



Open Archive TOULOUSE Archive Ouverte (OATAO)

OATAO is an open access repository that collects the work of Toulouse researchers and makes it freely available over the web where possible.

This is an author-deposited version published in : <http://oatao.univ-toulouse.fr/>
Eprints ID : 19340

To cite this version :

Lussert, Alexandra. *Analyse multiparamétrique et évaluation comportementale lors de mammite expérimentale a escherichia coli chez la vache laitière*. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse – ENVT, 2017, 113 p.

Any correspondance concerning this service should be sent to the repository administrator: staff-oatao@inp-toulouse.fr.

ANALYSE MULTIPARAMÉTRIQUE ET ÉVALUATION COMPORTEMENTALE LORS DE MAMMITE EXPÉRIMENTALE À *ESCHERICHIA COLI* CHEZ LA VACHE LAITIÈRE

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

LUSSERT, Alexandra
Née, le 16/06/1990 à MONTPELLIER (34)

Directeur de thèse : M. Gilles FOUCRAS

JURY

PRESIDENT :
M. Éric OSWALD

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :
M. Gilles FOUCRAS
M. Dominique BERGONIER

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE
Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

MEMBRE INVITE :
Mme Alice DE BOYER DES ROCHES

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de LYON

**Ministère de l'Agriculture de l'Alimentation
ECOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE**

Directrice : **Madame Isabelle CHMITELIN**

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

- M. **AUTEFAGE André**, *Pathologie chirurgicale*
- Mme **CLAUW Martine**, *Pharmacie-Toxicologie*
- M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*
- M. **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie Pathologique*
- M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
- M. **FRANC Michel**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
- M. **MILON Alain**, *Microbiologie moléculaire*
- M. **PETIT Claude**, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. **SHELCHER François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

PROFESSEURS 1° CLASSE

- M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
- M. **BERTHELOT Xavier**, *Pathologie de la Reproduction*
- M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Physiologie et Thérapeutique*
- M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des aliments d'Origine animale*
- Mme **CHASTANT-MAILLARD Sylvie**, *Pathologie de la Reproduction*
- M. **DUCOS Alain**, *Zootecnie*
- M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
- Mme **HAGEN-PICARD, Nicole**, *Pathologie de la reproduction*
- M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
- M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*
- M. **LIGNEREUX Yves**, *Anatomie*
- M. **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **PICAVET Dominique**, *Pathologie infectieuse*
- M. **SANS Pierre**, *Productions animales*
- Mme **TRUMEL Catherine**, *Biologie Médicale Animale et Comparée*

PROFESSEURS 2° CLASSE

- M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des aliments*
- Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*
- Mme **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie Vétérinaire*
- M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. **GUERIN Jean-Luc**, *Aviculture et pathologie aviaire*
- Mme **LACROUX Caroline**, *Anatomie Pathologique, animaux d'élevage*
- Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*
- M. **MAILLARD Renaud**, *Pathologie des Ruminants*

PROFESSEURS CERTIFIES DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

Mme **MICHAUD Françoise**, *Professeur d'Anglais*

M **SEVERAC Benoît**, *Professeur d'Anglais*

MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE

M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*

Mme **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*

Mme **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*

M. **DOSSIN Olivier**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*

M. **JOUGLAR Jean-Yves**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*

M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*

Mme **MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation*

M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*

Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*

M. **VERWAERDE Patrick**, *Anesthésie, Réanimation*

MAITRES DE CONFERENCES (classe normale)

M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*

Mme **BENNIS-BRET Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*

Mme **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*

Mme **BOUCLAINVILLE-CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*

Mme **BOUHSIRA Emilie**, *Parasitologie, maladies parasitaires*

M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*

M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*

M. **CUEVAS RAMOS Gabriel**, *Chirurgie Equine*

Mme **DANIELS Hélène**, *Microbiologie-Pathologie infectieuse*

Mme **DEVIERS Alexandra**, *Anatomie-Imagerie*

M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophthalmologie vétérinaire et comparée*

Mme **FERRAN Aude**, *Physiologie*

M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*

Mme **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*

M. **LE LOC'H Guillaume**, *Médecine zoologique et santé de la faune sauvage*

M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*

Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie Chirurgicale*

Mme **MILA Hanna**, *Elevage des carnivores domestiques*

M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction (en disponibilité)*

Mme **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*

Mme **PAUL Mathilde**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles et porcins*

Mme **PRADIER Sophie**, *Médecine interne des équidés*

M. **RABOISSON Didier**, *Productions animales (ruminants)*

M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et Infectiologie*

Mme **WARET-SZKUTA Agnès**, *Production et pathologie porcine*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

Mme **COSTES Laura**, *Hygiène et industrie des aliments*

M. **GAIDE Nicolas**, *Histologie, Anatomie Pathologique*

Mme **LALLEMAND Elodie**, *Chirurgie des Equidés*

Mme **SABY-CHABAN Claire**, *Gestion de la santé des troupeaux bovins*

Remerciements

À notre président de thèse :

À Monsieur le professeur Eric OSWALD

Professeur à l'Université Paul Sabatier à Toulouse

Bactériologie et Hygiène

Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse

Veillez trouver ici l'expression de nos respectueux hommages.

À notre jury de thèse

À Monsieur le Professeur Gilles FOUCRAS

Professeur à l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse

Pathologies des ruminants

Qui nous a fait l'honneur de nous confier ce projet et nous a écouté, soutenu et aidé durant sa construction.

Veillez accepter l'expression de notre profond respect et de notre sincère reconnaissance.

À Monsieur le Docteur Dominique BERGONIER

Maître de conférences à l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse

Pathologie de la reproduction

Qui nous a fait l'honneur de faire partie de notre jury de thèse,

Nos plus sincères remerciements

À Madame Alice DE BOYER DES ROCHES

Maître de conférences à VetAgro Sup- Campus Vétérinaire de Lyon

Éthologie, Élevage et Santé Publique Vétérinaire

Qui nous a appris et soutenu dans l'exploration du comportement des vaches,

Notre entière reconnaissance

Table des Matières

Introduction générale.....	11
I. Etat de l'art et revue bibliographique	12
I.1. Le bien-être animal, une préoccupation de plus en plus présente.....	12
I.1.1. Concept de bien-être animal	12
I.1.1.1. De la première loi de protection animale à la définition de l'animal dans le code civil en tant qu'être sensible	12
I.1.1.2. Evaluation du bien-être animal : Welfare Quality.....	14
I.1.2. Perception actuelle du bien-être animal.....	16
I.1.2.1. Point de vue sociétal et des consommateurs	16
I.1.2.2. Point de vue des acteurs des filières de production animale	16
I.2. La douleur, phénomène aux conséquences multiples et difficile à évaluer chez les bovins	18
I.2.1. Physiologie de la douleur	18
I.2.1.1. Définition de la douleur.....	18
I.2.1.2. Etapes du flux nerveux : réception, conversion, transmission, modulation et intégration centrale	19
I.2.1.3. Douleur par excès de nociception : mécanismes et modalités de traitement	20
I.2.2. Evaluation de la douleur chez les bovins.....	22
I.2.2.1. Signes de douleur chez les bovins.....	22
I.2.2.2. Méthodes d'évaluation de la douleur chez les bovins.....	23
I.3. La mammite, une affection douloureuse aux multiples enjeux	25
I.3.1. Définition et enjeux	25
I.3.1.1. Définition	25
I.3.1.2. Enjeux à l'échelle de la filière.....	25
I.3.1.3. Enjeux à l'échelle de l'élevage.....	26
I.3.2. Physiopathologie de la mammite.....	28

I.3.2.1.	Etiologie	28
I.3.2.2.	Modalités de contamination et immunité	29
I.3.2.3.	Réponse inflammatoire et douleur	32
I.3.3.	Conséquences d'une mammite chez la vache.....	35
I.3.3.1.	Impact de la mammite <i>stricto sensu</i>	35
I.3.3.2.	Impact de la douleur	36
I.3.3.3.	Evaluation comportementale de la douleur provoquée par une mammite chez les bovins	37
II.	Etude expérimentale	40
II.1.	Objectifs de l'étude :	40
II.2.	Analyse multiparamétrique des effets d'une mammite à <i>Escherichia coli</i>	40
II.2.1.	Matériels et Méthodes	40
II.2.1.1.	Description générale de l'expérimentation	40
II.2.1.2.	Collecte et traitement des données des observations comportementales	43
II.2.1.3.	Méthodes statistiques	48
II.2.2.	Résultats.....	49
II.2.2.1.	Description des résultats des données comportementales.....	49
II.2.2.2.	Définition des phases	54
II.2.2.3.	Comparaison entre la phase pré-inoculation et les phases post-inoculation	55
II.2.2.4.	Variabilité individuelle des effets en fonction du temps et du traitement	61
III.	Discussion générale.....	63
	Conclusion générale	79
III.	Bibliographie	81
IV.	Annexes.....	90

Liste des Figures

Figure 1 : Schéma simplifié des mécanismes nerveux responsable de la sensation de douleur	19
Figure 2 : Coupe transversale des quartiers caudaux d'une mamelle de vache, extrait de Barone (1990).....	29
Figure 3 : Schéma simplifié du lieu d'action des AINS et des corticoïdes dans le processus de douleur inflammatoire	34
Figure 4 : Schéma de la chronologie des données récoltées	41
Figure 5 : Diagramme en boîte du temps de décubitus par rapport au temps T0.....	50
Figure 6 : Diagramme en boîte de la fréquence des changements de position par rapport au temps T0.....	50
Figure 7 : Diagramme en boîte du niveau d'éveil des vaches	51
Figure 8 : Diagramme en boîte de l'humeur des vaches.....	51
Figure 9 : Évolution du score d'expressions faciales.....	52
Figure 10 : Évolution du score de postures anormales.....	52
Figure 11 : Évolution du score d'attitude générale	52
Figure 12 : Évolution du score de la position des oreilles.....	52
Figure 13 : Évolution du score de la position de la queue	52
Figure 14 : Évolution du score de signes cliniques	52
Figure 15 : Diagramme en boîte de la fréquence des pas pendant la traite par rapport à T0 ...	53
Figure 16 : Diagramme en boîte de la fréquence de coups de pied pendant la traite par rapport à T0.....	53
Figure 17 : Résultat graphique de l'analyse factorielle discriminante définissant les phases de la mammite.....	54
Figure 18 : Évolution des concentrations médianes d'IL-22 dans le lait en fonction du traitement.....	61
Figure 19 : Évolution des concentrations logarithmiques des bactéries dans le lait en fonction du traitement.....	62
Figure 20 : Représentation graphique de la corrélation des axes et des variables incluses (IN) ou non incluses (OUT) au modèle de la première analyse factorielle discriminante.....	95
Figure 21 : Représentation graphique de la corrélation des axes et des variables incluses (IN) ou non incluses (OUT) au modèle de la deuxième analyse factorielle discriminante	96
Figure 22 : Résultat graphique de la deuxième analyse factorielle discriminante	97

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Principes et critères du Welfare Quality®, traduit du Welfare Quality assessment for dairy cattle	15
Tableau 2 : Éthogramme du Qualitative Behaviour Assessment, issue du “Welfare Quality® Assessment Protocol for dairy cattle”	44
Tableau 3 : Synthèse des résultats de l'ACP, définition des axes par les descripteurs.....	45
Tableau 4 : Éthogramme et scores de l'évaluation comportementale quantitative	45
Tableau 5 : Ethogramme de l'évaluation du comportement à la traite	47
Tableau 6 : Pourcentage d'individus replacés correctement selon le modèle	55
Tableau 7 : Variables de l'analyse factorielle discriminant significativement les phases pré-inoculation et pré-clinique.....	56
Tableau 8 : Variables de l'analyse factorielle discriminant significativement les phases pré-inoculation et d'état.....	57
Tableau 9 : Variables de l'analyse factorielle discriminant significativement les phases pré-inoculation et de rémission.....	59
Tableau 10 : Comparaison des variables comportementales indicatrices dans les phases d'état et de rémission.....	75
Tableau 11 : Synthèse des comportements étudiés et leur significativité dans différentes publications	94
Tableau 12 : Test unidimensionnel d'égalité des moyennes, corrélations des axes avec les variables incluses au modèle de la première analyse factorielle discriminante	95
Tableau 13 : Résultats de la validation croisée de la première analyse factorielle discriminante	96
Tableau 14 : Test unidimensionnel d'égalité des moyennes, corrélations des axes avec les variables incluses au modèle de la deuxième analyse factorielle discriminante	96
Tableau 15 : Résultats de la validation croisée de la deuxième analyse factorielle.....	97
Tableau 16 : Synthèse des variables contributives lors de la comparaison des phases post-inoculation avec la phase pré-inoculation	98

Liste des Abréviations

ACP	Analyse en Composantes Principales	LPS	LipoPolySaccharide
ACTH	AdrÉno-Cortico Tropic Hormone	MAMP	Microbe Associated Molecular Patterns
AINS	Anti-Inflammaroires Non Stéroïdiens	NMDA	N-Méthyl-D-Aspartate
AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-méthylisoxasole	OIE	Organisation mondiale de la santé animale, anciennement Office Internationale des Epizooties
CCS	Concentration des Cellules Somatiques	PGE2	ProstaGlandine E2
CGRP	Calcium Gene Related Peptide	PGF2 α	ProstaGlandine F2 α
CIWF	Compassion International in World Farming	PRR	Pattern Recognition Receptor
COX	Cyclo-OXYgénases	QBA	Qualitative Assessment Behaviour
DAMP	Damage Associated Molecular Patterns	SAA	Serum Amyloide A
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	SCN	Staphylocoques Coagulase Négatif
GNN	GraNulocytes Neutrophiles	SCP	Staphylocoques Coagulase Positif
IFN- γ	InterFéroN γ	SCS	Score de Cellules Somatiques (log2(CCS/100 000)+3)
IL-1	InterLeukine 1	TIAC	Toxi-Infection Alimentaire Collective
IL-6	InterLeukine 6	TNF α	Tumor Necrosis Factor α
IL-17	InterLeukine 17	UFC	Unités Formant Colonie
IL-22	InterLeukine 22		
LOX	LipOXYgénases		

Introduction générale

Le bien-être animal est un concept relativement récent auquel la société est de plus en plus attentive. Pour l'améliorer, il faut le définir et être en mesure de l'évaluer voire de le quantifier. L'absence de douleur chez l'animal est un des critères nécessaires pour obtenir une amélioration de cet état. Cela passe par une reconnaissance de la douleur dont l'expression est variable en fonction des espèces, et la connaissance des causes susceptibles de la provoquer. La mammite est une des maladies les plus fréquentes dans les élevages de bovins laitiers. Pour mieux connaître cette maladie, l'expérimentation menée a mesuré des critères cliniques et éthologiques ainsi que des critères biochimiques et cellulaires dans le sang et dans le lait. Ainsi nous espérons apporter des informations nouvelles afin d'améliorer le diagnostic, le traitement de cette affection et ainsi mieux prévenir ou maîtriser la douleur qui en découle.

I. Etat de l'art et revue bibliographique

I.1. Le bien-être animal, une préoccupation de plus en plus présente

I.1.1. Concept de bien-être animal

I.1.1.1. De la première loi de protection animale à la définition de l'animal dans le code civil en tant qu'être sensible

Au XIX^{ème} siècle, au plan juridique, l'animal était considéré comme un meuble et avait seulement une fonction d'utilité (République Française 1804). La première loi de protection animale, en France, est la loi Grammont du 2 juillet 1850. Elle limite la maltraitance des animaux de ferme et du cheval, en condamnant celles réalisées en public et de manière abusive. La création de la Société Protectrice des Animaux en 1846 et la loi Grammont ont pour origine la protection des chevaux, animaux omniprésents dans la vie quotidienne de l'époque (transports, agriculture, ...) (Burgat 1997). La création de l'Europe ne changera rien au statut de l'animal, il sera assimilé aux biens meubles par le traité de Rome en 1957 (Dupas 2005). La loi Grammont sera appliquée pendant plus d'un siècle.

Après son abrogation en 1959, cette loi a été remplacée par différents décrets et différentes lois, qui, au fur et à mesure, vont protéger l'intégrité physique des animaux : le décret du 7 septembre 1959 interdit la maltraitance animale, et permet le placement et la garde des animaux maltraités par une association de protection animale. Le délit d'acte de cruauté est créé en 1963.

La loi du 10 juillet 1976 définit l'animal comme une créature sensible, envers laquelle le propriétaire a des devoirs. L'abandon volontaire devient un délit au même titre que les sévices graves et les actes de cruauté. Les associations de protection animale reconnues d'utilité publique peuvent désormais se porter partie civile (République Française 1976a). Les animaux sauvages sont cités pour la première fois, et les expérimentations animales pourront être encadrés par décret (République Française 1976b). (Burgat 1997).

La déclaration universelle des droits de l'animal (Annexes A), proclamée en 1978, n'a pas de valeur juridique (Babadji 1999), mais elle propose une éthique sur la manière de traiter l'animal dans nos sociétés (Burgat 1997).

L'Europe prend plusieurs mesures pour protéger les animaux et prendre en compte leur bien-être que ce soit pour les conditions de transport (en 1991 puis 1995), l'abattage (1993), l'élevage (1998), et dans le cadre de l'expérimentation animale (2003). La convention du 13 novembre 1987, ratifiée par 13 Etats-Membres définit la notion d'animal de compagnie et sa protection (Dupas 2005).

En 1992, le traité de Maastricht incite les Etats-membres de l'UE à prendre en considération « *les exigences en matière de bien-être des animaux* » (Union Européenne 1992). Dans la même année, le code pénal français évolue : les infractions liées aux animaux sont différenciées dans un nouveau livre de celles liées aux biens meubles (Dupas 2005).

En 1997, le traité d'Amsterdam définit l'animal comme un être sensible, et oblige les Etats-membres à intégrer le bien-être animal dans leur législation, tout en respectant les lois en vigueur et les pratiques nationales (exemple : la corrida en France) (Union Européenne 1997). Ces termes seront repris par la Constitution européenne (Union Européenne 2004). En conséquence, la France modifie le Code rural et de la pêche maritime : « *Tout animal étant un être sensible doit être placé par son propriétaire dans des conditions compatibles avec les impératifs biologiques de son espèce* ».

En mai 2002, l'OIE (Organisation mondiale pour la santé animale) crée un groupe de travail sur le bien-être animal (OIE 2014). En reprenant les cinq libertés définies par the *Farm Animal Welfare Council* (Farm Animal Welfare Committee 1992), cela aboutira à des principes généraux (Annexe B) et à une définition du bien-être animal (OIE 2002):

« *On entend par bien-être animal la manière dont un animal évolue dans les conditions qui l'entourent. Le bien-être d'un animal (évalué selon les bases scientifiques) est considéré comme satisfaisant si les critères suivants sont réunis : bon état de santé, confort suffisant, bon état nutritionnel, sécurité, possibilité d'expression du comportement naturel, absence de souffrances telles que douleur, peur ou détresse.*

Le bien-être animal requiert les éléments suivants : prévention et traitement appropriés des maladies, protection, soins, alimentation adaptée, manipulations réalisées sans cruauté, abattage ou mise à mort dans des conditions décentes. La notion de bien-être animal se réfère à l'état de l'animal, le traitement qu'un animal reçoit est couvert par d'autres termes tels que soins, conditions d'élevage et bien-traitance »

Le 16 février 2015, les animaux sont définis comme « des êtres vivants doués de sensibilité » dans l'article 515-14 du code civil (République Française 2015).

