma. Les résultats de l'analyse sont de ce fait donnés en ng/mL et doivent être convertis en quantité de cortisol par unité de poids de poils en poudre. La formule suivante convertit la sortie du test exprimée en $\mu\text{g/dL}$ en pg de cortisol par mg de poils (pg/mg) en utilisant la formule établie par Meyer et al. (2014) :

$$(A/B) * (C/D) * E * 10,000 = F$$

A = Résultats de l'analyse ($\mu\text{g/dL}$)

B = Poids de l'échantillon de poils (mg)

C = Volume de méthanol ajouté à la poudre de poils (mL)

D = Volume de méthanol récupéré de l'extrait puis séché (mL)

E = Volume de PBS ajouté pour reconstituer l'extrait sec (mL)

F = Concentration du cortisol dans les poils (pg/mg)

Dans la présente étude : B = 50 mg ; C = 1,5 mL ; D = 1 mL ; E = 0,2 mL

Les résultats donnés par l'automate ayant été exprimés en ng/mL, nous les avons convertis en µg/mL

3.8. Analyse statistique

Les données issues de l'expérimentation ont été saisies dans un tableau Excel dont le contenu a servi pour effectuer des analyses statistiques en utilisant le logiciel DATAtab et BiostaTGV. Suite à la diversité des approches méthodologiques, divers outils statistiques ont été utilisés pour évaluer le taux de cortisol pilaire chez les chevaux, précisément la moyenne en SEM (standard erreur de la moyenne) et le coefficient de variation.

Les résultats ayant montré un pourcentage élevé d'échantillons dont le taux de cortisol n'était pas détecté par l'automate (concentration du cortisol pilaire $<0,18$ pg/mg), un test non paramétrique, le Test Exact de Fisher, a été utilisé afin :

- De comparer la proportion des taux non détectables de cortisol pilaire lors du premier et du second dosage des échantillons
- De comparer la proportion des taux non détectables de cortisol pilaire en fonction de différents facteurs tels que l'âge du cheval, le sexe et la couleur du pelage.

Pour la réalisation de ces comparaisons, des tableaux de contingence ont été élaborés.

Les tests Exact de Fisher ont été effectués sur le site de Statistiques en ligne BIOstaTGV.

Les valeurs moyennes du cortisol pilaire selon les différents facteurs (âge, sexe, couleur de robe) ont été comparées en utilisant le test non paramétrique de Wilcoxon-Mann-Whitney

II. Résultats

Notre étude avait pour objectif de mesurer un indicateur de stress chez les chevaux d'un centre équestre, afin d'avoir les valeurs usuelles du cortisol pilaire chez les chevaux et de connaître les impacts de différents facteurs qui peuvent influencer le taux de cortisol pilaire. Nous avons pu collecter les échantillons pilaires sur un total de vingt et un chevaux. Le tableau IV résume les résultats obtenus en double dosage des échantillons

Tableau IV Concentration du cortisol pilaire exprimée en pg/mg (Dosage réalisé en double pour chaque échantillon)

	Concentration du cortisol pilaire (pg/mg)	
Nom du cheval	Valeur 1	Valeur 2
Illustre	<0,18	<0,18
Léa	6,55	7,67
Trèfle	<0,18	<0,18
Mordjane	<0,18	<0,18
Assryan	<0,18	<0,18
Zinou	<0,18	<0,18
Loubna	<0,18	<0,18
Isabella	33,45	55,25
Cookie	<0,18	<0,18
Amira	<0,18	<0,18
Atena	<0,18	<0,18
Queen	<0,18	<0,18
Djazira	<0,18	<0,18
Soltana	<0,18	<0,18
Victoria	<0,18	1,25
Abilardo	<0,18	3,47
Nour	<0,18	<0,18
Silmya	<0,18	<0,18
Bitrèse	<0,18	<0,18
Ahlam	<0,18	0,77
Bella	<0,18	<0,18

A. Proportion des échantillons à cortisol pileire supérieur au seuil de détection

Tableau V Tableau de contingence représentant le nombre des échantillons à cortisol pileire supérieur au seuil de détection

	Valeur 1	Valeur 2	TOTAL
Déectable	2 (09,52%)	5 (23,8%)	7
Non déectable	19 (90,47%)	16 (76,19%)	35
TOTAL	21	21	42

Valeur 1 : résultats du premier dosage ; valeur 2 : résultats du second dosage

Les résultats du tableau V montrent que, pour les valeurs du premier dosage (Valeur 1), seul 9,52% ont été supérieurs au seuil de détection, contre 23,80% pour les valeurs du second dosage (Valeur 2). La différence entre les deux valeurs ne s'est pas avérée significative ($p=0,409$).

A.1 Effet de l'âge

Tableau VI Tableau de contingence représentant le nombre des échantillons à cortisol pileire supérieur au seuil de détection en fonction de l'âge (en utilisant les valeurs 2).

	< 5 ans	5-10 ans	>10 ans	TOTAL
Cortisol déectable	2 (33,3%)	3 (37,5%)	0 (0%)	5
Cortisol non déectable	4 (66,6%)	5 (62,5%)	7 (100%)	16
TOTAL	6	8	7	21

Pour étudier l'influence de l'âge sur le cortisol pileire, l'ensemble du groupe d'étude a d'abord été divisé en trois groupes d'âge différents : [< 5 ans], [entre 5 et 10 ans] et [> 10 ans] (Tableau VI). L'analyse du taux de cortisol pileire a révélé que le pourcentage d'animaux ayant eu un taux déectable de cortisol a été plus élevé chez les animaux de moins de 10 ans (33,3%, 37,5% et 0%, respectivement chez les chevaux âgés de moins de 5 ans, âgés entre 5 et 10 ans, et ceux âgés de plus de 10 ans). Le Test Exact de Fisher donne la valeur $p=0,199$, la différence est non significative, probablement du fait de la petite taille de l'échantillon.

A.2 Effet du sexe

Tableau VII Tableau de contingence représentant le nombre des échantillons à cortisol pileire supérieur au seuil de détection en fonction du sexe.

	Mâle	Femelle	TOTAL
Cortisol détectable	1 (14,28%)	4 (28,57%)	5
Cortisol non détectable	6 (85,7%)	10 (71,4%)	16
TOTAL	7	14	21

Les données du tableau VII ont montré que le pourcentage de femelles ayant eu des taux détectables de cortisol pileire a été plus élevé que chez les mâles (28,6% versus 14,3%, respectivement chez les femelles et les mâles), mais la différence n'a pas été significative ($p=0,624$).