I.1.1.2. Evaluation du bien-être animal : Welfare Quality

En mai 2004, dans le cadre de son 6^{ème} programme cadre, la commission européenne a mis en place le *Welfare Quality project* ; ce projet réunissait 44 instituts de recherche et universités, de 17 pays différents dont 13 pays européens et 4 pays latino-américains. Sa durée a été de 5 ans.

Un des objectifs de ce projet était de développer des mesures pour améliorer le bien-être des animaux d'élevage, de standardiser son évaluation et l'information qui en découle pour la délivrer aux consommateurs. Par le nombre d'individus et leur importance économique, les volailles, les bovins et les porcs sont les espèces ciblées par ces protocoles. L'esprit de cette évaluation est de maximiser la part des mesures directement liées à l'animal, et de limiter celle de son environnement (mesure de la note d'état corporel de l'animal plutôt que le calcul de la ration qui lui est distribuée). (Welfare Quality 2009)

L'évaluation est basée sur quatre grands principes répartis en 12 critères indépendants, évalués par une trentaine de mesures réalisées sur l'animal dans l'élevage (Tableau 1). Les différentes mesures sont résumées soit par des scores à l'échelle du troupeau, soit par des scores individuels transformés en pourcentages à l'échelle du troupeau. Les scores de critères sont regroupés selon leur importance, afin de donner des scores de principes sur 100, puis un score total sur 100. Les élevages sont ensuite classés en quatre catégories en fonction des quatre scores de principe :

- excellent si les scores sont supérieurs à 55, dont au minimum deux sont supérieurs à 80
- amélioré si les scores sont supérieurs à 20, dont au minimum deux sont supérieurs à 55
- acceptable si les scores sont supérieurs à 10, dont au minimum trois sont supérieurs à 20
- non classé pour les élevages ne répondant pas à ces standards, le bien-être des animaux est alors considéré comme mauvais et inacceptable. (Welfare Quality 2009)

Tableau 1 : Principes et critères du Welfare Quality®, traduit du Welfare Quality assessment for dairy cattle

Principes	Critères	Mesures pour les vaches laitières
Alimentation suffisante	1 Absence de faim prolongée	Note d'état corporel
	2 Absence de soif prolongée	Approvisionnement en eau, propreté des points d'eau, débit d'eau, fonctionnement des abreuvoirs
Logement adéquate	3 Confort de couchage	Temps nécessaire pour le couchage, chocs contre les équipements au moment du couchage, vache couchée en partie ou complètement à l'extérieur de la zone de couchage, propreté de la mamelle, des flancs/hauts des membres, de l'extrémité des membres.
	4 Confort thermique	Aucune mesure développée pour les vaches laitières
Bonne santé	5 Facilité de mouvement	Mode de logement (libre ou entravé), accès suffisant à un parcours extérieur ou à une pâture
	6 Absence de blessure	Boiteries, lésions du tégument externe
	7 Absence de maladie	Toux, écoulements nasal et/ou oculaire, gêne respiratoire, diarrhée, écoulement vulvaire, mortalité, dystocie, concentration des cellules somatiques du lait, vache couchée
Comportement approprié	8 Absence de douleur induit par des manipulations inappropriées	Méthode d'écornage et de caudectomie, gestion de l'analgésie
	9 Expression des comportements sociaux	Comportements agonistes
	10 Expression d'autres comportements	Accès à la pâture
	11 Bonne relation homme-animal	Distance d'évitement
	12 Etat émotionnel positif	Qualitative Behaviour Assessment (QBA) : approche qualitative du comportement de l'animal par l'observation de son « langage corporel »

1.1.2. Perception actuelle du bien-être animal

I.1.2.1. Point de vue sociétal et des consommateurs

Les citoyens s'intéressent au bien-être animal ; par exemple 64% des européens (et 88% des Français) souhaiteraient avoir plus d'informations sur les conditions de vie des animaux de rente dans leur pays (+6% depuis 2006). Dans l'étude de Dockès et al. (2007), les consommateurs n'utilisent pas spontanément le terme de bien-être animal et il leur est plus facile de décrire un « mauvais » élevage que de définir le bien-être animal. Lorsqu'on leur impose des choix, comme lors de l'Eurobaromètre (European Commission 2015) : le devoir de respecter tous les animaux et la manière de traiter les animaux de rente, en améliorant leur qualité de vie sont considérés comme des définitions du bien-être animal (respectivement, par 46 et 40% des européens, 59 et 46% des Français).

Depuis une dizaine d'années, les européens sont de plus en plus nombreux à penser qu'il est important de promouvoir le bien-être animal (94% des européens et 98% des français en 2015, +5% depuis 2006), et d'améliorer celui des animaux de ferme dans leur pays (82% des européens). De plus, ils considèrent que le bien-être animal doit faire partie des signes de qualité car pour eux, une viande de qualité vient d'un animal en bonne santé et adapté à son environnement d'élevage (European Commission 2015; Dockès et al. 2007; Lamine 2006). Cependant les études divergent sur l'avis des consommateurs à propos de l'intérêt d'une certification « bien-être animal », ainsi que sur leur volonté de payer plus cher un produit respectant le bien-être animal. D'après Dockès et al. 2007, les consommateurs sont mal à l'aise avec cette question car ils ont conscience du probable surcoût de l'amélioration des conditions de vie des animaux mais ils ne sont pas surs d'être prêts à le payer. Alors que d'après l'Eurobaromètre (European Commission 2015), trois européens sur cinq sont prêts à payer plus cher un produit respectant le bien-être animal, dont une majorité paierait ce produit jusqu'à 5% plus cher.

I.1.2.2. Point de vue des acteurs des filières de production animale

Comme les consommateurs, les éleveurs n'utilisent pas spontanément le terme de bien-être animal, cela leur évoque la vie quotidienne et la relation qu'ils ont avec leurs animaux. Chaque jour ils évaluent le bien-être des animaux comme une impression globale, c'est-à-dire que si le troupeau est calme lorsque l'éleveur rentre dans le bâtiment, c'est que les animaux se

sentent bien. Pour eux, le bien-être animal passe par le respect des besoins nutritionnels, d'un environnement de qualité, d'un bon état sanitaire et d'une absence de stress et d'anxiété. Ils sont en totale adéquation avec la définition des cinq libertés du Farm Animal Welfare Committee (1992). Pour eux, le bien-être de leurs animaux permet de meilleures performances zootechniques dont une meilleure qualité de la viande et influence positivement leur moral (Dockès et al. 2007). Les organisations représentant les éleveurs sont plus restrictives lorsqu'elle parle de bien-être animal en mettant en avant les besoins physiologiques essentiels avant les objectifs de rentabilité économique (Lamine 2006). Les éleveurs, comme les consommateurs souhaitent une réglementation protégeant les animaux, qui soit uniforme au moins au niveau européen voire à l'échelle internationale. Cependant ils connaissent mal la réglementation générale en cours et les avis des éleveurs sont partagés : certains estiment qu'elle est trop stricte ou inadaptée, alors que d'autres la considèrent comme légitime et suffisante (Dockès et al. 2007; European Commission 2015).

Même si les éleveurs ne croient pas aux bénéfices d'une certification sur le bien-être animal et que les consommateurs sont sceptiques, certains distributeurs et industries agro-alimentaires pensent qu'elle a sa place. Ils multiplient les annonces et les engagements en faveur de la distribution de produits animaux garantissant le bien-être animal. Par exemple, huit entreprises françaises dont trois distributeurs ont reçu des récompenses par l'Organisation Non Gouvernementale Internationale Compassion In World Farming (CIWF) pour leur engagement à vendre ou à utiliser uniquement des œufs de poule élevés sans cage ou de la viande de lapin en parcs ou de poulets issues d'élevages plus respectueux du bien-être animal (Dockès et al. 2007; Le Parisien 2017; CIWF 2017).

Le bien-être animal intéresse aussi le domaine scientifique et de la recherche comme en témoignent le projet Welfare Quality® et le nombre croissant d'études sur le sujet. Pour parler du bien-être animal, les scientifiques utilisent des critères plus objectifs que les éleveurs et les consommateurs ; ils utilisent des critères zootechniques, physiologiques et éthologiques (Lamine 2006).

Comme les autres acteurs, les vétérinaires ont du mal à définir le terme de bien-être animal. Durant le colloque « Vétérinaire, professionnel garant du bien-être animal » organisé par l'Ordre National des Vétérinaires en 2015, les différents intervenants utilisent les cinq libertés du Farm Animal Welfare Committee en soulignant le fait que c'est peut-être plus la définition

de la bien-traitance des animaux qu'il faut prendre en compte, car il est difficile voire impossible de connaître l'état psychique et émotionnel des animaux. Dans ce contexte, ils ont aussi abordé les conditions de vie et d'abattage des animaux de rente ainsi que la prise en charge de la douleur en précisant que « l'absence de souffrance animale est une condition nécessaire mais pas suffisante du bien-être » selon Louis Schweitzer, président de La Fondation Droit Animal, éthique et sciences (Ordre National Vétérinaire 2015).

La société s'intéresse au bien-être animal, même si les motivations de chacun sont différentes. Avec la loi GRAMMONT, la souffrance animale est le point de départ du concept de bien-être animal. Pour favoriser l'absence de douleur, il faut donc connaître et identifier les phénomènes physiologiques qui en sont la cause.

I.2. La douleur, phénomène aux conséquences multiples et difficile à évaluer chez les bovins

I.2.1. Physiologie de la douleur

I.2.1.1. Définition de la douleur

Pour l'espèce humaine, la douleur est définie comme une « *expérience sensorielle et émotionnelle désagréable, associée à une lésion tissulaire réelle ou potentielle, ou décrite dans des termes évoquant une telle lésion.* » (International Association for the Study of Pain 1994) (Fortineau, Guattéo, Holopherne-Doran 2013)

Cette définition n'est pas applicable directement aux autres espèces animales, le concept d'émotion chez les animaux est sujet à controverse et difficilement évaluable. Aussi, il existe plusieurs définitions de la douleur animale ; nous retiendrons celle de Molony en 1997 :

« *La douleur animale est une expérience sensorielle aversive signant l'identification par l'animal d'une atteinte ou d'une menace à l'intégrité de ses tissus. Elle modifie sa physiologie et son comportement afin de réduire ou d'éviter cette atteinte, de réduire la probabilité de répétition d'une telle atteinte et de promouvoir la guérison. La douleur est jugée non fonctionnelle (inutile) lorsque l'intensité et la durée de cette expérience sont inappropriées en regard de l'atteinte subie ou lorsque les réponses physiologiques et comportementales ne parviennent pas à la soulager.* » (Fortineau, Guattéo, Holopherne-Doran 2013)

I.2.1.2. Etapes du flux nerveux : réception, conversion, transmission, modulation et intégration centrale

La perception douloureuse est le résultat de l'intégration par le système nerveux d'informations nociceptives. La nociception est le processus nerveux permettant la conversion et la transmission de stimuli douloureux ou potentiellement douloureux. Ces stimuli nociceptifs sont mécaniques (pression, piqûre), chimiques (certaines molécules inflammatoires comme l'histamine) ou thermiques (chaleur) (Dubin, Patapoutian 2010; Richard 1995). Ces stimuli sont détectés par des récepteurs de la douleur, les nocicepteurs, qui sont des terminaisons dendritiques libres issues de neurones sensitifs (Figure 1). Selon les caractéristiques morphologiques des terminaisons (ou fibres), deux types de nocicepteurs ont été définis (Dubin, Patapoutian 2010; Fortineau, Guattéo, Holopherne-Doran 2013) :

- les mécano-nocicepteurs constitués de fibres A ; les axones myélinisés ont une conduction relativement rapide (5 à 30 m/s), et ils sont activés par des stimuli mécaniques et probablement thermiques. Ils sont responsables de la première réaction de retrait.
- les nocicepteurs polymodaux constitués de fibres C ; les axones amyélinisés ont une conduction relativement lente (0,4 – 1,4 m/s), et ils sont activés par des stimuli mécaniques, chimiques et thermiques.

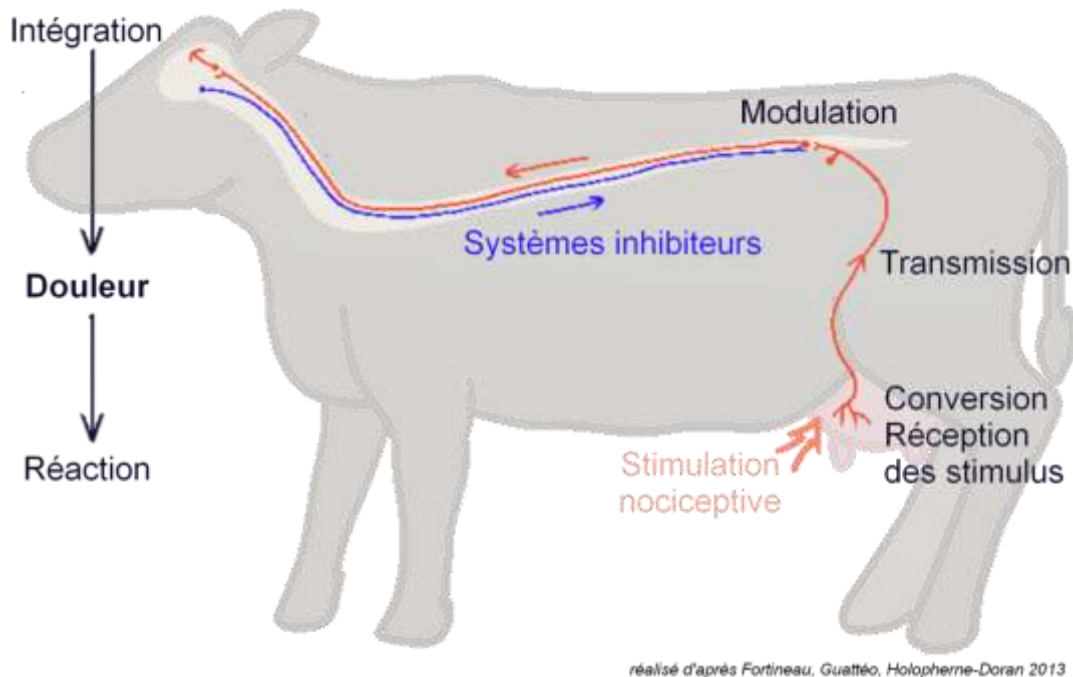


Figure 1 : Schéma simplifié des mécanismes nerveux responsable de la sensation de douleur

Le stimulus est converti en potentiels d'action : l'énergie du stimulus modifie la perméabilité membranaire des nocicepteurs, ce qui provoque une dépolarisation. Cette conversion n'a lieu que si le seuil de sensibilité du nocicepteur est atteint. L'intensité du stimulus influe donc sur la fréquence des potentiels d'action (Richard 1995). Ces potentiels d'action sont alors transmis jusqu'au corps neuronal situé dans le ganglion spinal, puis dans les couches superficielles de la corne dorsale de la moelle épinière (couches I, II et V de Rexed) (Figure 1). L'information est relayée par des neurones médullaires qui sont soit spécifiques (couches I et II), soit convergents (couche V) (Dubin, Patapoutian 2010; Fortineau, Guattéo, Holopherne-Doran 2013).

Ces neurones médullaires ont un rôle de modulation de l'influx nociceptif. Ils peuvent être stimulés par les neuromédiateurs activateurs libérés par le neurone sensitif et/ou inhibés par les fibres inhibitrices descendantes et par des endorphines agissant sur leurs récepteurs morphiniques (Figure 1). De plus, les neurones médullaires reçoivent aussi des influx non nociceptifs, ce qui pourrait empêcher ou diminuer le passage des influx nociceptifs (exemple : massage soulageant une zone douloureuse).

L'influx nociceptif remonte jusqu'à l'encéphale par les voies ascendantes dites sensorielles (faisceau spino-thalamique, puis cortex sensitif) et de l'apprentissage (faisceau spino-réticulothalamique puis les structures limbiques et le cortex frontal) (Figure 1) (Fortineau, Guattéo, Holopherne-Doran 2013).

I.2.1.3. Douleur par excès de nociception : mécanismes et modalités de traitement

La perception de la douleur est nécessaire à la protection des tissus. Les systèmes inhibiteurs sont présents pour moduler cette perception. Cependant dans certains cas, ces systèmes ne suffisent pas. On parle alors de douleur pathologique ce que Molony et Kent appelle, dans leur définition, la douleur « non fonctionnelle ». La plus courante est la douleur par excès de nociception, elle est provoquée par la stimulation prolongée des nocicepteurs, sans atteinte nerveuse, liés aux phénomènes de sensibilisation (Molony, Kent 1997; Fortineau, Guattéo, Holopherne-Doran 2013).

La sensibilisation périphérique est provoquée par certaines molécules libérées lors de l'inflammation, responsables de l'abaissement des seuils d'activation des nocicepteurs. Ces molécules sont libérées par les tissus lésés et/ou les cellules sanguines (bradykinine, prostaglandines, histamine...), ou par les nocicepteurs eux-mêmes (substance P, Calcitonine Gene Related Peptide, neurokinine A) (Dubin, Patapoutian 2010; Fortineau, Guattéo, Holopherne-Doran 2013).

Lors d'une stimulation intense, prolongée ou répétée des nocicepteurs, les neurones sensitifs libèrent des neuromédiateurs en très grandes quantités. En se fixant sur différents récepteurs des neurones médullaires comme les récepteurs NMDA (N-méthyl-D-aspartate), les neuromédiateurs peuvent entraîner une hyperexcitabilité par la modification, plus ou moins transitoire, de la perméabilité ionique. Ce phénomène de sensibilisation centrale est exagéré en présence de prostaglandines.

Ces phénomènes de sensibilisation entraînent une amplification du message nociceptif et donc une sensation de douleur exagérée au sein des tissus lésés (hyperalgésie primaire) pouvant s'étendre aux tissus sains adjacents (hyperalgésie secondaire).

La douleur par excès de nociception est courante après une chirurgie ou un traumatisme. Pour l'éviter, il faut limiter les phénomènes de sensibilisation périphérique et centrale. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens et les antagonistes aux récepteurs NMDA limiteront ces phénomènes. Cependant pour prévenir complètement ces phénomènes et respecter le bien-être animal, le blocage des influx nerveux est quelquefois nécessaire, comme l'utilisation d'anesthésiques locaux, d'analgésiques opioïdes ou $\alpha 2$ -agonistes (Fortineau, Guattéo, Holopherne-Doran 2013).

Hors du contexte chirurgical, il est nécessaire de savoir détecter la douleur pour pouvoir la prendre en charge.

1.2.2. Evaluation de la douleur chez les bovins

1.2.2.1. Signes de douleur chez les bovins

En réponse à la douleur, les animaux ont des comportements pouvant être classés en différents types : les comportements résultant d'un apprentissage, les comportements réflexes visant à protéger l'organisme, les comportements visant à minimiser la douleur voire à faciliter la guérison, et les comportements sociaux visant à demander de l'attention ou à arrêter un autre individu (dont l'Homme) responsable de la douleur. (Molony, Kent 1997)

La douleur modifie le comportement général du bovin qui peut s'isoler du reste du troupeau, se montrer abattu, peu intéressé par son environnement jusqu'au décubitus ou la répugnance à se déplacer, voire l'immobilité ou avoir des comportements compulsifs comme des piétinements incessants, et plus rarement des roulades. Dans tous les cas, la douleur modifie le temps et la distribution des périodes de sommeil et d'activité du bovin. Suivant le niveau de la douleur, un bovin diminue voire stoppe l'ingestion, aboutissant fréquemment à une arumination, une baisse de production voire une perte de poids (Millman 2013; Fortineau, Guattéo, Holopherne-Doran 2013).

Les signes de douleur sont repérables à travers la posture anormale qu'adopte l'animal : modification du polygone de sustentation (jarrets écartés lors d'une mammite, croisement des membres antérieurs lors d'atteintes podales localisées au doigt médian), de la position du dos (cyphose). Un déséquilibre dans le temps entre les stations debout et couché peut être le signe d'une douleur lors du changement de position ou de la manifestation d'inconfort dans l'une ou l'autre des positions (Shearer et al. 2013; Fortineau, Guattéo, Holopherne-Doran 2013).

La manipulation d'une zone douloureuse aboutit à une réaction plus ou moins vive de l'animal (réaction de retrait voire de défense comme un coup de pied). Un bovin manifeste la douleur par un grincement des dents (bruxisme), les oreilles tombantes, l'émission de cris et/ou de plaintes étant plutôt rare dans cette espèce. Les éleveurs rapportent occasionnellement des faciès grimaçants. Actuellement il y a peu de données publiées chez les bovins, car ces manifestations ont été étudiées surtout dans d'autres espèces animales (rat, lapin, chat, cheval) (Millman 2013; Shearer et al. 2013; Fortineau, Guattéo, Holopherne-Doran 2013).

L'observation des signes de douleur permet d'identifier la localisation de la zone douloureuse, comme par exemple une boiterie franche d'un membre, les coudes écartés lors d'une atteinte thoracique ou cranio-abdominale, ou encore les jarrets écartés lors d'une mammite ou la position d'un membre ou le défaut d'appui lors de lésions podales postérieures par exemple. (Fortineau, Guattéo, Holopherne-Doran 2013)

I.2.2.2. Méthodes d'évaluation de la douleur chez les bovins

Pour les bovins, comme pour tous les animaux (dont l'être humain), la douleur est une expérience personnelle, par conséquent elle n'est appréciable ou mesurable que de manière indirecte.

Chez l'homme, des échelles d'auto-évaluation sont utilisées : l'échelle descriptive simple classe le niveau de douleur en catégorie (légère, modérée, sévère), l'échelle d'évaluation numérique (score de 1 à 10), l'échelle visuelle analogique (placement d'un curseur sur une ligne allant de « aucune douleur » à « douleur insupportable » avec mesure du déplacement du curseur). Ces échelles sont adaptables aux animaux par observation des signes décrits précédemment : par exemple des grilles de scores décrivent le comportement des bovins boiteux afin d'évaluer la douleur qu'engendre une affection podale. Ce type d'outils est relativement subjectif, assez fortement dépendant de l'observateur. Pour les améliorer, des images ou des vidéos sont utilisés pour décrire les scores ou les catégories de ces échelles (Millman 2013; Fortineau, Guattéo, Holopherne-Doran 2013). L'observation simultanée de plusieurs animaux, la modification du comportement suivant le cycle circadien, l'atténuation des comportements douloureux par la présence humaine sont des biais pouvant être évités ou diminués par des enregistrements vidéos (Theurer, Amrine, White 2013; Millman 2013; Fortineau, Guattéo, Holopherne-Doran 2013).

L'évaluation objective d'un comportement douloureux passe par la réalisation d'un éthogramme (liste de définitions de comportements mutuellement exclusifs) dont les comportements peuvent être quantifiés soit par leur fréquence, soit par leur durée. On peut aussi quantifier le temps de réaction de l'animal à un stimulus algique (mécanique, thermique...) ou la pression exercée sur une zone précise entraînant un comportement de retrait, avant et après une chirurgie par exemple (algométrie).

La présence humaine atténue les comportements douloureux, déjà frustrés chez les bovins. Grâce aux nouvelles technologies, des outils ont été développés afin d'évaluer le comportement des bovins à distance : les accéléromètres mesurent et enregistrent le temps et la fréquence des changements de position des bovins sur une période donnée, les podomètres mesurent l'activité locomotrice, les systèmes de localisation spatiale enregistrent les déplacements des bovins sur un temps donné et leur localisation dans l'aire de vie des animaux, et les systèmes de transpondeurs ou de transmetteurs peuvent évaluer le comportement alimentaire (fréquence de la prise alimentaire, du temps consacré à la rumination). Avec l'agrandissement des troupeaux et la diminution de la main d'œuvre, la surveillance des animaux est de plus en plus complexe, ces outils, encore expérimentaux pour la plupart, pourraient permettre d'attirer l'attention de l'éleveur sur des animaux à risques (Millman 2013; Fortineau, Guattéo, Holopherne-Doran 2013).

Expérimentalement, des paramètres physiologiques (fréquence cardiaque ou respiratoire, température, rumination), zootechniques (prise alimentaire, gain moyen quotidien, production laitière) et neuro-endocriniens (taux plasmatiques de cortisol, substance P, haptoglobine...) sont utilisés pour étudier la douleur et ses conséquences, ainsi que l'action des antalgiques. Ils sont peu spécifiques, leurs modifications sont liées à la douleur, au stress ou à une maladie.

Toutes ces méthodes permettent de repérer des signes associés à la douleur chez les bovins. La plus grande difficulté dans l'observation du comportement des bovins est le changement de l'environnement qui peut modifier leur comportement, et chaque animal ayant un comportement unique à l'état normal, il est nécessaire de connaître l'animal en amont, pour pouvoir détecter précocement l'apparition de ces signes ou une modification comportementale (Theurer, Amrine, White 2013).

I.3. La mammite, une affection douloureuse aux multiples enjeux

I.3.1. Définition et enjeux

I.3.1.1. Définition

Une mammite est une inflammation du parenchyme mammaire, généralement due à la colonisation et à la multiplication d'un agent bactérien, se traduisant au minimum, par une modification de l'aspect (couleur, présence de grumeaux) et de la composition du lait (augmentation de la concentration des cellules somatiques du lait et modification de la concentration en ions chlore et sodium). Lorsque seules ces modifications sont présentes, la mammite est dite subclinique. Lors d'une atteinte macroscopique d'un ou de plusieurs quartiers (chaleur, rougeur, douleur et tuméfaction du quartier), la mammite est dite clinique. Lorsqu'en plus, des signes généraux sont présents, la mammite est dite clinique, de sévérité moyenne à marquée, avec une évolution qui peut être aiguë voire suraiguë selon les cas. (Rémy et al. 2010) (Radostits et al. 2007)

I.3.1.2. Enjeux à l'échelle de la filière

Etant donnée l'importance de la consommation du lait dans les civilisations occidentales, les mammites peuvent avoir des conséquences sur la santé publique soit directement par le biais des agents étiologiques, potentiels agents de toxi-infection alimentaire collective (TIAC), soit en raison des mesures visant à prévenir la présence des résidus inhibiteurs dans le lait.

En 2014, 6% des 1380 foyers de TIAC en France étaient dus aux produits laitiers, ce qui est globalement une très faible proportion. Et 35,3% des foyers de TIAC dus à des produits laitiers sont liés à *Staphylococcus aureus*, qui est un possible agent étiologique de mammite (Institut de Veille Sanitaire 2014), mais la source de contamination est souvent postérieure à la collecte du lait lui-même. Les principaux agents de TIAC recherchés dans le lait sont *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.* et *Escherichia coli*. Ces agents pathogènes présents dans le lait peuvent être issus d'une glande infectée ou de l'environnement (*Listeria monocytogenes* et *Salmonella spp.*). Dans les deux cas, leur présence dans le lait est généralement lié à un manque d'hygiène de la traite (Rémy et al. 2010).

Les inhibiteurs, dont les antibiotiques utilisés pour guérir ou prévenir les mammites, sont des substances inhibant la croissance bactérienne. Cependant, la contribution de l'utilisation des antibiotiques utilisés dans ce cadre, aux phénomènes de sélection de germes résistants aux antibiotiques, est globalement faible. La résistance de certaines bactéries aux antibiotiques est connue depuis la découverte de ces derniers. Elle était fréquente dans les milieux de soins et hospitaliers. Désormais, ce phénomène a tendance à s'étendre, d'autant plus que la surveillance est plus étroite. En 2015, l'antibiorésistance était responsable de 700 000 décès dans le monde ; en 2050, elle pourrait tuer jusqu'à 10 millions de personnes (Review on Antimicrobial Resistance 2016). Afin de préserver cet arsenal thérapeutique indispensable aux humains et aux animaux, le gouvernement français a mis en place le plan Écoantibio 2017. Il a permis de réduire de 20,1% l'exposition des animaux aux antibiotiques entre 2011 et 2015 (Ministère de l'Agriculture, de l'Agroalimentaire et de la Forêt 2016).

Les mammites impliquent des enjeux de santé publique et animale, et comme toutes maladies, porte préjudice au bien-être des animaux (Ministère de l'Agriculture, de l'Agroalimentaire et de la Forêt 2016).

I.3.1.3. Enjeux à l'échelle de l'élevage

Dans les troupeaux laitiers occidentaux, les mammites sont considérées comme la maladie la plus fréquente (40 mammites cliniques pour 100 vaches présentes par an, en France) et la plus coûteuse (33% du coût total des maladies des vaches laitières) (Seegers, Fourichon, Beaudeau 2003; Fourichon, Seegers, Beaudeau, et al. 2001; Fourichon, Beaudeau, et al. 2001). La présence de mammites dans un élevage influence la quantité et la qualité de la production de lait, l'organisation du travail, la structure du troupeau et surtout, elle a un coût majeur, à cause des pertes de revenus et des coûts liés au contrôle et à la prévention des mammites (individuel et collectif, préventif et thérapeutique).

Lors d'une mammite clinique apparaissant dans le deuxième mois de lactation, en moyenne, le volume de lait perdu est de 375 kg sur la lactation en cours, soit environ 5% de sa production annuelle. La diminution étant très variable, on considère que 4 cas sur 10 auront une perte négligeable, 5 une perte moyenne et 1 une perte très grande (environ 1000 kg de lait). Lors de mammite subclinique, c'est-à-dire lorsque la concentration des cellules somatiques (CCS) individuelle est supérieure à 50-100 000 cellules/mL, la production de lait

diminue de 0,5 kg de lait à chaque doublement du CCS (légèrement variable selon le nombre et le stade de lactation) (Seegers, Fourichon, Beaudeau 2003).

Cette diminution de la production de lait est une perte de revenu majeure. Il faut y ajouter le lait écarté de la collecte à cause des résidus antibiotiques et/ou d'une CCS élevée, les pénalités en cas de dépassement des valeurs seuils étant très élevées (Seegers, Fourichon, Beaudeau 2003; Halasa et al. 2007). La perte de revenu liée à la modification des taux butyriques et protéiques est négligeable par rapport à la perte de production de lait, sauf dans certains cas particuliers de rémunération du lait (utilisation pour la transformation fromagère) (Seegers, Fourichon, Beaudeau 2003).

Pour limiter les pertes de revenu et contrôler les mammites au sens large, l'éleveur peut réformer précocement les animaux atteints. Suivant l'intensité de la diminution de production de lait et du potentiel laitier de l'animal, le risque de réforme augmente de 1,5 à 5 fois. La létalité des mammites est globalement faible (0,2% de la mortalité annuelle est imputable aux mammites), mais peut-être plus conséquente si les agents causaux sont des bactéries à Gram négatif, en particulier *Escherichia coli*. Pour compenser la perte de ces animaux, l'éleveur augmente le renouvellement et/ou achète des animaux, pour maintenir le volume de production au cours des campagnes laitières futures. (Seegers, Fourichon, Beaudeau 2003)

En plus des réformes précoces, le contrôle des mammites génère des coûts supplémentaires liés au diagnostic, au traitement et à la prévention des mammites. Le contrôle implique des frais sous la forme des interventions vétérinaires, de la fourniture de médicaments curatifs ou préventifs, d'une organisation spécifique du travail (gestion du tarissement, mesures d'hygiène à la traite) et d'une augmentation du temps de travail (4h supplémentaires par cas jusqu'à la guérison) (Seegers, Fourichon, Beaudeau 2003; Fourichon, Beaudeau, et al. 2001; France Conseil Elevage, Institut de l'Elevage 2013).

L'impact économique des mammites varie selon le système et la conduite de l'élevage laitier ; le prix du lait et les différences de modulation de ce prix ; le contexte de la région et/ou du pays et la méthode d'estimation de cet impact (Seegers, Fourichon, Beaudeau 2003; Halasa et al. 2007). En 2001, une étude réalisée dans l'Ouest de la France indique que le coût moyen des mammites s'élève à 78€ par an et par vache présente : les pertes moyennes sont de 52€ et les coûts de contrôles de 26€. Cependant ces valeurs prennent en compte l'existence des

quotas laitiers ce qui n'est plus le cas actuellement (Fourichon, Seegers, Beaudeau, et al. 2001; Fourichon, Seegers, Bareille, et al. 2001). En 2013, l'institut de l'élevage et France Conseil Elevage indique qu'une mammite clinique coûte actuellement 230€ par vache et par an (France Conseil Elevage, Institut de l'Elevage 2013).

I.3.2. Physiopathologie de la mammite

I.3.2.1. Etiologie

Les mammites sont principalement dues à des bactéries, que l'on classe suivant leurs réservoirs et sources (Rémy et al. 2010; Poutrel 2015) :

- Germes à réservoir « de traite » : les staphylocoques à coagulase positive (*Staphylococcus aureus* principalement), les staphylocoques à coagulase négative (SCN), certains streptocoques (*Streptococcus dysgalactiae* et *agalactiae*), les mycoplasmes et *Corynebacterium bovis*. Les mamelles des vaches infectées constituent leur réservoir ; ils se transmettent par vectorisation mécanique, principalement le matériel de traite ou parfois les mains du trayeur. Ils survivent difficilement dans l'environnement. Les mycoplasmes et *Corynebacterium bovis* sont rares et *S. agalactiae* n'est plus présent en France.
- Germes à réservoir d'environnement : les coliformes dont *Escherichia coli* et *Klebsiella sp.* De manière plus anecdotique, on retrouve *Serratia sp.*, *Enterococcus sp.*, *Trueperella pyogenes*, *Pseudomonas sp.*, *Nocardia sp.*, *Listeria monocytogenes* et *Salmonella sp.*. Le réservoir de ces agents est l'environnement, en particulier la litière. Ils se transmettent généralement entre les traites, mais à l'occasion d'un défaut de nettoyage des trayons, ils se transmettent comme les germes à réservoir dits « de traite ».
- Germes à réservoir mixte : *Streptococcus uberis* que l'on retrouve dans la litière ou le pâturage et sur l'animal (peau, trayon, pelage, sphère oro-nasale et intestins).

En Rhône-Alpes, entre janvier 2007 et mars 2008, 22,1 % des mammites cliniques et sub-cliniques étaient dues à *Streptococcus uberis* contre 16% pour *Escherichia coli* et 15,8% pour les staphylocoques à coagulase positifs (Botrel et al. 2010).

Lors d'une mammite, l'expression clinique est variable en fonction du germe. En France, les germes responsables des mammites cliniques aiguës se trouvent dans l'environnement : *Escherichia coli* est responsable de 47 à 65% des mammites cliniques aiguës et *Streptococcus uberis* de 11 à 26%. Les mammites cliniques de sévérité légère (signes locaux seulement) sont provoquées aux deux-tiers par des germes Gram positifs, dont une majorité par *Streptococcus uberis* (18 à 37% selon les études). *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* sont retrouvés dans environ 20% des cas. Lors de mammites sub-cliniques (CCS > 300 000 cellules/mL), les bactéries Gram positives sont encore majoritaires (65 à 97%) par le biais des Staphylocoques (16 à 41% pour les coagulase positives et 9 à 41% pour les coagulase négatives), ensuite *Streptococcus uberis* et *Escherichia coli* sont respectivement responsable de 12 à 31% et de 0 à 15% des mammites subcliniques. La prévalence de *Streptococcus dysgalactiae* oscille entre 1 et 10% suivant la sévérité des mammites (Poutrel 2015).

Les agents étiologiques des mammites sont nombreux mais on retrouve principalement un germe de réservoir d'environnement *Escherichia coli*, un germe de réservoir mixte *Streptococcus uberis* et un germe de réservoir « de traite » *Staphylococcus aureus*.

I.3.2.2. Modalités de contamination et immunité

L'infection est très majoritairement ascendante, les mammites sont liées au passage de bactéries à travers le canal du trayon et par l'infection ascendante dans un ou plusieurs quartier(s). La mamelle est divisée en 4 quartiers indépendants, suspendue par des ligaments (Figure 2).

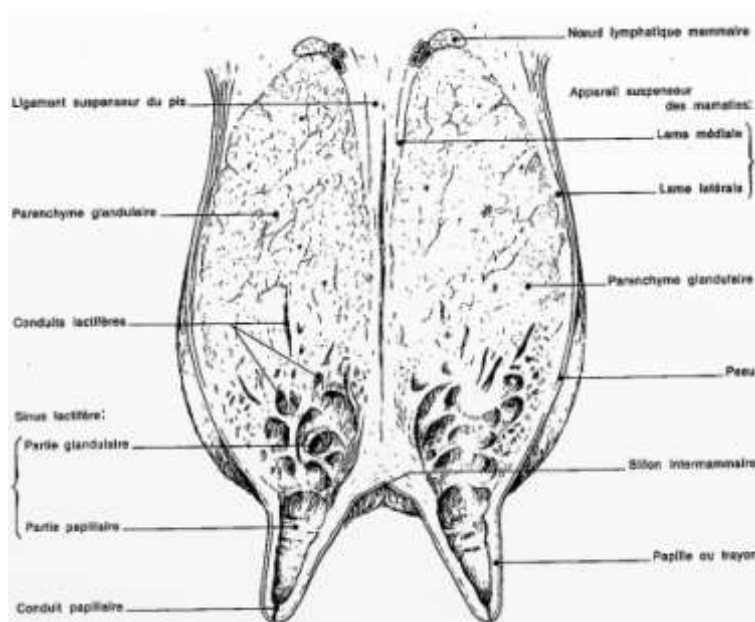


Figure 2 : Coupe transversale des quartiers caudaux d'une mamelle de vache, extrait de Barone (1990)

Les défenses basses de la mamelle limitent l'entrée et/ou la colonisation de la citerne (partie glandulaire du sinus lactifère) par des bactéries à travers le conduit papillaire (Figure 2). La pellicule hydro-lipidique de la peau glabre des

trayons limite l'adhésion des bactéries. Lors de la traite, un épiderme bien hydraté limite les lésions, colonisables par des germes pathogènes.

Le sphincter du conduit papillaire maintient le trayon fermé entre les traites, l'épithélium du conduit étant recouvert de kératine contenant des substances bactériostatiques pour limiter les possibilités de colonisation par les germes qui dépassent cette barrière physique. Durant la période sèche, il s'étanchéfie avec un bouchon de kératine. Cependant chez certaines vaches, le canal n'est pas étanche en raison d'une lésion de son sphincter ou de la perte continue de lait qui empêche sa fermeture, ce qui les rend plus sensibles aux mammites.

Une fois le conduit papillaire franchit, les bactéries gagnent la région en regard de la rosette de Fürstenberg, qui est couverte d'un épithélium bistratifié, sous lequel des leucocytes se trouvent en grande quantité au sein d'une structure lymphoïde organisée. Ensuite, les différents types d'infections ne vont pas avoir la même évolution : *Escherichia coli* a un fort pouvoir de multiplication dans la sécrétion; *Staphylococcus aureus* colonise plus largement la mamelle, est internalisé plus fréquemment dans les cellules et/ou s'enkyste dans le tissu mammaire sous la forme d'abcès. *Streptococcus uberis* a la capacité de se fixer à l'épithélium mammaire.