A.3 Effet de la couleur de la robe

Tableau VIII Tableau de contingence représentant le nombre des échantillons à cortisol pileire supérieur au seuil de détection en fonction de la couleur des robes (en utilisant les valeurs 2).

	Bai	Gris	Autres robes	TOTAL
Cortisol détectable	3 (37,5%)	2 (28,57%)	0 (0%)	5
Cortisol non détectable	5 (62,5%)	5 (71,4%)	6 (100%)	16
TOTAL	8	7	6	21

Les robes de tous les chevaux participants à l'étude ont été classées en trois groupes différents : bai, gris et autres (du fait de l'effectif minime des autres robes représentées par le blanc et la couleur souris). L'analyse du taux de cortisol pileire a révélé que le pourcentage d'animaux ayant eu un taux détectable de cortisol a été plus élevé chez les animaux avec une robe foncée (37,5%, 28,57% et 0%, respectivement chez la robe bai, la robe grise, et toutes les autres robes). Le Test

Exact de Fisher donne la valeur $p = 0,360$, la différence a été non significative, probablement du fait de la petite taille de l'échantillon (Tableau VIII).

B. Concentration moyenne du cortisol pilaire

La concentration moyenne en cortisol pilaire obtenue dans notre étude a été calculée uniquement pour les valeurs du second dosage, supérieures au seuil de détection ($0,18 \text{ pg/mg}$). Cette concentration a été de $13,7 \pm 20,9 \text{ pg/mg}$ ($n=5$). Les concentrations minimale et maximale détectées ont été respectivement de $1,25 \text{ pg/mg}$ et $55,25 \text{ pg/mg}$. Le coefficient de variation est de 153% ce qui montre une grande dispersion autour de la moyenne.

Tableau IX Valeurs moyennes du cortisol pilaire (valeurs 2), regroupées par âge, sexe et couleur de pelage (pour les concentrations pilaires du cortisol $\geq 0,18 \text{ pg/mg}$).	
Variable	Cortisol pilaire (pg/mg)
Age	
< 5 ans ($n=2$)	$29,36 \pm 25,89$
5 – 10 ans ($n=3$)	$3,23 \pm 3,15$
Sexe	
Mâle ($n=1$)	3,47
Femelle ($n= 4$)	$16,24 \pm 22,69$
Couleur de la robe	
Bai ($n= 3$)	$22,13 \pm 23,48$
Gris ($n= 2$)	$1,01 \pm 0,24$

Pour le facteur sexe, le groupe des mâles est à $n=1$, ce qui rend impossible la réalisation de l'analyse statistique par le test de Wilcoxon- Mann Whitney. Pour la couleur de la robe, la probabilité $p = 0,2$ (Bai vs Gris). En ce qui concerne le facteur de l'âge, la probabilité est de 0,4 (< 5ans vs 5-10 ans). Étant donné que l'effectif est restreint, il est probable que l'absence de signification statistique soit due à la petite taille de l'échantillon.

III. Discussion

L'étude du cortisol pilaire chez le cheval permet de révéler l'importance de cette hormone dans la compréhension de la régulation du stress, de la santé et du bien-être équin. Il est à noter que très peu d'études ont été faites dans cette optique et c'est, selon nous, la première en son genre en Algérie

Les concentrations du cortisol pilaire chez le cheval ont été rapportées par différents auteurs. Sauveroche et al. (2020) ont relevé, en utilisant la technique ELISA une valeur moyenne de cortisol pilaire chez les chevaux de $6,1 \pm 6,4$ pg/mg. Tandis que l'étude faite par Lelláková et al. (2022) révèle une large plage entre les valeurs moyennes minimales et maximales 9,40 à 21,25 pg/mg. Dans notre étude, la valeur inférieure à 0,18 pg/mg retrouvée chez la majorité des chevaux, peut-être dû aux bonnes conditions du club équestre. Selon Placci et al. (2019), les conditions d'élevage exercent un impact sur les valeurs de cortisol pilaire. Selon cet auteur, les chevaux vivants dans un élevage naturel (à l'état libre) présentent des concentrations de cortisol plus faibles que ceux évoluant dans un élevage traditionnel (dans des box individuels). Cet auteur a enregistré des valeurs minimales très faibles, de 0,19 pg/mg, selon la méthode analytique radio-immunologique (RIA) sur des chevaux sportifs.

Effet de la saison. Les facteurs externes tels que la saison et les conditions environnementales peuvent influencer les niveaux de cortisol pilaire (Mormède et al., 2007). Plus probablement, il pourrait s'agir d'une série de facteurs concomitants, tels que la température ambiante, qui, selon la saison et la perception des chevaux, pourraient interférer avec l'homéostasie des chevaux (Hart et al., 2016). La saison de l'hiver durant laquelle l'étude avait été réalisée, pourrait également expliquer pourquoi les taux de cortisol pilaire étaient minimes. Le taux de cortisol pilaire automnal est le plus élevé par rapport aux autres saisons, car il est en accord avec le rythme circannuel de l'hypophyse chez l'équidé, qui a la production d'ACTH la plus élevée en automne (Banse et al., 2020).

Effet du sexe. Des caractères individuels comme le sexe et le statut reproducteur peuvent influencer les concentrations du cortisol pilaire (Medill et al., 2015). Cette différence serait due à des différences dans la physiologie de l'axe corticotrope (sensibilité des surrénales à l'ACTH moindre chez les mâles), dans le comportement lors de la reproduction (interactions nombreuses

produites par le mâle lors du rut) et dans la physiologie de la reproduction des femelles (taux de glucocorticoïdes élevés à la fin de la gestation et pendant la lactation) (Reeder & Kramer, 2005).

Notre étude n'a pas révélé de différences significatives entre les mâles et les femelles. De nombreuses études sur des chevaux domestiques ont également indiqué qu'il n'y avait pas de différence de cortisol pileux entre les mâles et les femelles. Souvent, ces études comprennent également des mâles castrés, ce qui réduit encore leur comparabilité (Jolivald et al., 2023). Dans l'ensemble, le cortisol pileux chez les femelles et les mâles est fortement lié à des facteurs biologiques tels que l'âge et la condition physique. Les animaux avec un mauvais état corporel, ont un taux de cortisol pileux plus élevé. Étant donné que le cortisol est lié à la mobilisation des réserves graisseuses existantes, il n'est pas surprenant qu'après une longue période de stress chronique, les individus développent une mauvaise condition physique (Regan et al., 2020).