Si les bactéries dépassent ces défenses basses de la mamelle, elles se retrouvent en contact avec les épithéliums du sinus et des conduits lactifères, les défenses dites hautes de la mamelle prennent alors le relais. Ces épithéliums forment une barrière vers le parenchyme ; plus récemment, des travaux suggèrent que les cellules épithéliales peuvent donner le premier signal de l'infection. À partir d'un certain seuil de concentration bactérienne, le système immunitaire inné par le biais des Pattern Recognition Receptors (PRR) des épithéliums mammaires détectent les Microbe-Associated Molecular Patterns (MAMP) issues des bactéries. Les lymphocytes T sous l'épithélium de la rosette de Fürstenberg et les macrophages au sens large dans l'épithélium des citernes et des canaux, pourraient participer à cette détection, mais le mécanisme n'est pas bien connu. Cette détection déclenche deux types de réactions : les réactions d'auto-défense inhérentes aux cellules de la mamelle et les réactions pro-inflammatoires. Ces réactions sont modulables suivant le type de MAMPs présents dans la mamelle, et la proportion de PRRs détectant ces MAMPs (Rainard 2015; Rémy et al. 2010).

Les cellules de l'épithélium mammaire possèdent des jonctions serrées entre elles qui renforce l'effet barrière. Elles adaptent leur métabolisme en partie pour lutter contre le stress oxydatif (production de peroxydase), produisent des peptides et des protéines antibactériens (Nitric Oxyde synthase par exemple), et des protéines de la phase aiguë comme la Serum Amyloïde A et des glycoprotéines protectrices comme la mucine 1.

Les réactions pro-inflammatoires impliquent la sécrétion de cytokines comme le TNF α (Tumor Necrosis Factor α), l'IL-1 β (Interleukine 1 β) et l'IL-17A (Interleukine 17A). En réaction, les cellules de l'épithélium mammaire diminuent le seuil de détection des agents pathogènes par l'activation des PRR reconnaissant les MAMPs et/ou les DAMPs (Damage Associated Molecular Patterns : molécules endogènes libérés par les atteintes cellulaires et/ou tissulaires). Ces cytokines facilitent aussi la diapédèse de nombreux types de leucocytes (neutrophiles, lymphocytes, monocytes, cellules dendritiques et natural killers) attirés par les chimiokines, elles-mêmes sécrétées par les cellules de l'épithélium mammaire (Rainard 2015; Foucras 2014; Mavangira, Sordillo 2017).

Ainsi les bactéries vont se retrouver en contact avec les leucocytes dans la lumière de la glande mammaire. Les neutrophiles, acteurs principaux de l'immunité innée, activés par les bactéries ou les cytokines présentes, éliminent les bactéries soit par phagocytose, soit par dégranulation (excrétion de substances toxiques pour les agents infectieux). A priori, les lymphocytes T modulent l'immunité adaptative et stimulent ou non une réaction humorale et/ou cellulaire (Foucras 2014; Rainard 2015; Thompson-Crispi et al. 2014).

La méconnaissance des mécanismes de guérison bactériologique est peut-être liée à la diversité des agents bactériens, les réponses immunitaires adaptatives étant probablement différentes. Cependant, le recrutement et l'activation précoce des neutrophiles semblent indispensables à la guérison. De plus l'action des anticorps paraît peu efficace ou du moins une réaction anticorps n'est pas suffisante à l'élimination de l'infection. Dans le cas des bactéries extracellulaires comme *Escherichia coli*, une forte concentration en IL-17 et la sous-population de lymphocytes Th17 participeraient à une réponse associée à la guérison (Rainard 2015; Thompson-Crispi et al. 2014; Herry et al. 2017).

Si les bactéries sont éliminées, les sécrétions pro-inflammatoires diminuent. Les monocytes, qui donnent naissance aux macrophages tissulaires, éliminent les cellules mortes et la

cicatrisation débute. Si le système immunitaire n'arrive pas à juguler l'infection, les bactéries, comme *Escherichia coli* par exemple, peuvent passer dans le sang et être à l'origine d'une septicémie ou se localiser dans d'autres foyers d'infection. Si l'infection ne peut pas être jugulée, les neutrophiles sont remplacés par des lymphocytes T et des macrophages, et la mammite peut devenir chronique avec alternativement des épisodes cliniques et subcliniques (Rémy et al. 2010; Foucras 2014).

I.3.2.3. Réponse inflammatoire et douleur

Suite à la détection des agents bactériens et à la destruction tissulaire, en plus de la libération de cytokines et de chimiokines, d'autres médiateurs de l'inflammation sont libérés pour permettre au plasma et aux leucocytes d'accéder au site de l'inflammation (Foucras 2014).

Lors de lésions tissulaires, les phospholipides des membranes vont produire des médiateurs lipidiques de l'inflammation : les phospholipides sont transformés en acide arachidonique par la phospholipase A2. Ensuite l'acide arachidonique est métabolisé soit par les lipoxigénases (LOX) en leucotriènes, soit par les cyclo-oxygénases 1 et 2 (COX 1 et COX 2). Contrairement à COX 1, peu inductible et synthétisant des prostaglandines en petite quantité ; COX 2, fortement induite par les cytokines forme des médiateurs pro-inflammatoires comme la prostaglandine E2, la prostaglandine F2 α (PGE2 et PGF2 α) et des thromboxanes (Figure 3 ci-dessous) (Foucras 2014; Kidd, Urban 2001).

Les lésions tissulaires impliquent l'activation d'une protéase plasmatique, la bradykinine. Comme les prostaglandines, les thromboxanes, certaines molécules libérées par les mastocytes (histamine et sérotonine), la bradykinine participe à la modification du débit sanguin, généralement par vasodilatation. En synergie avec l'action des leucotriènes et de l'histamine qui augmentent la perméabilité vasculaire, cela aboutit à la formation d'un œdème. Cet œdème a pour effet de distendre la peau et donc de stimuler les nocicepteurs. En plus, des stimuli thermique et chimique provoqués par l'inflammation, les nocicepteurs reçoivent un stimuli mécanique lié à l'œdème, aboutissant au phénomène douloureux. Ces neurones sensitifs afférents sont d'autant plus stimulés que des prostaglandines dont la PGE2, la bradykinine, la sérotonine et certaines cytokines (a priori TNF α , IL-1 et IL-6) abaissent le seuil de dépolarisation de ces neurones, la sensibilisation périphérique se mettant en place (Figure 3 ci-dessous). En conséquence, au niveau de la zone inflammée, ces neurones

hyperstimulés vont libérés des neuromédiateurs comme la substance P et la calcium gene-related peptide (CGRP). Ils vont participer à la mise en place et/ou au maintien de l'œdème : la CGRP provoque la vasodilatation des artérioles, la substance P au contraire provoque la vaso-constriction des veinules post-capillaires, l'ensemble contribuant à l'apparition ou l'accroissement de l'œdème (Kidd, Urban 2001; Foucras 2014; Dubin, Patapoutian 2010).

La sensibilisation périphérique, l'intensité et la fréquence des stimuli exacerbent la quantité de neuromédiateurs (glutamate et substance P) libérés par les synapses des neurones périphériques dans la moelle épinière, impliquant l'expression des récepteurs N-méthyl-D-aspartate (NMDA) des neurones médullaires. Le glutamate libéré dans la synapse se fixe sur les récepteurs α -amino-3-hydroxy-5-méthylisoxazole (AMPA) comme lors de stimuli nociceptifs sans lésion tissulaire, mais aussi sur les récepteurs NMDA des neurones médullaires. La fixation du glutamate sur les récepteurs NMDA provoque une hyperexcitation des neurones médullaires qui vont se dépolariser plus facilement, c'est la sensibilisation centrale. La substance P exacerbe ce phénomène en se fixant aux neurones médullaires, elle génère une meilleure réponse post-synaptique et empêche les récepteurs NMDA de se désactiver. D'autres molécules, comme la PGE2 et la sérotonine, diminue le seuil de dépolarisation des neurones (Figure 3) (Kidd, Urban 2001; Foucras 2014; Dubin, Patapoutian 2010).

La sensibilisation périphérique et centrale aboutissent à des phénomènes d'hyperalgésie (réaction exagérée à un stimulus nociceptif) et à de l'allodynie (réaction à stimulus non nociceptif). La plasticité neuronale peut permettre à ces phénomènes de perdurer sur le long terme, même quand l'inflammation a disparu (Kidd, Urban 2001).

Par des mécanismes biologiques différents, l'utilisation d'anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) ou d'anti-inflammatoire stéroïdiens (glucocorticoïdes ou corticoïdes) modère l'inflammation par diminution de l'œdème, de la douleur. L'utilisation de glucocorticoïdes aboutit à une forte concentration en annexine A1, inhibitrice de la phospholipase A2 (Figure 3 ci-dessous). Elle bloque aussi l'expression de gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires et déclencherait l'apoptose de certains leucocytes, limitant ainsi le cycle d'auto-entretien de l'inflammation. Les glucocorticoïdes à fortes doses ont des effets immunomodulateurs. Les AINS inhibent les COX, et, ainsi bloquent la formation de prostaglandines et de thromboxanes (Figure 3 ci-dessous). En plus de diminuer l'œdème et la

douleur, les AINS diminuent la fièvre et les phénomènes de sensibilisation. Suivant les molécules, l'affinité pour COX 1 ou COX 2 est variable, et chez les monogastriques, l'inhibition de COX 1 peut-être responsable de l'apparition d'ulcères gastro-intestinaux. Ce phénomène étant peu rapporté chez les ruminants, les conséquences de ces affinités sont moins bien étudiées. L'apparition d'ulcères gastro-intestinaux chez les monogastriques existent aussi lors de l'administration de glucocorticoïdes. Ces deux familles de molécules modifient les échanges hydro-ioniques aux niveaux gastro-intestinal (ulcères gastro-intestinaux) et rénal (modification de la kaliémie) (Foucras 2014; Ferran, Bousquet-Melou 2014).

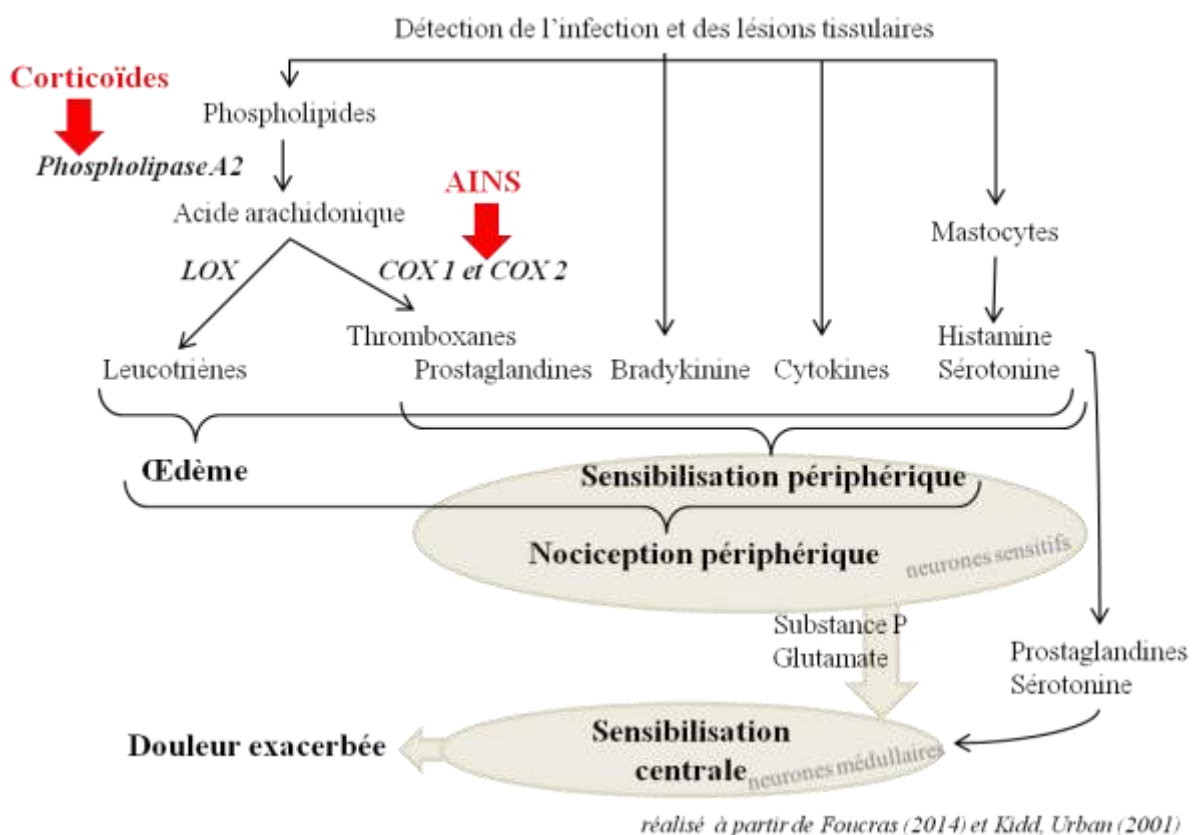


Figure 3 : Schéma simplifié du lieu d'action des AINS et des corticoïdes dans le processus de douleur inflammatoire

Les opiacées diminuent fortement les influx nociceptifs et certains limite la sensibilisation centrale et périphérique. Néanmoins, chez les ruminants, seules quelques molécules sont utilisables du point de vue légal: butorphanol, lévométhadone, lidocaïne, xylazine, détomidine et la kétamine. Elles sont généralement utilisés dans le cadre d'interventions chirurgicales, dans le cadre d'une analgésie multimodale (Fortineau, Guattéo, Holopherne-Doran 2013).

1.3.3. Conséquences d'une mammite chez la vache

1.3.3.1. Impact de la mammite stricto sensu

Comme décrit précédemment, la sévérité des mammites est variable. Nous détaillerons les signes cliniques dans un ordre de sévérité croissant. Les phénomènes inflammatoires et immunitaires ayant un fort besoin énergétique, ils diminuent la production laitière et modifient l'aspect et la composition du lait. L'organisme modifie les priorités de distribution de l'énergie et favorise les voies cataboliques. De plus, le recrutement des leucocytes, la destruction des cellules épithéliales alvéolaires diminue encore la capacité d'excrétion de l'épithélium alvéolaire et augmente le nombre de cellules somatiques du lait (neutrophiles, macrophages, cellules épithéliales, ...). L'inflammation est aussi responsable des signes locaux, avec une mamelle gonflée, rouge, chaude et douloureuse (Rémy et al. 2010; Seegers, Fourichon, Beaudou 2003; Ballou 2015).

De plus, l'infection implique des dommages tissulaires plus ou moins réversibles. La lumière des conduits lactifères est obstruée par de la fibrine, des leucocytes et des bactéries. La lumière alvéolaire se distend à cause de la stase du lait puis diminue à cause de l'œdème aboutissant à l'involution, voire à la nécrose des cellules mammaires. Si l'évolution continue, le stroma inter-alvéolaire finit par s'épaissir et est infiltré par des leucocytes, les cellules mammaires se multiplient et obstruent complètement les petits conduits et les grands s'épaississent et se kératinisent à la phase chronique de l'inflammation en raison de la fibrose cicatricielle. Dans le cas des mammites causées par les staphylocoques, plus résistants à la phagocytose par les neutrophiles, ce mécanisme est d'autant plus marqué et conduit à la séquestration des staphylocoques dans le tissu mammaire. Ensuite la production peut redevenir normale mais le mécanisme est mal connu, soit les alvéoles endommagées récupèrent leur capacité de sécrétion, soit le tissu sain s'hypertrophie, soit les deux phénomènes co-existent (Akers, Nickerson 2011).

Dans certains cas (10% des mammites due à *Escherichia coli* environ), la capacité d'ingestion diminue, accroissant le déficit énergétique pour la production. De plus, ces bactéries peuvent provoquer une hyperthermie transitoire. Dans un cadre expérimental, elle apparaît dans les 24h après l'inoculation. La chute de production, l'hyperthermie, l'anorexie ainsi que la diarrhée et la déshydratation sont en partie due à la libération d'endotoxine lors de la

destruction des bactéries Gram négatives (comme *Escherichia coli*) par les leucocytes (Ballou 2015; Hogan, Larry Smith 2003; Herry et al. 2017).

Certains signes cliniques locaux sont plus ou moins spécifiques de l'agent étiologique. En cas de gangrène du quartier infecté, l'agent est généralement une souche gangréneuse de *Staphylococcus aureus*, alors que lorsque le lait se transforme en pus plus ou moins solide sur des vaches tarées ou des génisses l'agent mis en cause est généralement *Trueperella pyogenes*. Ces agents comme d'autres (*Escherichia coli*) peuvent passer dans le sang et provoquer l'apparition de nouveaux foyers infectieux (endocardite, arthrite...) et/ou provoquer un choc septicémique aboutissant au décubitus puis à la mort de l'animal (Hogan, Larry Smith 2003; Rémy et al. 2010).

Cependant même si la mammite n'aboutit pas à la mort de l'animal, la guérison bactériologique est indispensable à la récupération fonctionnelle de l'animal. Elle dépend principalement de l'agent étiologique, de l'ancienneté de l'infection, de la précocité du traitement et des conditions épidémiologiques de l'infection (Rémy et al. 2010)

I.3.3.2. Impact de la douleur

La douleur est un stress, auquel l'organisme répond pour s'y soustraire ou combattre ce stress. Il facilite l'oxygénation et maximise l'apport en énergie des organes répondant à l'agression et inhibe les organes et les systèmes considérés comme inutiles. La douleur active le système nerveux orthosympathique qui libère une grande quantité de catécholamines (adrénaline, noradrénaline) et l'axe hypothalamo-hypophysaire qui déclenche la sécrétion de glucocorticoïdes (cortisol) par la corticosurrénale. L'activation de ses systèmes est adaptée lors de douleur aiguë, mais elle peut être très délétère si la situation se prolonge (Moberg 2000; Fortineau, Guattéo, Holopherne-Doran 2013; Molony, Kent 1997).

La stimulation orthosympathique augmente la pression artérielle, le débit cardiaque et la quantité de globules rouges circulants tout en redirigeant le sang vers les organes de défense (muscles striés, cerveau...), au détriment des autres organes (peau, viscères). De plus, elle augmente la fréquence respiratoire et dilate les bronches afin d'améliorer l'apport d'oxygène et l'élimination du CO₂. Cependant à plus long terme, le cœur se fatigue provoquant des troubles cardiaques de mineurs à graves. La sphère respiratoire s'emballé, aboutissant à une

acidose respiratoire (à cause du CO₂ en excès) et à un manque d'oxygène (hypoxémie), l'ensemble augmentant les risques d'atélectasie et de pneumonie par fausse déglutition, en particulier si l'animal est en décubitus (Moberg 2000; Fortineau, Guattéo, Holopherne-Doran 2013).

Les catécholamines et les glucocorticoïdes agissent sur le métabolisme en augmentant la glycogénolyse musculaire et hépatique, la néoglucogenèse dans le foie et la lipolyse dans les tissus adipeux. Afin d'optimiser les organes de défense, ces molécules renforcent la consommation de glucose du cerveau en diminuant celle de la peau et des viscères. Elles inhibent le système immunitaire et la sécrétion d'ACTH (adréno-cortico trophic hormone). De plus, en relâchant certains muscles lisses, elles réduisent la motricité intestinale et la miction. La prolongation de ces phénomènes induit une consommation accrue d'oxygène, dégradant un peu plus le taux d'oxygène, une perte de muscles et de graisses ainsi que des retards de cicatrisation. Elle diminue l'appétit, la prise alimentaire et la rumination, et augmente les risques d'iléus, de coliques, et les ulcérations gastriques chez les veaux. Enfin la diminution de la miction provoque des désordres hydro-électrolytiques ainsi qu'un comportement agité et de l'inconfort (Moberg 2000; Fortineau, Guattéo, Holopherne-Doran 2013; Molony, Kent 1997).

Dans le but d'augmenter la perception de l'environnement de l'animal, les pupilles sont maintenues en mydriase améliorant la vision et le système nerveux central est sollicité pour augmenter la vigilance diminuant les moments de repos de l'animal.

En plus des catécholamines qui stimulent leur synthèse et inhibent leur catabolisme, les conséquences de la douleur pathologique s'auto-entretiennent car elles augmentent le stress de l'animal (Fortineau, Guattéo, Holopherne-Doran 2013).

I.3.3.3. Evaluation comportementale de la douleur provoquée par une mammite chez les bovins

Une recherche bibliographique dans les bases de données Pubmed et Scindirect, en utilisant les mots clefs « pain » et/ou « behaviour », « mastitis » et « cattle », dénombre 15 publications datant de 1998 et de 2011 à 2017, ayant pour but d'évaluer les comportements douloureux lors de mammites. (Annexes C).

Dans 5 de ces publications, les mammites sont apparues spontanément, les autres décrivent des situations où les mammites ont été induites expérimentalement, dont 4/10 par inoculation d'*Escherichia coli*, 5/10 par injection citernale de lipopolysaccharide (LPS) d'*Escherichia coli*, et 1 par inoculation de *Streptococcus uberis*. Afin d'évaluer les comportements douloureux, ces études comparent les observations recueillies chez des bovins malades avec leur propres données avant ou après la mammite, et/ou par comparaison avec des animaux témoins sains ou infectés et ayant reçu un traitement à base d'anti-inflammatoires. Les différences sont généralement considérées comme significatives avec une valeur de p inférieure à 5%.

Dans ces publications, les comportements majoritairement étudiés sont ceux reliés à l'activité des animaux dont leurs comportements de couchage et d'ingestion. Les meilleurs critères d'évaluation de la douleur lors d'une mammite sont la fréquence quotidienne de pas et le temps de couchage par jour, car leurs variations sont significatives dans toutes les publications récentes qui étudient ces critères (5 publications pour chacun des critères) (Fogsgaard et al. 2012; Kester, Sorter, Hogan 2015; Fogsgaard, Bennedsgaard, Herskin 2015; Medrano-Galarza et al. 2012; Cycles et al. 2012; Siivonen et al. 2011). La fréquence du changement de station debout/couché est intéressant lors de mammites par inoculation de bactéries alors qu'elles ne semblent pas influencer le côté du décubitus. Le temps quotidien d'inactivité semble aussi un bon critère, avec deux publications montrant des différences significatives (Fogsgaard et al. 2012; Kester, Sorter, Hogan 2015)

Contrairement à la prise de boisson, les mammites influencent la prise alimentaire, en particulier le temps consacré à l'ingestion et la quantité ingérée (variations significatives dans respectivement, 5 sur 7 et 4 sur 5 publications). Deux analyses indiquent aussi une modification de la vitesse d'ingestion (Fogsgaard, Bennedsgaard, Herskin 2015; Sepúlveda-Varas et al. 2016). Le temps de rumination peut aussi être perturbé sauf pour les mammites induites avec du LPS, il semble nécessaire de l'étudier par périodes de 24h.

Dans quelques publications, le temps consacré aux séquences de décubitus, d'alimentation et de rumination a été évalué, mais il ne semble pas être modifié (Cycles et al. 2012; Siivonen et al. 2011).

L'évaluation de la sensibilité de la mamelle par application d'un stimulus nociceptif standardisé montre des variations significatives dans deux publications (Rasmussen et al. 2011; Fitzpatrick 2011). Le travail de Peters, Silveira et Fischer (2015) étudie l'hyperalgésie

potentiellement présente lors de mammites spontanées, en appliquant une stimulation thermique sur la couronne dorsale des onglons postérieurs. Les différences ne sont pas significatives. Les études de Fogsgaard, Bennedsgaard, Herskin (2015) et Medrano-Galarza et al. (2012) montrent des différences significatives du nombre des pas et des coups de pieds pendant la traite, même si les systèmes de traite sont différents (respectivement robot et salle de traite).

Les comportements sociaux lors de mammites sont étudiés dans une seule étude : elle montre des différences significatives dans la fréquence des vols de place à l'auge liés à la compétition des vaches entre elles (Sepúlveda-Varas et al. 2016). L'étude des postures et des attitudes des bovins est réalisée dans plusieurs publications. Cependant les critères évalués et/ou les méthodes d'analyse sont différents. Les comportements montrant des différences significatives dans au moins une publication sont l'auto-toilettage, l'orientation de la tête vers la mamelle, l'attention envers l'environnement (dont la position de la tête) et la position de la queue.

En plus des données comportementales, toutes ces publications évaluent des critères physiologiques et cliniques pour au minimum diagnostiquer la mammite ou suivre son évolution. Les critères revenant le plus souvent, par ordre décroissant, sont l'état clinique de la mamelle, la CCS, la température corporelle, la bactériologie et la production de lait.

II. Etude expérimentale

II.1. Objectifs de l'étude :

Les mammites ont un impact majeur sur l'économie de la filière et des élevages laitiers, le bien-être animal, qui est devenu un enjeu sociétal, et la santé publique par la qualité sanitaire du lait et l'antibiorésistance. Afin d'optimiser le traitement et une guérison la plus rapide possible, une meilleure connaissance de l'évolution des mammites est nécessaire.

Notre étude a pour objectif de mieux caractériser les phases d'une mammite à *Escherichia coli* à partir d'un ensemble de données collectées au cours d'un essai vaccinal où des mammites ont provoquées par inoculation mammaire de cette bactérie chez des vaches en début de lactation . En premier lieu, nous déterminerons les différentes phases d'évolution de la mammite par rapport à l'état clinique, biologique et comportemental des vaches. Puis, nous décrirons les facteurs discriminants ces différentes phases par rapport à l'état initial ainsi que la variabilité des facteurs au sein du groupe de vaches étudiées en fonction du temps et de leur statut immunitaire.

II.2. Analyse multiparamétrique des effets d'une mammite à *Escherichia coli*

II.2.1. Matériels et Méthodes

II.2.1.1. Description générale de l'expérimentation

II.2.1.1.1. Animaux

Dix-huit vaches primipares de race Prim'holstein ont reçu des injections suivant trois schémas d'immunisation différents. Puis, 140 jours environ après la première injection, soit en moyenne au 49^{ème} jour de la lactation, elles ont reçu une inoculation de bactéries de la souche P4 d'*Escherichia coli* (*E. coli*) dans un des quartiers mammaires. Ces vaches se trouvaient dans une stabulation libre de la plateforme d'infectiologie expérimentale (PFIE) de l'INRA de Tours-Nouzilly, avec une surface totale de 20 m² par vache, dont 15 m² en aire paillée environ. La ration était distribuée une fois par jour, avec une ration mélangée complète, régulièrement repoussé dans la journée. L'eau potable était disponible à volonté. La traite a eu lieu deux fois par jour à 8h et à 16h, dans une salle de traite adjacente à la stabulation, avec un dispositif en épi. Les détails du protocole de l'expérimentation ont été donnés dans Herry et al. (2017).

II.2.1.1.2. Chronologie

Les périodes d'acquisition des données ont été définies en heures par rapport au moment de l'inoculation (T = 0). L'acquisition des données a été réalisée à intervalles réguliers, débutant 42 heures avant l'inoculation pour les observations comportementales, 24h avant pour les données cliniques et au moment de l'inoculation, pour les prélèvements de sang et de lait. La dernière acquisition a été réalisée 80 heures après l'inoculation (Figure 4)

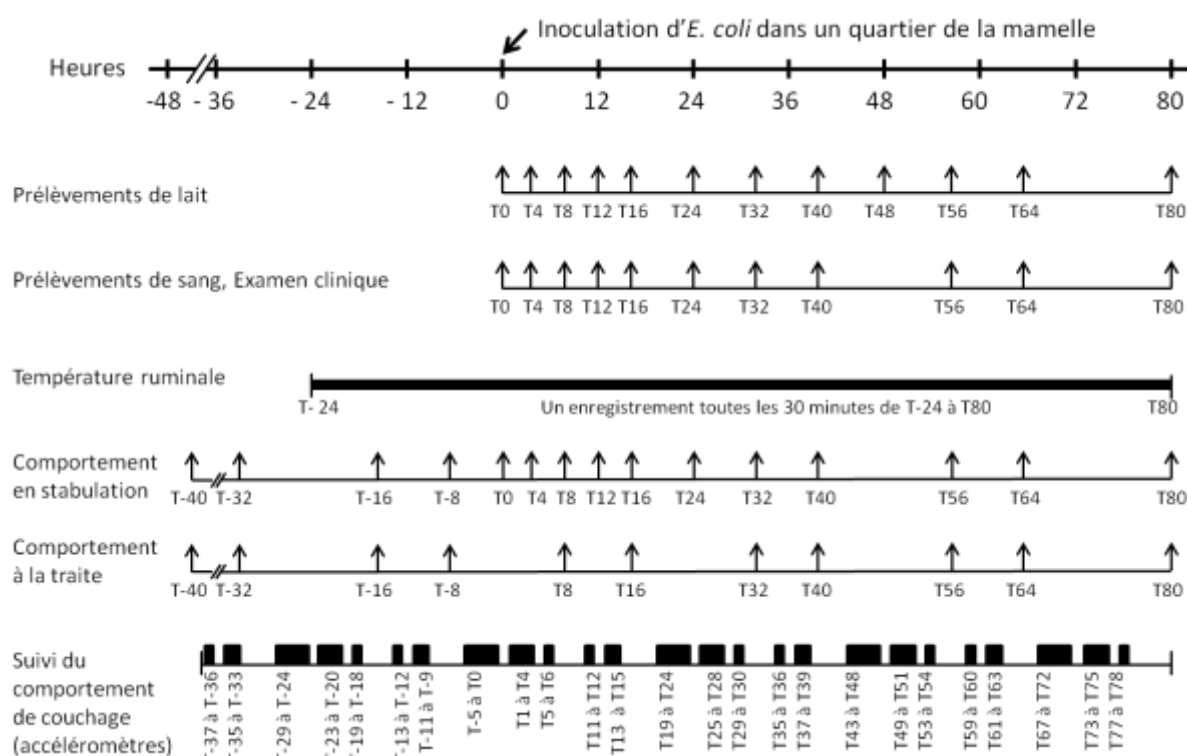


Figure 4 : Schéma de la chronologie des données récoltées

Les observations comportementales, nécessitant que les vaches soient en liberté dans la stabulation, ont eu lieu dans l'heure précédant les prélèvements sanguins et les examens cliniques (évaluations qualitative et quantitative en stabulation) ; aussi, les périodes durant lesquelles des interventions humaines étaient réalisées (traite, prélèvements) ont été supprimées *a posteriori* (suivi du comportement de couchage).

II.2.1.1.3. Description synthétique des variables

Une mammite à *E. coli* a des répercussions locales, systémiques et comportementales.

Afin d'évaluer les modifications au niveau de la mamelle :

- l'examen clinique de la mamelle est basé sur la détection de la chaleur, la couleur, le gonflement, l'induration, la réaction à la pression et les modifications de l'aspect du lait de chacun des quartiers. Ces effets cliniques sont résumés par un score : absents ou légers de 0 à 2, modérés de 3 à 4, sévères de 5 à 7.
- des prélèvements de lait ont permis de suivre la concentration bactérienne dans le lait, la concentration totale et différentielle des cellules somatiques du lait (CCS, SCS (\log_2 (SCC/100000)+3), GNN morts et vivants, lymphocytes) et des marqueurs de l'inflammation locale comme des cytokines (IL-22, IFN- γ , TNF α , IL-1 β , IL-22) ou la Serum Amyloïde A du lait (SAA mammaire)

Pour évaluer les conséquences systémiques :

- le score clinique général regroupe les données de la température rectale, l'état d'hydratation, la fréquence des contractions ruminales et les signes d'altération de la vigilance. Les effets systémiques observés cliniquement sont considérés comme absents ou légers de 0 à 2, modérés de 3 à 5, et sévères de 6 à 9.
- des prélèvements de sang ont servi à dénombrer les globules blancs (granulocytes neutrophiles, monocytes, lymphocytes B, lymphocytes T dont LT- $\gamma\delta$, LT-CD4 et LT-CD8) et à réaliser des analyses biochimiques (haptoglobine, cortisol, SAA (Serum Amyloïde A) et le rapport glutathion réduit/oxydé), afin de suivre les réponses immunitaire, inflammatoire, et certains aspects du stress oxydatif.

Afin d'évaluer les conséquences comportementales, les déplacements et le couchage ont été mesurés avec des accéléromètres. Par ailleurs, les animaux ont été observés durant la traite et lorsque ils étaient libres dans la stabulation.

II.2.1.2. Collecte et traitement des données des observations comportementales

Toutes les observations comportementales ont été réalisées par le même observateur, sans connaissance sur le type d'immunisation reçu par chaque vache. Pour prendre en compte l'accoutumance des animaux à la présence de l'observateur, les premiers examens observatoires ont été supprimés : T-40, T-32 et T-16 pour les évaluations en stabulation, T-40 et T-32 pour l'évaluation à la traite

II.2.1.2.1. Suivi du comportement de couchage

Afin de suivre l'évolution du comportement de couchage des animaux, un accéléromètre (Hobo Pendant G Datta Logger, Onset Computer Corp., Pocasset, MA) a été placé sur la face médiale du membre postérieur droit de chaque vache. L'accéléromètre évalue la position du boîtier en fonction de 3 axes. Ainsi après extraction des données avec le logiciel Onset HOBOWare software (Onset Computer Corporation) et le traitement des données avec le logiciel Excel®, il est possible de connaître le temps passé en décubitus et le nombre de changements de position (se couche ou se lève).

Seules les données correspondant aux périodes où les vaches étaient libres dans la stabulation sans intervention humaine ont été conservées. Le rythme circadien a un effet sur le comportement de couchage (Veissier, Le Neindre, Trillat 1989). Afin de limiter ce biais, les données post-inoculation ont été pondérées par comparaison avec les données du jour précédent l'inoculation : différence entre les données des jours post-inoculation de 1h à 4h du matin avec celles de T-23 à T-20, de 2 à 3h du matin avec celles de T-19 à T-18, de 11h à 12h avec celles de T-13 à T-12, de 13 à 15h avec celles de T-11 à T-9, de 18h à 00h avec celles de T-5 à T0, l'inoculation ayant été réalisée à 00h00.

II.2.1.2.2. Qualitative Behaviour Assessment (QBA) ou évaluation qualitative du comportement

Dans la stabulation, l'observateur s'est placé face à chaque animal à évaluer, sans le déranger, à 4-5 mètres environ, pour l'observer pendant 30 secondes environ. Ensuite, à l'aide de l'application « Evadoul », développée par l'équipe de recherche CARAIBE, UMR Herbivores de l'INRA (INRA, Saint-Genès-Champanelle), installée sur une tablette ACER®, il évaluait

l'animal pour chacun des descripteurs définis dans le Tableau 2, en utilisant une échelle visuelle analogique (mesure du déplacement du curseur entre le minimum à gauche (0 mm) et le maximum à droite (125 mm)).

Tableau 2 : Éthogramme du Qualitative Behaviour Assessment, issue du “Welfare Quality® Assessment Protocol for dairy cattle”

Descripteurs	Définition
Vigilant	Attentif à l'observateur, à son entourage
Actif	Dynamique et/ou en action et/ou en mouvement (mange, rumine)
Détendu	Décontracté, sans anxiété et/ou sans agitation et/ou sans tension
Craintif	Manifeste une fuite quelconque, un recul
Agité	Nerveux, fait preuve d'activité excessive
Vigoureux	Parait être en bonne santé
Abattu	Eteint, morose, déprimé, vide
Souffrant physiquement	Semble ressentir de la douleur ou de l'inconfort physique
Calme	Tranquille, mouvements fluides et sans-à-coups
Tendu	Crispé, « sur les nerfs »
Vif	Tonique/éveillé
Curieux	Intéressé et intrigué par son environnement
Léthargique	Sans énergie, sans vigueur, terne
Agressif	Mécontent et/ou attaque ou prêt à attaquer
Confiant	Ne parait pas craintif, s'approche de l'observateur
Joyeux	Attitude générale joyeuse
Triste	Attitude générale triste

Les données du QBA ont été synthétisées en deux variables simplifiées par le biais d'une analyse en composantes principales (ACP). Cette analyse a été réalisée à partir des données QBA de toutes les vaches, du temps T0 au temps T80. On retiendra les deux premiers axes de l'ACP (explicatifs à 59,02 %), corrélés positivement ou négativement aux différentes variables du QBA (Tableau 3) :

Tableau 3 : Synthèse des résultats de l'ACP, définition des axes par les descripteurs

Axes	Axe 1 (explicatif à 38,18%) ou variable « Humeur»		Axe 2 (explicatif à 20,84%) ou variable « Niveau d'éveil»		
	Sens	Positif	Négatif	Positif	Négatif
Descripteurs corrélées		Vigilant			
		Vif	Souffrant	Tendu	
		Curieux	physiquement	Prudent	Calme
		Actif	Triste	Agité	Confiant
		Joyeux	Léthargique	Craintif	Détendu
		Vigoureux	Abattu		

Chacune des deux variables synthétiques correspond aux coordonnées de chaque individu pour chaque temps sur chacun des axes.

II.2.1.2.3. Evaluation comportementale en stabulation

Dans la stabulation, l'observateur se place à 4-5 mètres de l'animal, et remplit les différents critères de la grille à l'aide de l'application « Evadoul ». La grille d'évaluation (Tableau 4) est construite à partir des signes d'inconfort ou de douleur précédemment décrits dans la littérature (Hudson, Whay, Huxley 2008; Prunier et al. 2013; Gleerup et al. 2015; de Oliveira et al. 2014; Robertson, Kent, Molony 1994; Mølgaard et al. 2012) :

Tableau 4 : Éthogramme et scores de l'évaluation comportementale quantitative

Item	(Score)	Critère	Score max.
Attitude générale	(0)	Animal vigilant : avec l'œil vif, dressant la tête et/ou les oreilles, réagissant à la présence de l'observateur	2
	(0,5)	Animal somnolent : avec la tête et/ou les oreilles basses, réagissant à l'approche de l'observateur	
	(1)	Animal apathique : avec la tête et les oreilles basses sans réaction à l'approche de l'observateur	
	(0)	Tête au-dessus de la ligne du dos	
	(1)	Tête en-dessous de la ligne du dos	
Expressions faciales	(0)	Paupières ouvertes, mufler normal	3 (2)**
	(1)	Paupières : semi-ouvertes	
	(2)	fermées	
	(1)	Retroussement du mufler*	
Positions des oreilles	(0)	Oreilles au-dessus de la ligne du cou	1
	(1)	Oreilles en-dessous de la ligne du cou	

Item	(Score)	Critère	Score max.
Posture du corps et des membres	(0)	Décubitus sternal	3 (1)**
	(0,5)	Décubitus sternal à 45°C (postérieurs ou antérieurs étirés)	
	(1)	Décubitus latéral	
	(0)	Debout sans anomalie	
	(1)	Debout avec le corps en appui contre un mur* ou le dos voussé* ou un report de poids sur les antérieurs *	
	(0)	Debout, positions des membres sans anomalies	
Activités anormales	(1)	Antérieurs et/ou les postérieurs rapprochés voire croisés, ou un membre en suspension* ou les postérieurs étirés vers l'arrière	4 (1)**
	(0)	Rumine et/ou mange	
	(1)	Bruxisme ou plainte, vocalisation*	
	(1)	Piétinements/balancements	
	(1)	Ne mange pas*	
Signes cliniques	(1)	Ne rumine pas*	5 (4)**
	(0)	Poils lisses, absence d'énophtalmie, de tremblements et d'halètement	
	(1)	Enophtalmie	
	(1)	Erection des poils le long de la colonne	
	(1)	Tremblements	
Position de la queue	(1)	Trémulations des muscles	1
	(1)	Halètement*	
	(0)	Position normale de la queue	
	(0,5)	Milieu de la queue légèrement plaquée contre la mamelle	1
	(1)	Milieu de la queue plaquée contre la mamelle	

* ces comportements n'ont pas été observés

**scores modifiés suite à la non-observation de certains comportements

Afin de décrire l'évolution et la gravité des comportements d'inconfort qui ont été observés, nous avons calculé le nombre d'animaux par score d'item et par unité de temps.