Effet de l'âge. Selon nos résultats, l'intervalle d'âge inférieur à cinq ans a présenté un taux élevé de cortisol pileux. Dans notre étude, la concentration la plus élevée de cortisol pileux a été relevée chez une pouliche âgée d'un mois et demi (55,25 pg/mg). Cette augmentation peut être due à des niveaux élevés de cortisol maternel et fœtal en fin de gestation et autour de la naissance (Otten et al., 2013). Les poulains nouveau-nés présentent également des taux plasmatiques de cortisol total plus élevés et des taux de globuline liant les corticostéroïdes plus faibles, ce qui peut conduire à des concentrations plus élevées de cortisol non lié (Grant et al., 2017) et donc à une incorporation plus élevée de cortisol dans les cheveux.

Effet de la couleur du pelage. L'influence de la pigmentation des poils sur les concentrations de cortisol pileux a fait l'objet de nombreuses études confirmant que le cortisol pileux varie en fonction de la couleur des poils (Yamanashi et al., 2013). La quantité de mélanine dans les poils affecte de manière significative à la fois l'incorporation et la dégradation du cortisol dans la tige pileuse. Les poils foncés pourraient entraîner une température cutanée plus élevée et donc une augmentation du flux sanguin dans la peau, favorisant l'incorporation de cortisol via les vaisseaux sanguins (Burnett et al., 2014) ce qui permet d'expliquer, que dans notre étude, des taux de cortisol élevés ont été retrouvés chez les chevaux de robe bai.

De plus, l'expérience individuelle peut influencer la réponse de stress d'un individu. Par exemple, des animaux ayant déjà subi une série de stimuli répétés. Selon une étude, Des rats sont exposés en période néonatale à des expériences courtes de contention montrent une réponse

atténuée au stress à l'âge adulte (Blumstein, 2016). Les aides n'ont signalé aucune observation d'épisodes d'agression ou de stimuli stressants chez aucun des chevaux de l'étude.

Effet de la méthode de collecte de poils. Dans notre étude grâce à l'utilisation de la méthode rasage-rerasage, les échantillons de poils repoussés contiennent principalement des poils qui ont poussé activement au cours des semaines précédentes entre janvier et mars, de sorte que la dilution causée par les différentes phases de croissance des poils et les influences externes sur le cortisol pilaire, telles que les contaminations et le rayonnement UV, peuvent être moindre. Pour éviter les contaminations externes, il est conseillé de raser les poils des zones du corps visiblement sèches et propres. Pour les chevaux de notre étude, la zone d'échantillonnage était le garrot, qui présente l'avantage d'éviter les salissures lorsque les animaux se couchent. Par conséquent, les échantillons de poils repoussés peuvent mieux refléter les concentrations systémiques de cortisol que les échantillons de poils naturels. La collecte des poils présente l'avantage que le temps d'échantillonnage est plus flexible et peut être ajusté pour permettre la conclusion rétrospective souhaitée (Heimbürge, 2021). Les niveaux de cortisol pilaire relevés dans notre étude ont été enregistrés dans les huit semaines suivant le rasage des poils. Il est possible que ce délai ait été trop court pour avoir des concentrations détectables de cortisol pilaire.

Effet du protocole d'extraction du cortisol pilaire. Les valeurs du cortisol pilaire présentent une grande variation, pouvant être dues au protocole d'analyse. Le protocole comporte des étapes cruciales pour la qualité de la mesure. Dans cette étude, lors de l'extraction, du méthanol à 80% a été utilisé. Il fournit le meilleur rendement pour l'extraction dans la plupart des espèces de mammifères (Sheriff et al., 2011). Cette recommandation a été suivie lors de l'élaboration de notre protocole.

Effet de la méthode de broyage des poils. Afin d'augmenter la part d'extraction de cortisol de la tige pilaire, les échantillons de poils doivent être broyés en une poudre fine pour décomposer la matrice protéique du poil et augmenter la surface d'extraction du cortisol (Meyer et al., 2014). À l'étape du broyage, nous avons utilisé des ciseaux chirurgicaux pour broyer les échantillons de poils. Selon Ghassemi et al. (2019), l'utilisation de broyeur à billes est relativement plus facile à réaliser et qu'une plus grande partie du cortisol pouvait être extraite par rapport à un ciseau chirurgical. De plus, l'application du broyeur montre une plus grande capacité à broyer plus

d'échantillons (16 à 24) à la fois par rapport au ciseau. En outre, l'utilisation de broyeur à billes fourni des cheveux broyés homogénéisés, ce qui va augmenter les chances d'obtenir une potion d'extraction de cortisol plus élevée et a ainsi amélioré la fiabilité de l'évaluation.

Effet de la méthode d'analyse du cortisol pilaire. Dans la présente étude, la méthode analytique, était basée sur une immunoanalyse par chimiluminescence (CLIA) qui a été utilisé pour la détermination du cortisol pilaire chez le cheval. Même s'il a pu être démontré que la chimiluminescence et la chromatographie en phase liquide-spectrométrie de masse (LC-MS/MS) présentent une forte corrélation, la chimiluminescence conduit à des résultats plus élevés que les tests LC-MS/MS (Binz et al., 2016). Cette méthode a également été utilisée par Carlitz et al. (2014) chez le cheval. La majorité des auteurs ont utilisé chez le cheval des test Elisa ou EIA, et rarement le CLIA.

Le cortisol pilaire a déjà été analysé par plusieurs méthodes, Au moyen d'un dosage immuno-enzymatique (EIA), d'un dosage radio-immunologique (RIA), d'une immunoanalyse par chimiluminescence, d'une chromatographie en phase liquide-spectrométrie de masse (LC-MS) et d'un détecteur de fluorescence HPLC. Selon Meyer et Novak (2012), le choix du test n'est pas particulièrement important tant qu'il présente la spécificité requise pour le cortisol et un degré de sensibilité approprié à la taille des échantillons analysés.

Conclusion

L'évaluation du stress par dosage du cortisol pileux offre de nombreux avantages considérables pour son utilisation chez les chevaux ; notamment grâce à la technique d'échantillonnage simple et non invasive et à la représentation de l'activité de l'axe hypothalamo-hypophyso-corticosurrénalien sur des périodes allant de plusieurs semaines à plusieurs mois.

Un large éventail de facteurs peut modifier les concentrations du cortisol pileux. Il existe un effet de l'âge et du sexe sur les niveaux de cortisol pileux. Il a également été constaté que l'incorporation de cortisol peut dépendre de la couleur de la robe et de la saison. Cependant, ces facteurs peuvent être inconsistants.