Dans le but d'inclure les différents items dans l'analyse multiparamétrique, pour chaque animal et à chaque temps, les scores ont été transformés en pourcentages du score maximal de chaque item.

II.2.1.2.4. Comportement à la traite

Dans le but d'évaluer des signes comportementaux d'inconfort ou de douleur pendant la traite, un seul observateur a observé jusqu'à 4 vaches au maximum sur un même quai de traite. L'observateur se place entre 1 et 3 m en arrière de l'animal, et l'évalue à l'aide d'une grille construite à partir des informations déjà disponibles dans la littérature (Tableau 5) :

Tableau 5 : Ethogramme de l'évaluation du comportement à la traite

Comportement	Définitions	Unités
Temps de traite (Rushen et al. 2001) (Fogsgaard, Bennedsgaard, Herskin 2015)	Temps entre la pose du premier manchon trayeur et le décrochage du dernier manchon trayeur.	Temps (min:sec)
Pas (Medrano-Galarza et al. 2012), (Rushen et al. 2001), (Fogsgaard, Bennedsgaard, Herskin 2015)	Le pied d'un des postérieurs est décollé du sol de moins 15cm	
Coup de pied (Rushen et al. 2001), (Fogsgaard, Bennedsgaard, Herskin 2015)	Le pied d'un des postérieurs est décollé du sol de plus de 15 cm	Fréquence (nb/min)
Vocalisation (Rushen et al. 2001)	La vache émet un son avec ses cordes vocales	
Défécation (Rushen et al. 2001)	La vache émet une bouse	
Emission d'urines (Rushen et al. 2001)	La vache se met en position d'uriner et élimine l'urine	

Le moment de la traite semble influencer la fréquence des pas et des coups de pied, les vaches décollent moins souvent les pieds du sol le matin que le soir. Par exemple, à T-16, en moyenne les vaches donnent $0,09 \pm 0,05$ coup de pied/minute et $1,19 \pm 0,27$ pas/minute contre $0,22 \pm 0,07$ coup de pied/minute et $1,71 \pm 0,38$ pas/minute à T-8. Afin de limiter ce phénomène, pour chaque vache et à chaque temps post-inoculation, les fréquences mesurées à la traite du matin avant inoculation (T-16) ont été soustraites aux fréquences mesurées durant les traites du matin après l'inoculation. Cette opération a été réalisée de la même manière pour les traites du soir avec comme référence la traite à T-8.

Il y a autant de comportement de miction et de défécation avant qu'après inoculation. Le comportement de vocalisation a été observé seulement trois fois (T-8, T16 et T80).

II.2.1.3. Méthodes statistiques

II.2.1.3.1. *Analyses Factorielles Discriminantes*

Les analyses factorielles discriminantes ont été réalisées à l'aide du logiciel XLstats 2016. Elles sélectionnent les variables au sein des x classes différentes et identifient, au maximum, x-1 combinaisons linéaires de variables discriminant au mieux les classes (Lebart, Morineau, Piron 1995). Le test du lambda de Wilks indique si la différence entre les classes est significative au seuil de 5%.

On considère que les variables les plus contributives au modèle sont celles dont les moyennes sont significativement différentes ($p < 0,05$) lors du test unidimensionnel d'égalité des moyennes des classes. De plus, on considère que les axes sont expliqués par les variables corrélées à hauteur d'au moins 0,3 en valeur absolue. La validation croisée permet de vérifier les performances de notre modèle. Selon les combinaisons linéaires, elle replace les animaux dans les différentes classes et calcule le pourcentage d'individus correctement placés par rapport au nombre total d'animaux dans la classe.

Pour déterminer les phases de la mammite, l'analyse a discriminé les temps T0, T8, T12, T16, T24, T32, T40, T56, T64 et T80 en fonction des variables, à la condition que moins de deux données soient manquantes à chacune de ces dates : les variables correspondant aux observations comportementales en stabulation (QBA et évaluation comportementale), les variables cliniques (score clinique général, score clinique mammaire, température rectale), toutes les variables mesurées dans le lait (cytokines, cellules et bactéries) et certaines variables des analyses biochimiques sanguines (cortisol, haptoglobine, SAA).

Afin de vérifier que les temps T4 et T48 s'intègrent dans les mêmes phases que les temps adjacents (T8 et T40, T56), une autre analyse a été réalisée de la même manière que la précédente avec les temps de T0 à T80 en prenant en compte des variables du lait (cytokines, cellules et bactéries), le cortisol et le score clinique mammaire.

Une fois que les phases de l'évolution de la mammite ont été définies, les moyennes de chaque période ont été calculées pour chaque variable et pour chaque vache. Ainsi il n'y a pas de donnée manquante quelle que soit la variable et la vache au sein de chacune des phases. La

température ruminale a été mesurée en continu. Les bornes pour calculer les moyennes correspondent aux bornes des phases définies dans la partie II.2.2.2 : pour la phase pré-inoculation de T-24 à T0, pour la phase pré-clinique de T4 à T8, pour la phase d'état de T12 à T16 et pour la phase de rémission de T32 à T80.

A l'aide des analyses factorielles discriminantes, et afin de déterminer les variables discriminant les phases après inoculation, chacune des phases après inoculation a été comparée à la phase avant inoculation.

II.2.1.3.2. Analyses de variance

Les effets du temps, et du traitement ont été évalués à l'aide d'analyses de variance avec le logiciel R. Les données de chaque variable ont été testées suivant le modèle : variable X ~ temps + traitement + interaction temps*traitement + individus nichés dans les traitements. L'exactitude du modèle a été vérifiée par l'étude graphique des résidus. Les graphiques des résidus de l'évaluation comportementale en stabulation n'étant pas acceptable, le nombre de vaches par score de chaque item a été quantifié afin de réaliser une analyse de variance en fonction du temps et une autre en fonction du traitement.

II.2.2. Résultats

II.2.2.1. Description des résultats des données comportementales

II.2.2.1.1. Suivi du comportement de couchage

Les temps sur les figures Figure 5 et Figure 6, correspondent au début de chaque période d'observations. Suite à l'inoculation, l'évolution du comportement de couchage suit une courbe à tendance sinusoïdale atténuée (Figure 5), l'évolution du temps passé en décubitus semble proportionnelle à celle de la fréquence des changements de position (Figure 6). Juste après l'inoculation, les vaches passent un peu moins de temps couché et se lèvent ou se couchent, la diminution maximale observée étant de - 0,66 changement de position par heure. Puis 11 heures après l'inoculation, on observe une forte augmentation : 75% des vaches se lèvent ou se couchent une fois de plus par heure et 50% des vaches se couchent au moins 39,9 minutes de plus par heure. La plus forte diminution du temps de couchage est de - 8,2

minutes par heure, 25 heures après l'inoculation. Par la suite, les variations adoptent la même cyclicité mais avec une amplitude moindre.

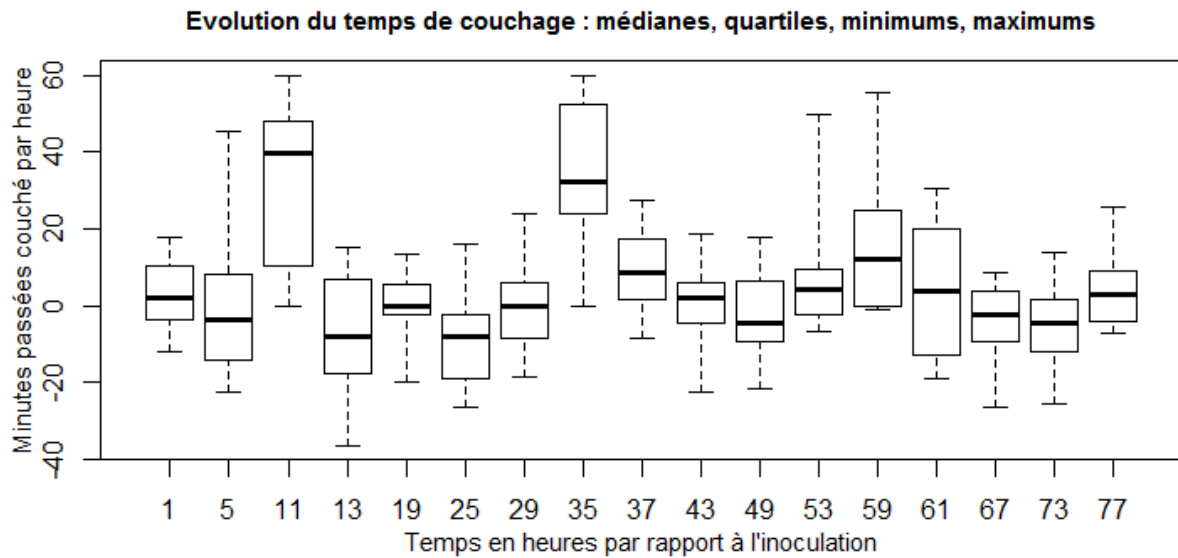


Figure 5 : Diagramme en boîte du temps de décubitus par rapport au temps T0

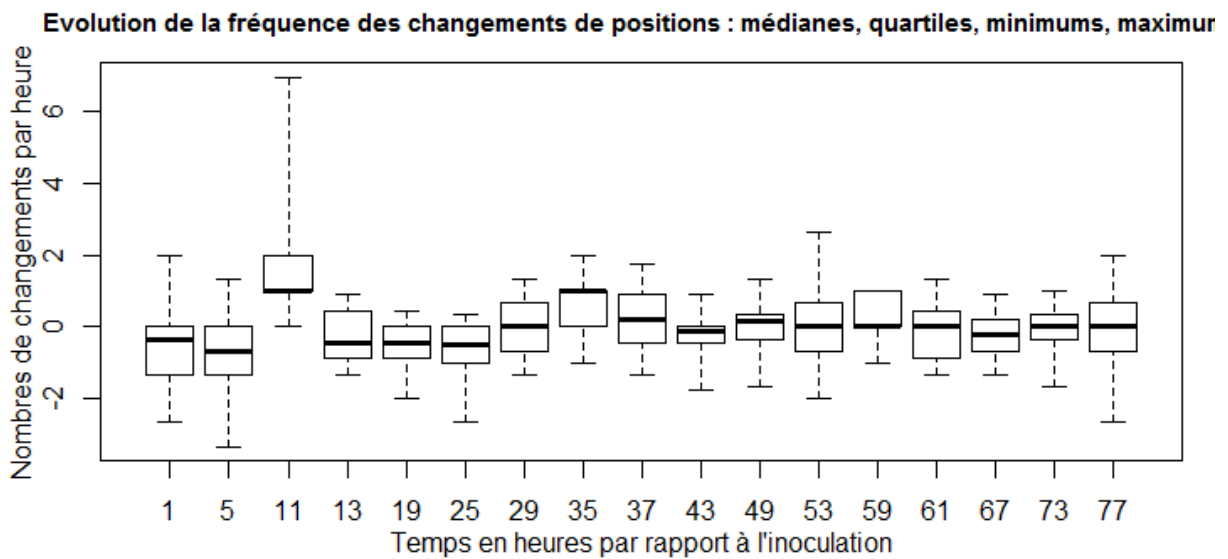


Figure 6 : Diagramme en boîte de la fréquence des changements de position par rapport au temps T0

La mammite perturbe donc le rythme circadien des vaches : leur temps de couchage augmente au moment où elles sont habituellement actives durant la journée, et il diminue au moment où habituellement, elles se reposent (Veissier, Le Neindre, Trillat 1989).

II.2.2.1.2. Evaluation qualitative du comportement ou Qualitative Assessment Behaviour (QBA)

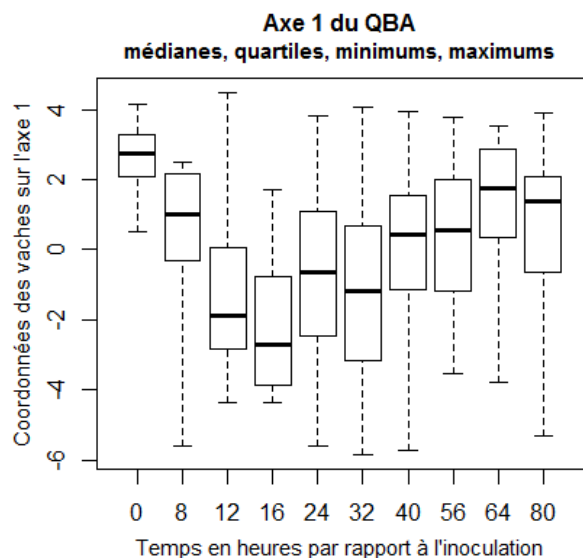


Figure 8 : Diagramme en boîte de l'humeur des vaches

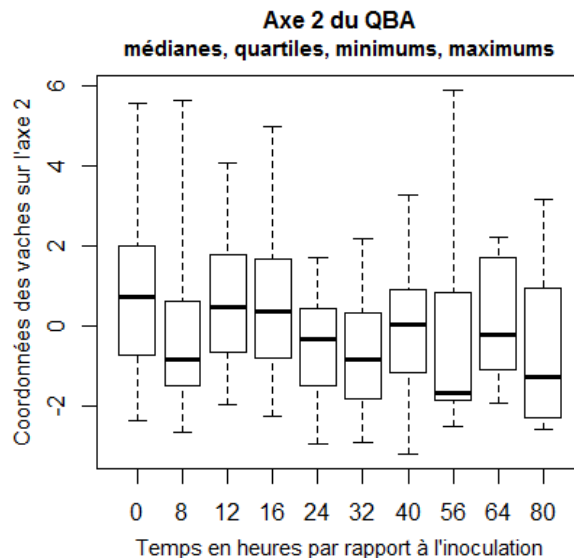


Figure 7 : Diagramme en boîte du niveau d'éveil des vaches

La mammite a une influence sur l'axe 1 de l'analyse en composantes principales (ACP) : 16 heures après l'inoculation, plus de 75% des animaux ont une « humeur » négative. Ensuite leurs coordonnées sur l'axe 1 redeviennent progressivement positives. La différence d'écart entre les 1ers et 3èmes quartiles est plus grande pour les dates situées juste après l'inoculation (Figure 8). Les coordonnées sur l'axe 2 changent peu ; elles ont tendance à indiquer un « niveau d'éveil » réduit, en particulier pour les médianes à T8 et T56 (Figure 7).

II.2.2.1.3. Evaluation comportementale en stabulation

De manière générale, le nombre d'observations des signes d'inconfort augmente chez la majorité des vaches de 8 à 16 heures après l'inoculation :

- pour une dizaine de vaches, l'attitude générale et les expressions faciales se dégradent (scores et fréquence des scores positifs en augmentation) (Figure 11 et Figure 9)
- le nombre de vaches avec les oreilles basses, avec des postures anormales et la queue plaquée contre les cuisses atteignent leur maximum (respectivement 11 vaches à T16, 4 vaches à T8 et 5 vaches à T12) (Figure 10, Figure 12 et Figure 13)
- huit vaches expriment au moins un signe clinique parmi ceux retenus (Figure 14)

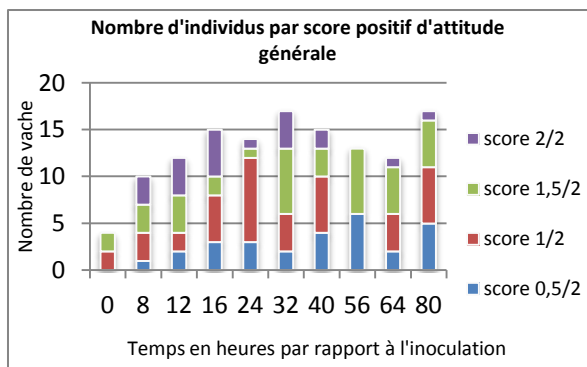


Figure 11 : Évolution du score d'attitude générale

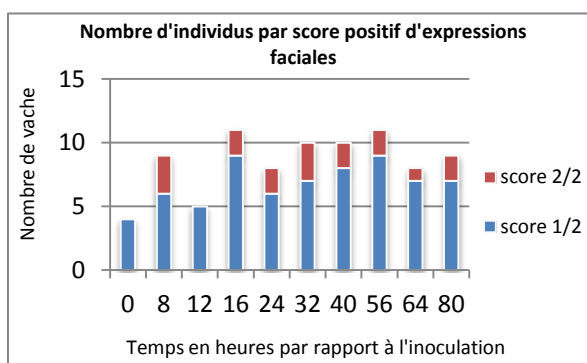


Figure 9 : Évolution du score d'expressions faciales

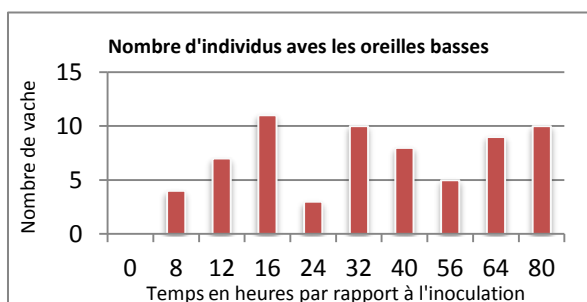


Figure 12 : Évolution du score de la position des oreilles

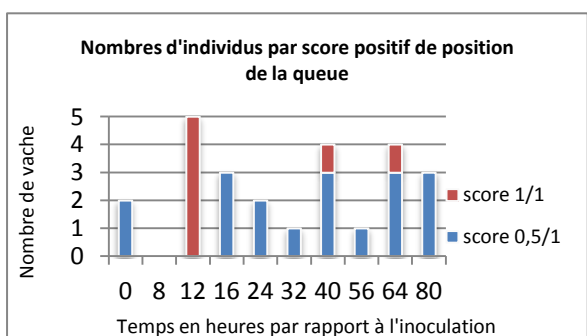


Figure 13 : Évolution du score de la position de la queue

Après ce pic entre 8 et 16 heures, on observe une stagnation voire une diminution du nombre de vaches présentant des signes d'inconfort ou de douleur. Ensuite, on observe une nouvelle augmentation de tous les items, les nombres de vaches avec au moins un signe clinique ou avec une attitude générale dégradée atteignent leurs maximums 32 heures après l'inoculation (respectivement 10 vaches et 17 vaches dont 11 somnolentes ou apathiques, avec la tête basse). Le nombre de vaches avec des expressions faciales d'inconfort ou des postures anormales atteignent à nouveau leurs maximum, respectivement 56 et 40 heures après l'inoculation.