Ainsi, il convient d'utiliser des protocoles de dosage du cortisol pileux qui standardisent autant que possible ces facteurs interférents. Les recommandations peuvent comprendre l'utilisation d'animaux du même groupe d'âge, du même sexe ; l'échantillonnage de poils de la même région du corps et de la même robe ; l'utilisation de la méthode de « rasage-ravage » ; la considération de cette approche comme complémentaire aux autres mesures de cortisol et non comme alternative de ces dernières. Et en dernier, tenir compte du fait qu'il existe des périodes de vie au cours desquelles les concentrations systémiques du cortisol, et donc les taux de cortisol pileux, sont physiologiquement élevées, comme chez les animaux nouveau-nés.

Les résultats de cette recherche fournissent une base pour approfondir l'étude de l'applicabilité pratique du cortisol pileux en tant qu'indicateur du stress chronique chez le cheval. Cela nécessite également des investigations plus approfondies pour déterminer la plage physiologiquement normale du cortisol pileux chez le cheval afin de différencier entre les variations physiologiques normales et les valeurs pathologiques et pour ouvrir de nouvelles voies pour la recherche sur le stress, à savoir, l'utilisation de segments de poils des nouveau-nés comme calendrier rétrospectif pour l'évaluation du stress prénatal (Heimbürge et al., 2018).

Bibliographie

Bibliographie

AAT Bioquest, Inc., 2023. *Quest Calculate™ PBS (Phosphate Buffered Saline) (1X, pH 7,4) Préparation et recette*. Bioquête AAT.

<https://www.aatbio.com/resources/buffer-preparations-and-recipes/pbs-phosphate-buffered-saline>

Acker M., Mastromonaco G., et Schulte-Hostedde A.I., 2018. The effects of body region, season and external arsenic application on hair cortisol concentration. *Conservation physiology*, vol. 6, no 1, p. coy037

<https://academic.oup.com/conphys/article/6/1/coy037/5051675>

Ataallahi M., Ghassemi N.J., Park K.H., 2022. Selection of appropriate biomatrices for studies of chronic stress in animals: A review. *Journal of Animal Science and Technology*, vol. 64, no 4, p. 621

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9353350/>

Bagshaw C.S., Ralston S.L and Fisher H.,1994. Behavioral and physiological effect of orally administered tryptophan on horses subjected to acute isolation stress. *Applied Animal Behaviour Science*,vol. 40, no 1, p. 1-12.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0168159194900833>

Banse H.E., Getachew F., Levy M., Smits J., 2020. Influence of Season and Pituitary Pars Intermedia Dysfunction on Hair Cortisol Concentration in Horses. *Domestic Animal Endocrinology*, vol. 72, p. 106375.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0739724019300463>

Bargaâ R, Lektib I, Chakir Y, El Abbadi N, Belhouari A, Hammoumi A & El Khasmi M. (2016). Corrélation des taux de cortisol dans le sérum, les poils et les fèces chez le dromadaire (*Camelus dromedarius*). *Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux*, 2016, vol. 69, no 2, p. 87-91.

<https://revues.cirad.fr/index.php/REMVT/article/view/31184>

Bartolami S., 2015. *Adaptation Physiologique au Stress*. Faculté des Sciences, université Montpellier.

<https://docplayer.fr/17950162-Adaptation-physiologique-au-stress.html>

Battut I.,1988. La cortisolémie chez le cheval. Thèse de doctorat. École nationale vétérinaire de Toulouse.

<https://www.mcours.net/fra17/hasnfra17pdf280.pdf>

BiostaTGV. Statistiques en ligne.

<http://biostatgv.sentiweb.fr/?module=tests>

- Binz T. M., Braun U., Baumgartner M. R., & Kraemer T.,** 2016. Development of an LC–MS/MS method for the determination of endogenous cortisol in hair using ¹³C₃-labeled cortisol as surrogate analyte. *Journal of Chromatography B*, vol. 1033, p. 65-72.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S157002321630513X>
- Blumstein D.T.,** 2016. Habituation and sensitization: new thoughts about old ideas. *Animal behaviour*, vol. 120, p. 255-262.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0003347216300689>
- Boucher P., Plusquellec P.,** 2019. Acute stress assessment from excess cortisol secretion: fundamentals and perspectives. *Frontiers in endocrinology*, vol. 10, p. 749.
[doi : 10.3389/fendo.2019.00749.](https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00749)
- Bret C.L.,** 2008. Les ligands, polycopié d'enseignement de biochimie. Ecole nationale vétérinaire de Toulouse, 115 p
- Brisville A.C.,** 2006. Les marqueurs du stress chez les bovins issus de clonage somatique. Thèse de doctorat. Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort.
<https://hal.inrae.fr/tel-02817296/document>
- Burdett S.,** 2019. Exploring the relationships between behavioural responses to stress and performance, carcass composition, energy expenditure and macronutrient oxidation in restrict fed female Yorkshire pigs. Thèse de doctorat. University of Guelph.
<https://atrium.lib.uoguelph.ca/items/d018e698-9e51-40a9-88cb-2e76f5fecb74>
- Burnard C., Ralph C., Hynd P., Edwards J.H., Tilbrook A.,** 2016. Hair cortisol and its potential value as a physiological measure of stress response in human and non-human animals. *Animal Production Science*, vol. 57, no 3, p. 401-414.
<https://www.publish.csiro.au/an/AN15622>
- Burnett T.A., Madureira A.M.L., Silper B.F., Nadalin A., Tahmasbi A., Veira D.M., Cerri R.L.A.,** 2014. Factors affecting hair cortisol concentrations in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, vol. 97, no 12, p. 7685-7690.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030214006729>
- Carlitz E.H.D., Kirschbaum C., Stalder T., van Schaik C.P.,** 2014. Hair as a Long-Term Retrospective Cortisol Calendar in Orang-Utans (*Pongo Spp.*): New Perspectives for Stress Monitoring in Captive Management and Conservation. *General and comparative endocrinology*, vol. 195, p. 151-156.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0016648013004334>
- Chrousos G.,** 1995. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation. *New England Journal of Medicine*, vol. 332, no 20, p. 1351-1363.
<https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJM199505183322008>
- Comin A., Veronesi M.C., Montillo M., Faustini M., Valentini S., Cairoli F., Prandi A.,** 2012. Hair cortisol level as a retrospective marker of hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity

in horse foals. *The Veterinary Journal*, vol. 194, no 1, p. 131-132.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S109002331200161X>

Davenport MD., Tiefenbacher S., Lutz C.K., Novak M.A., Meyer J.S., 2006. Analysis of endogenous cortisol concentrations in the hair of rhesus macaques. *General and comparative endocrinology*, vol. 147, no 3, p. 255-261.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0016648006000190>

Davenport M.D., Lutz C.K., Tiefenbacher S., Novak M.A., Meyer J.S., 2008. A rhesus monkey model of self injury: effects of relocation stress on behavior and neuroendocrine function. *Biological psychiatry*, vol. 63, no 10, p. 990-996.