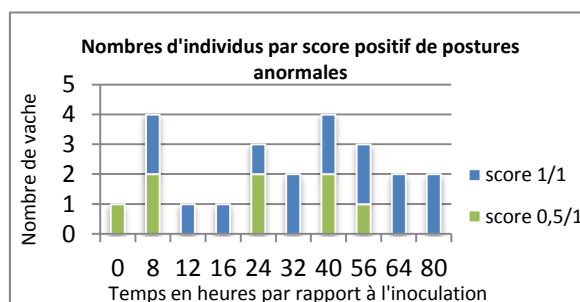


Figure 10 : Évolution du score de postures anormales

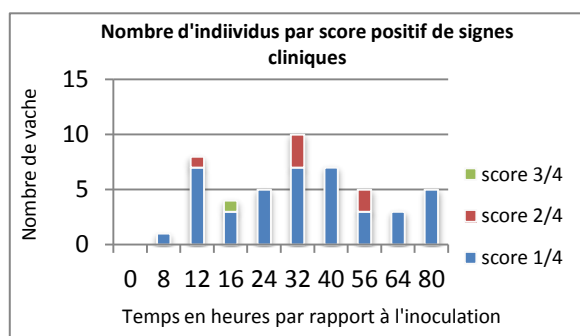


Figure 14 : Évolution du score de signes cliniques

Après ce nouveau pic, le nombre de signes d'inconfort ou de douleur observés diminue sans revenir au niveau observé avant l'inoculation. Le nombre de vaches avec une attitude générale dégradée ou les oreilles basses, augmente une dernière fois, 80 heures après l'inoculation

(respectivement, 17 vaches dont 6 somnolentes ou apathiques, avec la tête basse et 10 vaches). Les activités anormales sont difficilement interprétables, seul le piétinement a été observé : une fois chez des vaches différentes aux temps T0, T12, T32, T40 et T64, et chez deux vaches à T80.

II.2.2.1.4. Comportement à la traite

A T-16, les médianes des traites du matin sont de 0 coup de pied/minute et de 0,83 pas/minute avec des écarts-interquartiles de 0 coup de pied/minute et de 0,88 pas/minute.

A T-8, les médianes à la traite du soir sont plus élevées que celles du matin : 0,16 coup de pied/minute et 1,43 pas/minute avec des écarts-interquartiles de 0,24 coup de pied/minute et de 1,46 pas/minute.

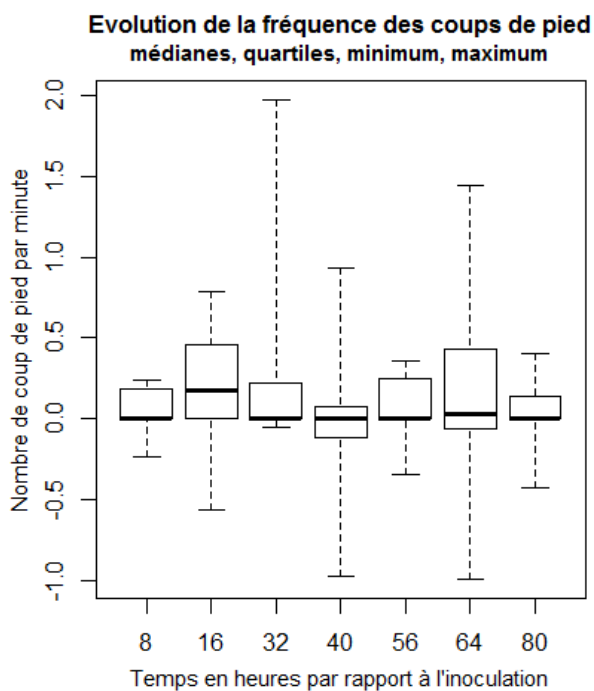


Figure 16 : Diagramme en boîte de la fréquence de coups de pied pendant la traite par rapport à T0

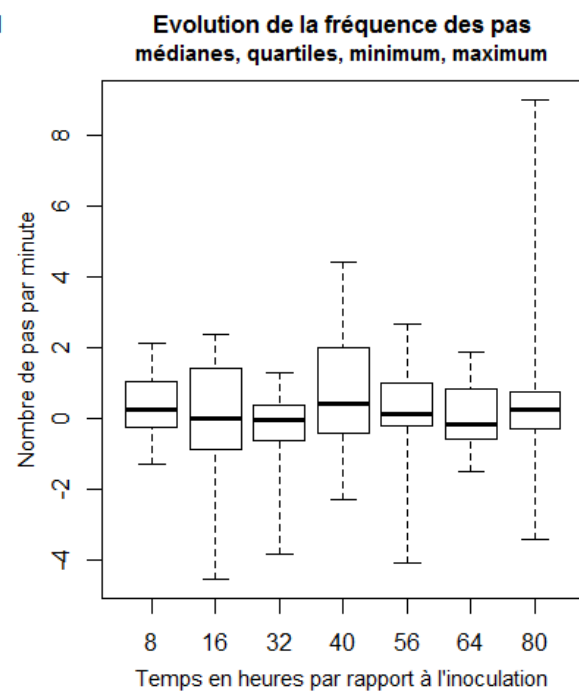


Figure 15 : Diagramme en boîte de la fréquence des pas pendant la traite par rapport à T0

Un quart à trois quarts des vaches ont un changement de comportement avec une augmentation de la fréquence des coups de pied après l'inoculation, l'augmentation la plus marquée étant située à T16 avec une médiane à + 0,17 coup de pied par minute et un 3^{ème} quartile à + 0,44 coup de pied/minute. Par ailleurs, 40 et 60 heures après l'inoculation sont les seules dates où chez plus d'un quart des vaches, la fréquence de coups de pied est diminuée (Figure 16). Après inoculation, les vaches modifient la fréquence de piétinement durant la traite ; celle-ci a tendance à augmenter à T8, T40 et T80 (respectivement médianes de +0,27, +0,40, +0,23 pas/minute) et à diminuer à T64 (médiane de - 0,16 pas/minute) (Figure 15)

L'étendue et l'écart interquartile de la variation de la fréquence des coups de pied et des pas sont généralement plus grands pour les traites du soir (T16, T40, T60), que pour les traites du matin (T8, T32, T56, T80).

II.2.2.2. Définition des phases

La première analyse factorielle discrimine significativement les temps T0, T8, T12, T16, T24, T32, T40, T56, T64 et T80 à l'aide de 14 variables sur les 27 incluses dans l'analyse ($\lambda = 2,8 \cdot 10^{-3}$, $p < 0,0001$) (Annexes D : Tableau 12).

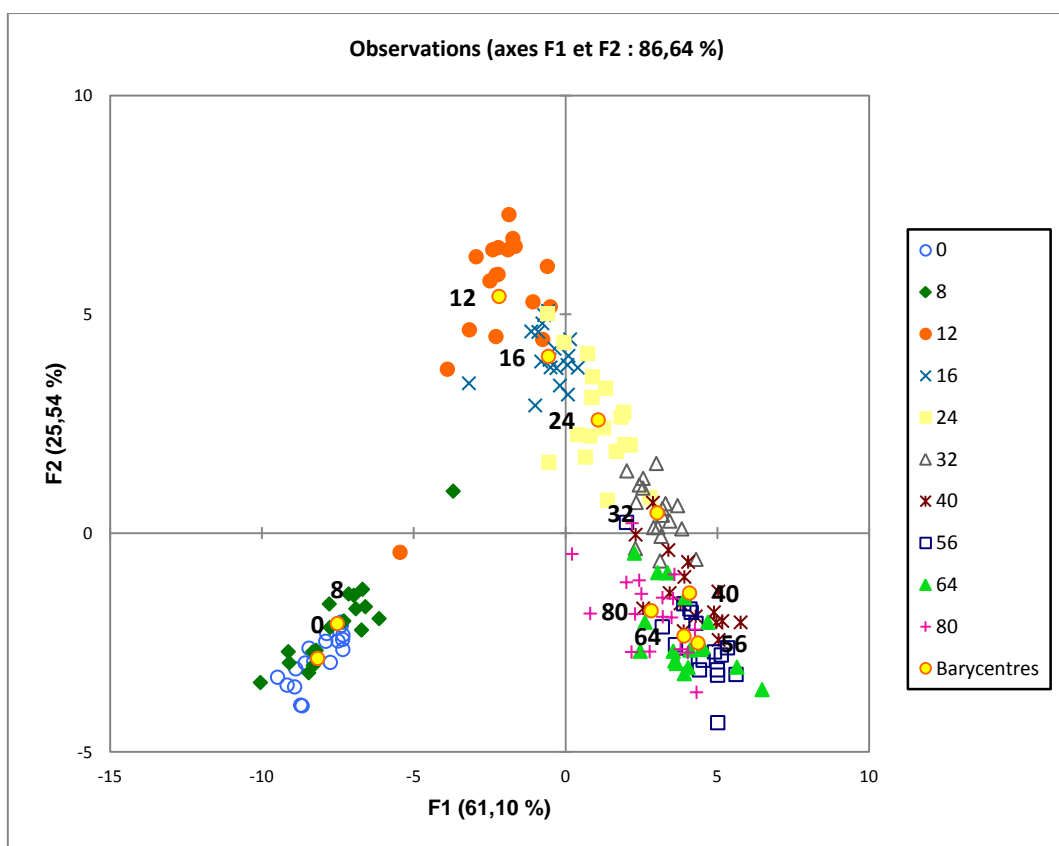


Figure 17 : Résultat graphique de l'analyse factorielle discriminante définissant les phases de la mammite

Sur la représentation graphique (Figure 17), il est possible de distinguer clairement les temps T0 et T8 des autres dates, les barycentres des temps T32, T40, T56, T64 et T80 sont proches et les nuages de points se confondent. Les nuages de points des dates T12, T16 et T24 se superposent légèrement. L'ensemble forme un continuum depuis le quadrant supérieur gauche vers le quadrant inférieur droit de l'AFD

La validation croisée confirme ce résultat, le pourcentage d'animaux correctement replacés par le modèle est faible pour T40, T56, T64 et T80 car les caractéristiques des variables se confondent. Il est également faible à T8, car neuf animaux de la date T8 se retrouvent en T0. Cependant tous les animaux avant inoculation sont bien replacés en T0 par le modèle, et 88,9% des animaux à T32 sont identifiés par le modèle comme appartenant effectivement à cette date, deux animaux ayant été placés par le modèle au temps T40 (Tableau 6 et Annexes D : Tableau 13).

Tableau 6 : Pourcentage d'individus replacés correctement selon le modèle

Temps T	0	8	12	16	24	32	40	56	64	80
% individus correct	100	44,4	83,3	88,9	72,2	88,9	56,3	47,1	41,2	66,7

La deuxième analyse factorielle discriminante ($\lambda = 0,002$ et $p < 0,0001$) regroupe la date T4 avec les dates T0 et T8, avec 94,4% d'animaux correctement placés par le modèle. La date T48 se retrouve avec le groupe T32, T40, T56, T64 et T80 avec 33,3% des animaux correctement placés par le modèle (Annexes D : Figure 21 Figure 22, Tableau 14 et Tableau 15).

Au final, la phase avant inoculation sera constituée des dates T-16 et T0, la phase pré-clinique des temps T4 et T8, la phase d'état des temps T12, T16 et T24, et la phase de rémission des temps T32, T40, T48, T56, T64 et T80.

II.2.2.3. Comparaison entre la phase pré-inoculation et les phases post-inoculation

II.2.2.3.1. Phase pré-clinique

Les phases pré-inoculation et pré-clinique sont significativement différentes ($\Lambda = 4,3 \cdot 10^{-4}$, $p < 0,0001$). Suivant les résultats de la validation croisée, le modèle est solide : 100% des animaux de la phase pré-inoculation, et 94,4% des animaux de la phase pré-clinique sont placés correctement. Les variables sont corrélées à un seul axe explicatif à 100%.

Le modèle contient 31 variables au sein desquelles seules 7 d'entre elles ont des moyennes significativement différentes entre la phase pré-inoculation et la phase pré-clinique (Tableau 7) :

Tableau 7 : Variables de l'analyse factorielle discriminant significativement les phases pré-inoculation et pré-clinique

Variables	Moyenne \pm erreur standard			Corrélacion avec l'axe	p-value
	pré-inoculation	pré-clinique			
Comportement					
Evolution des changements de position	0	- 0,64 \pm 0,22	/h	- 0,452	0,006
Position de la queue	6,9 \pm 3,3	0	%	- 0,332	0,048
Clinique					
Score clinique de la mamelle	0	0,58 \pm 0,15	/7	0,548	0,001
Sang					
Lymphocytes T	4,05 \pm 0,28	2,97 \pm 0,24	10 ⁹ /L	- 0,449	0,006
Taux de cortisol plasmatique	4,80 \pm 0,66	15,8 \pm 1,23	ng/ml	0,804	< 0,0001
Lait					
Cellules somatiques					
Concentration (CCS)	19,9 \pm 2,5	94,2 \pm 31,5	10 ³ /ml	0,374	0,025
Score (SCS)	4,23 \pm 0,06	4,7 \pm 0,08		0,641	< 0,0001

Au sein de ce modèle, durant la phase pré-clinique, les éléments discriminants sont les changements de position moins fréquents, le score clinique mammaire dégradé en même temps que la quantité de cellules somatiques augmente alors que le nombre de lymphocytes T sanguins diminue et que la cortisolémie augmente. Le score moyen de positionnement de la queue était positif durant la phase pré-inoculation ; durant la phase pré-clinique, il est de 0%.

II.2.2.3.2. Phase d'état

Les phases pré-inoculation et d'état sont très significativement différentes ($\Lambda = 1,7 \cdot 10^{-6}$, $p < 0,0001$). Suivant les résultats de la validation croisée, le modèle est solide : 100% des animaux des phases pré-inoculation et d'état sont placés correctement. Les variables sont corrélées à deux axes, dont le premier est explicatif à 100% (seules les variables non incluses au modèle sont corrélées au deuxième axe).

Le modèle contient 33 variables au sein desquelles, 26 ont des moyennes significativement différentes entre la phase pré-inoculation et la phase d'état (Tableau 8 ci-après) :

Tableau 8 : Variables de l'analyse factorielle discriminant significativement les phases pré-inoculation et d'état

Variables	Moyenne ± Erreur standard			Corrélation avec l'axe	p-value
	Pré-inoculation	Phase d'état			
Comportement					
QBA axe 1	2,59±0,23	-1,34±0,30		0,873	< 0,0001
Evolution des coups de pied à la traite	0	0,21±0,08	/min	-0,398	0,016
Attitude générale	18,06±4,87	46,76±5,22	%	-0,567	0,0003
Position des oreilles	13,89±5,43	39,89±8,20	%	-0,400	0,016
Signes cliniques	0,69±0,69	9,26±2,32	%	-0,518	0,001
Clinique					
Température ruminale	39,13±0,04	40,23±0,07	°C	-0,918	< 0,0001
Score de la mamelle	0,00±0,00	4,56±0,21	/7	-0,966	< 0,0001
Sang					
Leucocytes	7,93±0,30	4,99±0,27	10 ⁹ /L	0,777	< 0,0001
Monocytes	6,80±0,62	3,03±0,34	%	0,676	< 0,0001
Lymphocytes B	15,36±0,77	10,89±0,68	%	0,598	0,0001
Lymphocytes B	1,23±0,09	0,46±0,04	10 ⁹ /L	0,797	< 0,0001
Lymphocytes T	51,25±3,07	29,99±1,32	%	0,737	< 0,0001
Lymphocytes T	4,05±0,28	1,44±0,10	10 ⁹ /L	0,837	< 0,0001
Lymphocytes T GD	0,21±0,03	0,11±0,02	10 ⁹ /L	0,456	0,005
Lymphocytes T CD4	1,73±0,18	0,58±0,05	10 ⁹ /L	0,725	< 0,0001
Lymphocytes T CD8	1,39±0,16	0,74±0,09	10 ⁹ /L	0,516	0,001
Haptoglobine	0	0,06±0,01	mg/mL	-0,665	< 0,0001
SAA	7,61±3,24	98,11±5,90	µg/mL	-0,917	< 0,0001
Lait					
IL-22	traces	167,07±20,15	pg/mL	-0,816	< 0,0001
IFN-γ	traces	118,65±39,82	pg/mL	-0,452	0,006
TNFα	traces	12 720±2 814	pg/mL	-0,613	< 0,0001
GNN mort	10,67±2,08	6 300±776	10 ³ /mL	-0,812	< 0,0001
GNN vivant	1,75±0,44	27 572±3 807	10 ³ /mL	-0,779	< 0,0001
Lymphocytes	6,68±1,18	677,43±89,02	10 ³ /mL	-0,791	< 0,0001
Bactéries	0	24 277±8 103	ufc/mL	-0,457	0,005
SCS	4,23±0,06	7,39±0,06		-0,987	< 0,0001

Au sein de ce modèle, durant la phase d'état de la mammite, les éléments discriminants sont l'expression de signes d'inconfort : l'humeur des vaches (QBA axe 1) est négative, le nombre de coups de pied pendant la traite augmente, les vaches ont tendance à être somnolentes ou apathiques avec la tête et/ou les oreilles basses et le score clinique augmente (énophtalmie, tremblements, érection des poils...). De plus, elles sont hyperthermes, leur mamelle présente les signes cliniques de mammite. Les paramètres sanguins et du lait montrent une réaction immunitaire. Par rapport à la phase pré-inoculation, la concentration des leucocytes circulants diminue, dont celles des monocytes, des lymphocytes B et T (dont les lymphocytes T $\gamma\delta$, CD4 et CD8), les pourcentages des lymphocytes T et B diminuent également. En parallèle, les concentrations de neutrophiles morts et vivants et de lymphocytes augmentent fortement, tout comme le score de cellules somatiques du lait. Les concentrations d'haptoglobine et de SAA circulantes sont augmentées, tout comme celle de l'interleukine IL-22, de l'IFN- γ et du TNF α , dans le lait. La concentration des bactéries dans le lait est élevée avec une moyenne à $24\,276 \pm 3\,807$ ufc/mL de lait.

II.2.2.3.3. Phase de rémission

La phase de rémission est significativement différente de la phase pré-inoculation ($\lambda = 1,36 \cdot 10^{-8}$, $p < 0,0001$), indiquant qu'à la fin de la période d'examen, les animaux ne sont pas revenus à l'état précédant l'inoculation. Suivant les résultats de la validation croisée, le modèle est solide : 100% des animaux des phases pré-inoculation et de rémission sont placés correctement. Les variables sont corrélées à trois axes, dont le premier est explicatif à 100% (seules les variables non incluses au modèle sont corrélées aux autres axes).

Le modèle contient 33 variables au sein desquelles, 24 ont des moyennes significativement différentes entre la phase pré-inoculation et la phase de rémission (Tableau 9).

Tout comme la phase d'état, lors de la phase de rémission, l'humeur des vaches est moins bon qu'avant l'inoculation, le nombre de coups de pied pendant la traite est augmenté, les vaches ont toujours tendance à être somnolentes ou apathiques avec la tête et/ou les oreilles basses, et le pourcentage moyen de signes cliniques est augmenté. La température ruminale est légèrement augmentée, et le score clinique de la mamelle est encore élevé. De plus, lors de la phase de rémission, les vaches passent plus de temps couchées.