<https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2007.10.025>

De Kermenguy A., 2007. Mise en évidence du stress induit chez le cheval de sport et de loisir par un transport de courte durée. Etude expérimentale. Thèse de doctorat vétérinaire, Faculté de Médecine, Nantes, 114p

Debuigne M., 2016. Approche biologique et comportementale du stress chez les primates non-humains : méthodes d'évaluation et applications. Thèse de Doctorat. Campus Vétérinaire de Lyon

Desjardins I., et Cadore J.L., 2004. Etiologie et pathogénie de l'altération de la température corporelle chez le cheval. *PRATIQUE VETERINAIRE EQUINE*, vol. 36, p. 7-12.

Diquelou A., 2009. Cours de médecine : Examen clinique cardiovasculaire. Ecole nationale vétérinaire de Toulouse, 42p.

Dolomie-Fagour L. et Corcuff J. B., 2008. Is free plasmatic cortisol measurement useful in intensive care unit? In : *Annales de Biologie Clinique*. 2008. p. 31-41.

https://www.jle.com/en/revues/abc/e-docs/mesure_du_cortisol_libre_plasmatique_un_interet_en_reanimation_276750/article.phtml

Dowlati Y., Herrmann N., Swardfager W., Thomson S., Oh P.I., Van U.S., Koren G., Lanctot K.L., 2010. Relationship between hair cortisol concentrations and depressive symptoms in patients with coronary artery disease. *Neuropsychiatric disease and treatment*, p. 393-400.

<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.2147/ndt.s12160246>

Dumont M., Plancherel B., 2001. Stress et adaptation chez l'enfant. Ed. Québec, Presses de l'université du Québec, 213p.

<https://www.puq.ca/catalogue/livres/stress-adaptation-chez-enfant-100.html>

Enard F., 2008. De l'utilité du butorphanol dans la gestion de l'analgésie lors de la césarienne chez la brebis. Thèse pour le doctorat vétérinaire, Toulouse, 56p.

<https://oatao.univ-toulouse.fr/2759/>

Fairon M., 2006. L'anxiété chez les animaux de compagnie : approches conceptuelles, *clinique et thérapeutique*. Thèse de Doctorat Vétérinaire, faculté de médecine de Créteil. 95p.

- Faure C.**, 2007. Le comportement du chat et la relation homme-chat étude après enquête auprès de 471 propriétaires, Thèse pour le doctorat vétérinaire, Toulouse, 199p.
<https://oatao.univ-toulouse.fr/1038/>
- Fureix C., Jegot P., Coste C and Hausberger M.**, 2010. Indicateurs de bien-être/mal-être chez le cheval : une synthèse. 36ème Journée de la recherche équine. *Les Haras Nationaux*, p. 111-112.
https://podologie-equine-libre.net/wp-content/uploads/2013/03/fureix_et_al_jre_2010.pdf
- Ganong W.F.**, 2005. Physiologie médicale. Bruxelles De Boeck, 849 p.
- Ghassemi N.J, Ataallahi M, et Park, K. H.**, 2019. Methodological validation of measuring Hanwoo hair cortisol concentration using bead beater and surgical scissors. *Journal of animal science and technology*, vol. 61, no 1, p. 41.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6582914/pdf/jast-61-1-41.pdf>
- Ghassemi Nejad, J., Ghaffari, M.H., Ataallahi M., Jo J.H., & Lee H.G.**, 2022. Stress concepts and applications in various matrices with a focus on hair cortisol and analytical methods. *Animals*, vol. 12, no 22, p. 3096.
<https://www.mdpi.com/2076-2615/12/22/3096>
- Greenwood P.L et Shutt D.A.**, 1992. Salivary and plasma cortisol as an index of stress in goats. *Australian Veterinary Journal*, 1992, vol. 69, no 7, p. 161-163.
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1751-0813.1992.tb07501.x>
- Grossman.**, 1983. Respiration, Stress and Cardiovascular Function. *Psychophysiology*, vol. 20, no 3, p. 284-300.
https://www.researchgate.net/publication/16786982_Respiration_Stress_and_Cardiovascular_Function
- Haase N.**, 2010. Stock Adobe.
https://stock.adobe.com/contributor/201033780/nadine-haase?load_type=author&prev_url=detail&asset_id=185403613
- Hansen S.H.**, 2015. Biological samples: their composition and properties, and their collection and storage. *Bioanalysis of Pharmaceuticals: Sample Preparation, Separation Techniques, and Mass Spectrometry*, p. 23-30.
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9781118716830.ch3>
- Harewood E.J and McGowan C.M.**, 2005. Behavioral and physiological responses to stabling in naive horses. *Journal of Equine Veterinary Science*, vol. 25, no 4, p. 164-170.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0737080605001206>
- Harkey M.R.**, 1993. Anatomy and Physiology of Hair. *Forensic science international*, vol. 63, no 1-3, p. 9-18.
[https://doi.org/10.1016/0379-0738\(93\)90255-9](https://doi.org/10.1016/0379-0738(93)90255-9).
- Hart K.A., Wochele D.M., Norton N.A., McFarlane D., Wooldridge A.A., Frank N.**, 2016. Effect of Age, Season, Body Condition, and Endocrine Status on Serum Free Cortisol Fraction

and Insulin Concentration in Horses. *Journal of veterinary internal medicine*, vol. 30, no 2, p. 653-663

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jvim.13839>

Hawley J.M., Owen L.J., Lockhart S.J., et al., 2016. Serum cortisol: an up-to-date assessment of routine assay performance. *Clinical chemistry*, vol. 62, no 9, p. 1220-1229.

https://pure.manchester.ac.uk/ws/portalfiles/portal/47769370/serum_cortisol_comparison_clin_chem_2016.pdf

Hayashi H., Arai C., Ikeuchi Y., Yamanaka M., Hirayama T., 2021. Effect of growth and parturition on hair cortisol in Holstein cattle. *Animal Science Journal*, vol. 92, no 1, p. e13518.

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/asj.13518>

Heimbürge S., Kanitz E., Otten W., 2019. The use of hair cortisol for the assessment of stress in animals. *General and Comparative Endocrinology*, vol. 270, p. 10-17

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0016648018303599>

Heimbürge S., 2021. Hair cortisol concentration in cattle and pigs: Investigation of influencing factors and the potential as an indicator of long-term stress. the Institute of Animal Hygiene and Veterinary Public Health Faculty of Veterinary Medicine, Leipzig University

<https://ul.qucosa.de/landing->

[page/?tx_dlf\[id\]=https%3A%2F%2Ful.qucosa.de%2Fapi%2Fqucosa%253A75260%2Fmets](https://ul.qucosa.de/landing-page/?tx_dlf[id]=https%3A%2F%2Ful.qucosa.de%2Fapi%2Fqucosa%253A75260%2Fmets)

Heleski C.R., Shelle A.C., Nielsen B.D and Zanella A.J., 2002. Influence of housing on weanling horse behavior and subsequent welfare. *Applied Animal Behaviour Science*, vol. 78, no 2-4, p. 291-302.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0168159102001089>

Hodes A., Meyer J., Lodish M., et al., 2018. Mini-review of hair cortisol concentration for evaluation of Cushing syndrome. *Expert review of endocrinology & metabolism*, vol. 13, no 5, p.225-231.

<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/17446651.2018.1517043>

Hogg D.V., Husic M., Lovejoy D.A., 2018. Corticotropin-Releasing Hormone Peptide Family. *Encyclopedia of Endocrine Diseases, Second Edition, Volume 3* (pp.16-26) Edition 2

https://www.researchgate.net/publication/329377429_Corticotropin-releasing_hormone_peptide_family

Haupt K.A and Wolski T.R., 1982. Domestic animal behavior for veterinarians and animal scientists, The Iowa State University Press. *Auditory and visual*.

Hughes H.D., Carroll J.A., Sanchez N.C.B., Richeson J.T., 2014. Natural variations in the stress and acute phase responses of cattle. *Innate immunity*, vol. 20, no 8, p. 888-896.

<https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/1753425913508993>

Jolivald A., Ijichi C., Hall C., Yarnell K., 2023. The Mane Factor: Compliance is Associated with Increased Hair Cortisol in the Horse. *Applied Animal Behaviour Science*, vol. 258, p.

105819.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168159122002799>

Kirschbaum C., Tietze A., Skoluda N., Dettenborn L., 2009. Hair as a retrospective calendar of cortisol production increased cortisol incorporation into hair in the third trimester of pregnancy. *Psychoneuroendocrinology*, vol. 34, no 1, p. 32- 37

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S030645300800214X>

Lamari S., 2018. Prédiction des performances potentielles de la vache laitière à partir des caractéristiques de la robe et de paramètres biologiques. Thèse de doctorat. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. Université de Sétif

<http://dspace.univ-setif.dz:8888/jspui/handle/123456789/3587>

Lansade L., Neveux C., Valenchon M., Moussu C., Yvon J.M., Pasquier F and Levy F., 2011. Enrichir l'environnement des chevaux permet d'améliorer leur bien-être, de diminuer leur émotivité et d'augmenter la sécurité des manipulateurs. In : 37. *Journée de la Recherche Equine*. IFCE-Institut Français du Cheval et de l'Equitation.

Lapeyrade E., 2014. Manifestations cliniques et endocrines liées au stress chez le chien et le chat : étude bibliographique comparative. Thèse de doctorat. Université de Toulouse.

<https://oatao.univ-toulouse.fr/11280/>

Lelláková M., Lešková L., Floriána M., Mesarcová L., Skurková L., Pet'ková B., Takácová D., Kottferová J., 2022. Cortisol Concentration in Horsehair and its Relationship to Body Location, Coat Colour, and Gender. *Journal of Equine Veterinary Science*, vol. 115, p. 104010

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0737080622001484>

Levine B.S., Kerrigan S., 1999. Principles of Forensic Toxicology, Washington, DC : American Association for Clinical Chemistry.

<https://link.springer.com/book/10.1007/978-3-030-42917-1>

Lucarelli L., 2011. Prise en charge du chat hospitalisé : étude bibliographique et recommandations pratiques. Thèse de doctorat, 152p.

Mal M.E., Friend T.H., Lay D.C., Vogelsang S.G and Jenkins O.C., 1991. Behavioral responses of mares to short-term confinement and social isolation. *Applied Animal Behaviour Science*, vol. 31, no 1-2, p. 13-24.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S016815919190149R>

Matos R., 2015. Study of anxiety and separation related problems in the dog. [PhD Thesis. University of Veterinary Medicine and Pharmacy, Kosice, Slovak Republic.

<https://vetmed.agriculturejournals.cz/pdfs/vet/2017/07/01.pdf>

Mazzola S., Colombani C., Pizzamiglio G., Cannas S., Palestini C., Dalla Costa E., Gazzonis L., Bionda A and Crepaldi P., 2021. Do You Think I Am Living Well? A Four-

Season Hair Cortisol Analysis on Leisure Horses in Different Housing and Management Conditions. *Animals*, vol. 11, no 7, p. 2141.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8300697/pdf/animals-11-02141.pdf>

McCall C.A., Hall S., McElhenney W.H and Cummins K.A., 2006. Evaluation and comparison of four methods of ranking horses based on reactivity. *Applied Animal Behaviour Science*, vol. 96, no 1-2, p. 115-127.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0168159105001280>

Mcfarland D., 1999. Animal behaviour: psychobiology. *Ethology and Evolution*. Longman, vol. 3. 592p.

Medill S.A., Janz D.M., Mcloughlin P.D., 2015. Hair testosterone and cortisol concentrations and their relationships to physiological and social status in feral horses (*Equus ferus caballus*). *Proceedings of the 3rd International Equine Science Meeting, Nürtingen, Germany*. p. 28-29.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10339860/>

Mesarcova L., Kottferova J., Skurkova L., Leskova, L., & Kmecova, N. (2017). Analysis of cortisol in dog hair-a potential biomarker of chronic stress: A review. *Veterinární medicína*, 2017, vol. 62, no 7, p. 363-376.

https://www.old-aj.cz/web/vetmed.htm?type=article&id=19_2017-VETMED

Mewtow., 2013. Wikitionnaire.

<https://fr.wiktionary.org/wiki/Th%C3%A9saurus:cerveau/fran%C3%A7ais> [consulté le 1.08.2023]

Meyer J et Novak M., 2012. Minireview: Hair Cortisol: A Novel Biomarker of Hypothalamic-Pituitary-Adrenocortical Activity. *Endocrinology*, vol.153, no 9, p. 4120-4127.

<https://academic.oup.com/endo/article/153/9/4120/242388>

Meyer J., Novak M., Hamel A., & Rosenberg K., 2014. Extraction and analysis of cortisol from human and monkey hair. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, no 83, p. e50882

<https://www.jove.com/t/50882/extraction-and-analysis-of-cortisol-from-human-and-monkey-hair>

Moison M.P., Le Moal M., 2012. Le stress dans tous ses états. *médecine/sciences*, vol. 28, no 6-7, p. 612-617

[://www.medecinesciences.org/en/articles/medsci/full_html/2012/08/medsci2012286-7p612/medsci2012286-7p612.html](http://www.medecinesciences.org/en/articles/medsci/full_html/2012/08/medsci2012286-7p612/medsci2012286-7p612.html)

Montillo M, Comin A, Corazzin M, Peric T, Faustini M, Veronesi M.C , Valentini S , Bustaffa M, Prandi A. (2014). The Effect of Temperature, Rainfall, and Light Conditions on Hair Cortisol Concentrations in Newborn Foals. *Journal of Veterinary Behavior, Journal of Equine Veterinary Science*, vol. 34, no 6, p. 774-778.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0737080614000288>

Mormède P., 1988. Les réponses neuroendocriniennes de stress.

Mormède P., 1995. Le stress : interaction animal-homme-environnement. Cahiers agricultures, vol. 4, no 4, p. 275-286

<https://revues.cirad.fr/index.php/cahiers-agricultures/article/view/29900>

Mormède P., Andanson S., Aupérin B., Beerda B., Guémené D., Malmkvist J., et al., 2007. Exploration of the hypothalamic-pituitary-adrenal function as a tool to evaluate animal welfare. *Physiology & behavior*, vol. 92, no 3, p. 317-339

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0031938406005191>

Moya D., Schwartzkopf-Genswein K.S., Veira D.M., 2013. Standardization of a non-invasive methodology to measure cortisol in hair of beef cattle. *Livestock Science*, vol. 158, no 1-3, p. 138-144.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1871141313004216>

Nedelec A., 2012. Physiologie des glandes surrénaliennes. Memobio.

http://www.memobio.fr/html/bioc/bi_su_ph.html [consulté le 10.08.2023]

Nussey S., Whitehead S., 2001. Endocrinology: An Integrated Approach. UK : BIOS Scientific Publishers. 376p.

<https://www.taylorfrancis.com/books/mono/10.1201/b15306/endocrinology-nussey-whitehead>

Ohayen L., 2021. L'organisme débordé dans ses capacités adaptatives : le stress chronique.

<http://www.ohayon.lucie.free.fr>

Oster H., Challet E., Ott V., Arvat E., de Kloet E.R., Dijk D.J., et al., 2017. The functional and clinical significance of the 24-hour rhythm of circulating glucocorticoids. *Endocrine reviews*, vol. 38, no 1, p. 3-45

<https://doi.org/10.1210/er.2015-1080>

Otten W., Kanitz E., Tuchscherer M., Gräbner M., 2013. Effects of low and high protein : carbohydrate ratios in the diet of pregnant gilts on maternal cortisol concentrations and the adrenocortical and sympathoadrenal reactivity in their offspring. *Journal of animal science*, vol. 91, no 6, p. 2680-2692.

<https://academic.oup.com/jas/article-abstract/91/6/2680/4717198>

Pawluski P., Rupert S., Henry P., Jégo C., Coste M., Hausberger., 2018. Que nous indiquent les hormones de stress ? Différentes mesures de cortisol indiquent un niveau plus chez des chevaux dont le bien-être est altéré. In : 44ème Journée de la Recherche Équine. p. 140-143.

<https://univ-rennes.hal.science/hal-01832805/>

Peeters M., 2011. Evaluation du niveau de stress du cheval en compétition et en milieu hospitalier, Thèse de doctorat. Université de Liège.

<https://orbi.uliege.be/bitstream/2268/103653/1/Th%C3%A8se%20compl%C3%A8te%20Marie%20Peeters.pdf>

- Placci M., Marliani G., Sabioni S., Gabai G., Mondo E., Borghetti P., De Angelis E., Accorsi P.A.**, 2020. Natural horse boarding vs traditional stable: a comparison of hormonal, hematological and immunological parameters. *Journal of Applied Animal Welfare Science*, vol. 23, no 3, p. 366-377.
<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10888705.2019.1663737>
- Price Eo.**, 1998. Behavioral development in animals undergoing domestication. *Applied Animal Behaviour Science* 65, 245-271.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1591\(99\)00087-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1591(99)00087-8)
- Pritchard J.C., Lindberg A.C., Main D.C.J., and Whay H.R.**, 2005. Assessment of the welfare of 1740 working horses, mules and donkeys, using health and behaviour parameters. *Preventive veterinary medicine*. 69, 1741 265
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0167587705000681>
- Reeder D.M., & Kramer K.M.**, 2005. Stress in free-ranging mammals: integrating physiology, ecology, and natural history. *Journal of Mammalogy*, vol. 86, no 2, p. 225-235.
<https://academic.oup.com/jmammal/article/86/2/225/890330>
- Regan C.E., Medill S.A., Poissant J., McLoughlin P.D.**, 2020. Causes and Consequences of an Unusually Male-Biased Adult Sex Ratio in an Unmanaged Feral Horse Population. *Journal of Animal Ecology*, vol. 89, no 12, p. 2909-2921.
<https://besjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/1365-2656.13349>
- Rehbinder C and Hau J.**,2006. Quantification of cortisol, cortisol immunoreactive metabolites, and immunoglobulin A in serum, saliva, urine, and feces for noninvasive assessment of stress in reindeer. *Can. J. Vet. Res.* 70(2): 151-154.
https://www.researchgate.net/publication/7141019_Quantification_of_cortisol_cortisol_immuno_reactive_metabolites_and_immunoglobulin_A_in_serum_saliva_urine_and_feces_for_noninvasive_assessment_of_stress_in_reindeer
- Rietmann T.R., Stuart A.E.A., Bernasconi P., Stauffacher M., Auer J.A et Weishaupt M.A.**, 2004. Assessment of mental stress in warmblood horses: heart rate variability in comparison to heart rate and selected behavioural parameters. *Applied Animal Behaviour Science*, vol. 88, no 1-2, p. 121-136.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0168159104000607>
- Rochais C., Fureix C., Lesimple C., Hausberger M.**, 2016. Lower attention to daily environment: a novel cue for detecting chronic horses' back pain? *Sci Rep. Nature Publishing*. 6: 20117.
<https://doi.org/10.1038/srep20117> PMID: 26823123
- Rochette L et Vergely C.**, 2017. Rappels de la physiologie du stress : systèmes sympathique et para-sympathique. *Stress, pathologies et immunité : Médecine –Sciences Flammarion*. P35- 44.
- Romero L.M., et Butler L.K.**, 2007. Endocrinology of stress. *International Journal of Comparative Psychology*, 20(2-3), 89–95.

- Roth L.S.V., Faresjö Å., Theodorsson E., Jensen P.,** 2016. Hair cortisol varies with season and lifestyle and relates to human interactions in German shepherd dogs. *Scientific Reports*, vol. 6, no 1, p. 19631.
<https://www.nature.com/articles/srep19631>
- Russell E., Kirschbaum C., Laudenslager M.L., Stalder T., de Rijke Y., van Rossum EFC, et al.,** 2015. Toward standardization of hair cortisol measurement. *Therapeutic drug monitoring*, vol. 37, no 1, p. 71-75.
https://journals.lww.com/drug-monitoring/abstract/2015/02000/toward_standardization_of_hair_cortisol.10.aspx
- Sapolsky R.M., Romero L.M., & Munck A.U.,** 2000. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions 1. *Endocrine reviews*, 21(1), 55–89
- Sauveroché M., Henriksson J., Theodorsson E., Svensson Holm A and Roth L.,** 2020. Hair cortisol in horses (*Equus caballus*) in relation to management regimes, personality and breed. *Journal of Veterinary Behavior*, vol. 37, p. 1-7
<http://liu.diva-portal.org/smash/get/diva2:1397278/FULLTEXT01.pdf>
- Selye H.,** 1946. The general adaptation syndrome and the diseases of adaptation. *Journal of Allergy*, 17(4), 231-247
- Sheriff M.J., Dantzer B., Delehanty B., Palme R., & Boonstra R.,** 2011. Measuring stress in wildlife: techniques for quantifying glucocorticoids. *Oecologia*, vol. 166, no 4, p. 869-887.
<https://link.springer.com/article/10.1007/s00442-011-1943-y?null>
- Smyth N.,** 2013. Cortisol secretion in saliva and hair: methodological considerations and relationships with state and trait well-being 2013. Thèse de doctorat. University of Westminster.
<https://westminsterresearch.westminster.ac.uk/item/8z18y/cortisol-secretion-in-saliva-and-hair-methodological-considerations-and-relationships-with-state-and-trait-well-being>
- Squires E.J.,** 2003. *Applied Animal Endocrinology*, Wallingford, UK: CABI Publishing.
- Thau L., Gandhi J., Sharma S.,** 2021. Physiology, cortisol. StatPearls.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538239/>
- Thorell G., Hedenborg S.,** 2015. Riding instructors, gender, militarism, and stable culture in Sweden: Continuity and change in the twentieth century. *The International Journal of the History of Sport*, 2015, vol. 32, no 5, p. 650-666
<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/09523367.2015.1021337>
- Trevisan C., Montillo M., Prandi A., Mkupasi E.M., Ngowi H.A., Johansen M.V.,** 2017. Hair cortisol and dehydroepiandrosterone concentrations in naturally *Taenia solium* infected pigs in Tanzania. *General and Comparative Endocrinology*, vol. 246, p. 23-28.
<https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2017.03.007>
- Trevisi E., Bertoni G.,** 2009. Some physiological and biochemical methods for acute and chronic stress evaluation in dairy cows. *Italian Journal of Animal Science*, vol. 8, no sup1, p.

265-286

<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4081/ijas.2009.s1.265>

Turner A.I., Keating C.L., & Tilbrook A.J., 2012. Sex differences and the role of sex steroids in sympatho-adrenal medullary system and hypothalamo-pituitary adrenal axis responses to stress. *Sex steroids*, vol. 12, p. 115-136.

<https://researchbank.swinburne.edu.au/file/8ef9f6dc-26cb-4805-af8f-831d54fe309f/1/PDF%20%28Published%20version%29.pdf>

Turquetil A et Reznik Y., 2019. Les glandes surrénales, rôle et dysfonctionnement. *Actualités pharmaceutiques*, vol. 58, no 585, p. 18-22.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0515370019300655>

Viérin M., Bouissou M.F., Vandenheede M., Trillaud-Geyl C and Arnaud G., 1998., Developpement d'une méthodologie destinée à mesurer les réactions de peur chez le cheval. Application à l'étude de l'influence de différents facteurs. In : *24ème Journée de la Recherche Equine*.

<https://orbi.uliege.be/handle/2268/13810>

von Borstel U.U., Duncan I.J.H., Shoveller A.K., Merkies K., Keeling L.J., & Millman S.T., 2009. Impact of riding in a coercively obtained Rollkur posture on welfare and fear of performance horses. *Applied Animal Behaviour Science*, vol. 116, no 2-4, p. 228-236.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0168159108002876>

Werhahn, H., Hessel, E. F., & Van den Weghe, H. F., 2011. Competition horses housed in single stalls (II): effects of free exercise on the behavior in the stable, the behavior during training, and the degree of stress. *Journal of Equine Veterinary Science*, vol. 32, no 1, p. 22-31.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0737080611004187>

Yamanashi Y., Morimura N., Mori Y., Hayashi M., Suzuki J., 2013. Cortisol Analysis of Hair of Captive Chimpanzees (Pan troglodytes). *General and comparative endocrinology*, vol. 194, p. 55-63.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0016648013003596>

Zannoni A., Pietra M., Gaspardo A., Accorsi P.A., Barone M., Turrone S et al., 2020. Non-invasive assessment of fecal stress biomarkers in hunting dogs during exercise and at rest. *Frontiers in Veterinary Science*, vol. 7, p. 126.

<https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00126>

Annexes

Annexes

Annexe I. Protocole détaillé de la préparation de la solution PBS (Phosphate Buffered Saline) (AAT Bioquest, Inc., 2023)

1. Composants requis

- Eau distillée
- Chlorure de sodium (PM : 58.44 g/mol ; 0.137 M)
- Chlorure de potassium (PM : 74.55 g/mol ; 0.0027 M)
- Sodium phosphate dibasique (NaH_2PO_4 ; PM : 141.96 g/mol ; 0.01 M)
- Potassium phosphate monobasique (KH_2PO_4 ; PM : 136.09 g/mol ; 0.0018 M)

2. Protocole de préparation

Pour préparer 1L de solution PBS, pH 7,4 :

- Préparer 800 ml d'eau distillée dans un récipient adapté.
- Ajouter 8 g de chlorure de sodium à la solution.
- Ajouter 0,2 g de chlorure de potassium à la solution.
- Ajouter 1,44 g de phosphate de sodium dibasique à la solution.
- Ajouter 0,245 g de phosphate de potassium monobasique à la solution.
- Ajuster la solution au pH souhaité (généralement $\text{pH} \approx 7,4$).
- Ajouter de l'eau distillé jusqu'à ce que le volume atteigne 1L.