Tableau 9 : Variables de l'analyse factorielle discriminant significativement les phases pré-inoculation et de rémission

Variables	Moyenne ± Erreur standard			Corrélation avec l'axe	p-value
	Pré-inoculation	Rémission			
Comportement					
QBA axe 1	2,59±0,23	0,24±0,37		0,679	< 0,0001
Evolution des coups de pied à la traite	0	0,10±0,04	/min	-0,448	0,006
Attitude générale	18,06±4,87	47,78±4,58	%	-0,606	< 0,0001
Position des oreilles	13,89±5,43	46,67±7,23	%	-0,528	0,001
Signes cliniques	0,69±0,69	9,72±2,37	%	-0,531	0,001
Evolution du temps passé couché	0	5,65±0,86	min/h	-0,747	< 0,0001
Clinique					
Température ruminale	39,13±0,04	39,40±0,11	°C	-0,358	0,032
Score de la mamelle	0	3,47±0,29	/7	-0,901	< 0,0001
Sang					
PMN	26,69±2,86	46,04±2,78	%	-0,639	< 0,0001
Lymphocytes B	15,36±0,77	11,52±0,71	%	0,531	0,001
Lymphocytes B	1,23±0,09	0,67±0,04	10 ⁹ /L	0,702	< 0,0001
Lymphocytes T	4,05±0,28	1,94±0,10	10 ⁹ /L	0,778	< 0,0001
Lymphocytes T CD8	1,39±0,16	1,02±0,06	10 ⁹ /L	0,346	0,039
Haptoglobine	0	0,60±0,03	mg/mL	-0,957	< 0,0001
SAA	7,61±3,24	245,6±20,2	µg/mL	-0,894	< 0,0001
Cortisol	4,78±0,66	11,00±0,76	ng/mL	-0,728	< 0,0001
Lait					
Interleukine 22	traces	352,0±42,9	pg/mL	-0,814	< 0,0001
SAA	traces	435,5±62,2	µg/mL	-0,768	< 0,0001
TNF α	traces	23,02±6,62	pg/mL	-0,496	0,002
GNN mort	10,67±2,08	5 475,4±728,3	10 ³ /mL	-0,790	< 0,0001
GNN vivant	1,75±0,44	13 252±2 246	10 ³ /mL	-0,711	< 0,0001
Lymphocytes	6,68±1,18	835,56±136,67	10 ³ /mL	-0,721	< 0,0001
CCS	19,89±2,48	23 726±3 113	10 ³ /mL	-0,794	< 0,0001
SCS	4,23±0,06	7,20±0,05		-0,988	< 0,0001

Les taux de lymphocytes B et T dont celui des lymphocytes T CD8 circulants sont diminués par rapport à la phase pré-inoculation, alors que le taux de lymphocytes dans le lait est fortement augmenté. Les concentrations d'haptoglobine et de SAA circulantes sont augmentées, tout comme la concentration de SAA dans le lait. Le pourcentage de neutrophiles circulants est augmenté tout comme la concentration des neutrophiles morts ou vivants dans le lait. La concentration et le score de cellules somatiques ainsi que les concentrations d'interleukine IL-22 et de TNF α sont augmentées dans le lait.

II.2.2.3.4. Bilan des facteurs discriminants par phase par rapport à l'état pré-inoculation

Chacune des phases définies se distinguent de l'état initial par des variables issues de chacune des catégories : clinique, comportementale, composition du sang et du lait. Pour chaque analyse, une trentaine de variables est nécessaire au modèle pour distinguer l'état initial des phases post-inoculation (Annexes E : Tableau 16). Toutes les variables mesurées ont été incluses dans au moins un modèle. Cependant, dans ce bilan, nous ne traiterons que des 33 variables les plus contributives, c'est-à-dire celles incluses dans au moins un modèle avec des moyennes des états après inoculation significativement différentes de celles de l'état initial. L'état pré-clinique est le plus proche de l'état initial, seules sept variables ont des moyennes significativement différentes, contrairement aux autres phases qui en ont respectivement 24 et 26.

Le score clinique mammaire, le score de cellules somatiques et la concentration sanguine de lymphocytes T sont contributives dans la distinction entre la phase initiale et les états post-inoculation et leurs coefficients de corrélation sont parmi les 10% les plus élevés en valeur absolue. Le score de cellules somatiques est celui qui a le coefficient de corrélation le plus élevé en valeur absolue pour distinguer l'état initial des stades clinique et de rémission (Tableau 7, Tableau 8 et Tableau 9).

Plus de la moitié des variables contributives participent à la distinction entre l'état et deux phases post-inoculation. Le cortisol et la concentration de cellules somatiques (CCS) distinguent l'état initial des phases pré-clinique et de rémission. Le cortisol est la variable la plus contributive pour distinguer la phase pré-clinique de l'état initial (coefficient de corrélation le plus élevé en valeur absolue). Les 16 autres variables distinguent les phases

clinique et de rémission de l'état initial. Elles appartiennent à toutes les catégories de variables : comportementales (axe 1 du QBA), fréquence des coups de pied durant la traite, l'attitude générale, la position des oreilles et les signes cliniques objectivés en stabulation), clinique (température ruminale), mesurées dans le sang (pourcentages de lymphocytes B, concentration sanguine des lymphocytes B et T CD8, de l'haptoglobine et de la SAA) et dans le lait (concentrations d'interleukine IL-22, de TNF α , des lymphocytes et des neutrophiles morts ou vivants) (Annexes E : Tableau 16).

Le reste des variables participent à la distinction de l'état initial et d'une seule autre phase : la fréquence des changements de position et la position de la queue pour l'état pré-clinique, les concentrations d'IFN- γ et de bactéries dans le lait, la concentration sanguine de leucocytes, de lymphocytes T $\gamma\delta$ et CD4 et le pourcentage de lymphocytes T et de monocytes pour l'état clinique, et enfin la concentration de SAA dans le lait, le pourcentage de neutrophiles dans le sang et le temps passé couché sont contributifs pour l'identification de la phase de rémission (Annexes E : Tableau 16).

II.2.2.4. Variabilité individuelle des effets en fonction du temps et du traitement

- Effet du traitement :

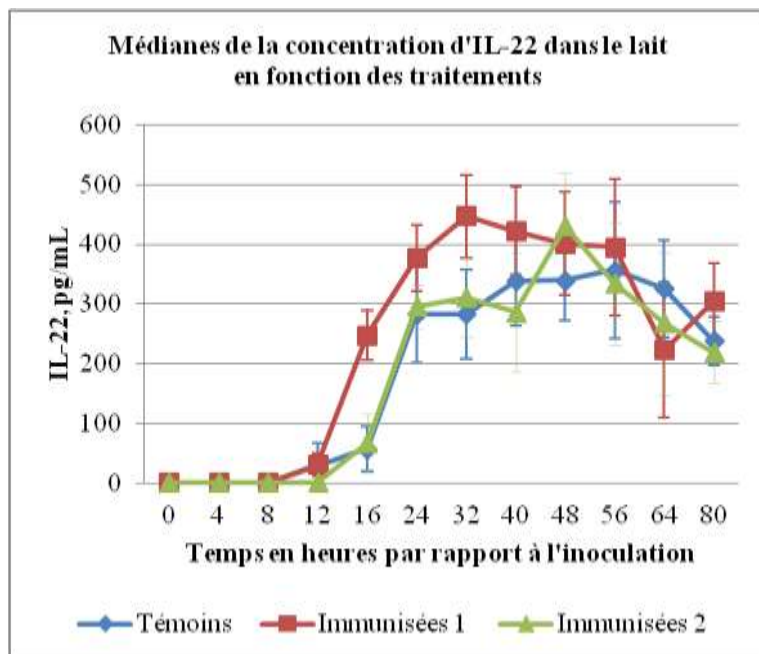


Figure 18 : Évolution des concentrations médianes d'IL-22 dans le lait en fonction du traitement

Le traitement a influencé les valeurs de la concentration d'interleukine IL-22 et de bactéries dans le lait, et le comportement d'activités anormales (respectivement, p-value de $6,5 \cdot 10^{-5}$, 0,03 et 0,02).

La concentration d'IL-22 est globalement plus élevée pour les vaches immunisées du groupe 1. De plus, le nadir n'a pas lieu au même moment : le

groupe immunisés 1 l'atteint à T32 avec 447 ± 70 pg/mL, le groupe d'immunisés 2 à T48 avec 430 ± 91 pg/mL et à T56 pour les témoins avec 357 ± 114 pg/mL (Figure 18).

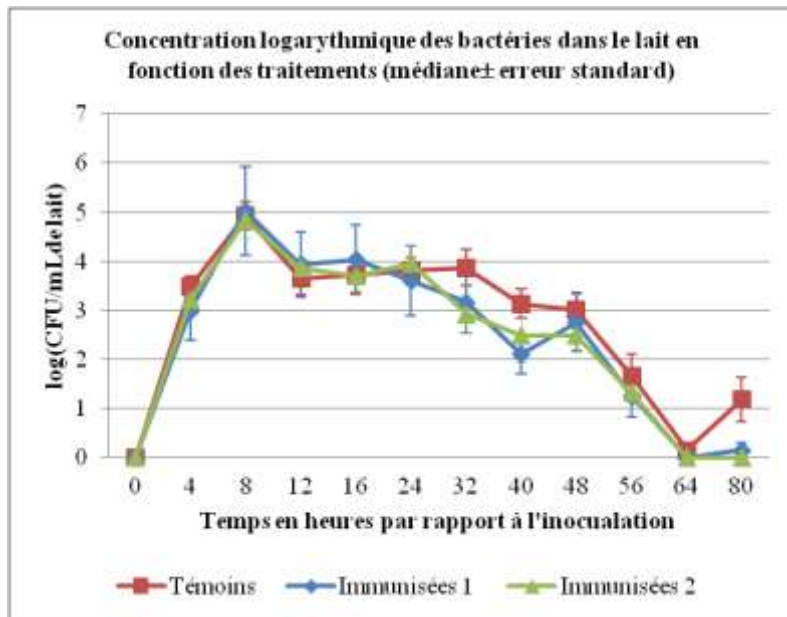


Figure 19 : Évolution des concentrations logarithmiques des bactéries dans le lait en fonction du traitement

Les vaches immunisées ont une guérison bactériologique plus rapide que les vaches témoins (Figure 19). De plus, 40 heures après l'inoculation les vaches témoins ont une concentration bactérienne significativement plus élevée que vaches du 1^{er} groupe d'immunisés (respectivement $13,8 \pm 95,5$ et $1,4 \pm 0,7 \cdot 10^3$ cfu/mL de lait)

Les vaches immunisées ont des activités anormales plus fréquemment que les vaches témoins (respectivement 5 et 2 fois sur toute la durée de l'observation).

- Effet du temps :

Le temps a influencé toutes les variables cliniques, celles issues du lait et du sang et le comportement de couchage avec des valeurs de p inférieures à 10^{-9} . Il influence aussi l'axe 1 et 2 du QBA (respectivement, p-value de $7,8 \cdot 10^{-9}$ et de $2,2 \cdot 10^{-2}$), l'attitude générale des vaches, la position des oreilles et de la queue ainsi que l'apparition de signes cliniques avec des valeurs de p inférieures à 0,03.

- Effet de l'interaction temps-traitement :

L'interaction entre le temps et le traitement a influencé les données de la concentration de l'IFN- γ dans le lait (p-value de $9,3 \cdot 10^{-16}$), les concentrations sanguines des leucocytes, des granulocytes neutrophiles et des monocytes (respectivement, p-value de $4,4 \cdot 10^{-3}$, $3,0 \cdot 10^{-3}$ et $1,7 \cdot 10^{-5}$), du score clinique de la mamelle et de la température ruminale (respectivement, p-value de $6,4 \cdot 10^{-6}$ et $1,6 \cdot 10^{-18}$).

III. Discussion générale

Nous avons pu discriminer différentes phases dans l'évolution de la mammite due à *Escherichia coli* chez la vache laitière, chacune de ces phases montrant une modification globale de l'état de l'animal, identifiable grâce à des évaluations cliniques, biologiques et comportementales.

Dans les cas de mammites spontanées, la diversité des agents étiologiques a comme conséquence une assez grande diversité d'expression clinique, des conséquences physiologiques multiples et des réponses immunitaires associées à ces infections de nature variable, et une évolution difficile à prévoir, le début de l'infection n'étant pas identifiable avec précision. La caractérisation clinique est par conséquent difficile en raison de ces contraintes, l'identification de la cause infectieuse étant en outre rarement possible sur la base de l'observation clinique seule (Leslie, Petersson-Wolfe 2012; Akers, Nickerson 2011). Dans notre étude, la mammite a été provoquée de façon expérimentale par injection d'un inoculum bactérien de taille connue dans la citerne du trayon. Les modalités d'apparition de l'infection mammaire n'étaient donc pas identiques à celles survenant dans les élevages, même si les conditions d'entretien des vaches étaient relativement proches.

L'étude de ces mammites avait pour but d'accroître les connaissances spécifiques sur les mécanismes immunitaires, les réponses biologiques et comportementales à cette infection mammaire par la bactérie *Escherichia coli*. Dans notre expérimentation, les vaches étaient toutes des vaches primipares au même stade physiologique, c'est-à-dire dans le premier trimestre de la lactation, à un moment où l'incidence et la sévérité des mammites sont grandes. Ici, la sévérité des mammites à *Escherichia coli* variait beaucoup entre les animaux, car l'immunisation de deux tiers des vaches (12/18 vaches) dans notre expérimentation a créé de la variabilité clinique, et a limité la standardisation des réponses qui peut être liée au dessin expérimental (Burvenich et al. 2003).

Les données présentées dans la publication d'Alice De Boyer des Roches et al. (2017) (Annexes F) sont issues de la même expérimentation que notre étude. Cependant, cette publication porte seulement sur les données de certaines variables des vaches du groupe témoin qui n'avaient pas été immunisées préalablement à l'infection. Ce groupe de vaches avait reçu deux injections d'adjuvant à 45 jours d'intervalle, la dernière injection étant située

1 mois avant la mise bas, soit plus de deux mois avant l'inoculation, et dont on peut douter qu'elle a modifié la réponse à l'infection mammaire.

Classiquement, l'étude d'une maladie passe par la collecte d'informations cliniques de façon qualitative ou quantitative avec l'aide de scores cliniques (Theurer, Amrine, White 2013).

Dans notre étude, le score clinique est basé sur des critères locaux (signes d'inflammation de la mamelle et aspect du lait), mais aussi des signes systémiques et des symptômes (température rectale, déshydratation, fréquence ruminale et les signes traduisant l'abattement), ces critères ayant été précédemment définis et assez communément utilisés dans les études sur les mammites à *Escherichia coli* chez la vache (Wenz, Garry, Barrington 2006; Suojala, Kaartinen, Pyörälä 2013; Fogsgaard et al. 2012; Fitzpatrick 2011). Les signes d'inflammation de la mamelle et la température rectale sont évalués dans de nombreuses publications étudiant les conséquences biologiques et comportementales des mammites (Kester, Sorter, Hogan 2015; Yeiser 2011; Sepúlveda-Varas et al. 2016; Rasmussen et al. 2011). Comme dans notre étude, Zimov et al. (2011), Fogsgaard et al. (2012, 2015) avaient eux aussi mesuré l'impact de la mammite au niveau systémique. Certaines publications ne mesurent qu'un seul signe clinique comme la fréquence des contractions ruminales (Stangaferro et al. 2016; Fitzpatrick 2011) ou la fréquence cardiaque (Hopster, van der Werf, Blokhuis 1998), même si ces fréquences semblent assez mal corrélées à la sévérité de la mammite (Wenz, Garry, Barrington 2006).

La CCS est un élément-clef du diagnostic et du suivi d'une mammite (Medrano-Galarza et al. 2012; Cyples et al. 2012; Peters, Silveira, Fischer 2015; De Boyer des Roches et al. 2017), de même que la concentration bactérienne dans le lait (Stangaferro et al. 2016; Kester, Sorter, Hogan 2015; Yeiser 2011). Elles ont cependant le grand désavantage de ne pas pouvoir être appréciée directement et sans équipement ou réactif de laboratoire. Même s'il n'est pas utilisé dans toutes les études (Fitzpatrick 2011), la transformation de la CCS en SCS permet d'avoir une distribution normale des mesures, comme cela a été montré à l'échelle d'une population bovine (Ali, Shook 1980) et c'est la valeur qui doit être utilisée au moment de l'analyse statistique.

La production de lait est aussi un critère qui permet d'évaluer la sévérité de la mammite (Zimov et al. 2011; Hopster, van der Werf, Blokhuis 1998; Fogsgaard et al. 2012; Fogsgaard, Bennedsgaard, Herskin 2015). Dans notre essai, elle a été quantifiée à l'échelle de l'animal (une évaluation plus fine devrait être réalisée à l'échelle du quartier) mais, étant enregistrée quotidiennement, nous n'avons pas pu l'intégrer dans l'analyse multiparamétrique du fait de la non-concordance des dates de mesure et celles des autres paramètres.

Afin de détecter la mammite ou de suivre l'évolution de l'aspect, de la composition cellulaire ou biochimique du lait, d'autres critères peuvent être utilisés : le California Mastitis Test (Fogsgaard, Bennedsgaard, Herskin 2015), la conductivité (Hopster, van der Werf, Blokhuis 1998; Siivonen et al. 2011) et les teneurs protéique, butyrique ou ionique du lait (Hopster, van der Werf, Blokhuis 1998; Kester, Sorter, Hogan 2015).

Pour suivre l'évolution de l'inflammation au niveau systémique, comme dans d'autres expérimentations, nous avons mesuré la concentration de protéines de la phase aiguë telles que l'haptoglobine et la SAA) dans le plasma (Zimov et al. 2011; Stangaferro et al. 2016) et dénombré les différents types de leucocytes (Hopster, van der Werf, Blokhuis 1998; Rasmussen et al. 2011) dans le sang. Le cortisol est un indicateur de stress, et qui n'est pas spécifique de la douleur ; il est d'ailleurs utilisé dans diverses situations morbides aussi diverses que l'étude des boiteries, des castrations et des mammites (Coetzee et al. 2013, 2017; Leslie, Petersson-Wolfe 2012; Hopster, van der Werf, Blokhuis 1998).

Certains dosages n'ont jamais été décrits dans les publications précédentes sur la même question. Ainsi, il est rare de connaître la composition cellulaire du lait en neutrophiles, lymphocytes, la concentration des cytokines ou celle de la SAA dans le lait qui permettent pourtant de caractériser assez spécifiquement la réponse immunitaire et/ou inflammatoire (Bannerman et al. 2004; Rainard 2015). La mesure de l'oxydation du glutathion, et notamment celle du rapport glutathion oxydé/réduit, est utilisée pour évaluer le stress oxydatif, survenant lors de l'inflammation mammaire (Mavangira, Sordillo 2017)

Les mammites cliniques sévères, comme celles dues à *Escherichia coli*, et aux endotoxines que libère la bactérie, sont souvent considérés par les éleveurs et les vétérinaires quel que soit le pays comme très douloureuses, à une échelle de douleur équivalente à celle

ressentie par les vaches lors de dystocie ou de la fracture d'un membre (Leslie, Petersson-Wolfe 2012). Depuis une dizaine d'années, le nombre d'études sur la douleur des vaches avec une mammite augmente, avec à l'heure actuelle une quinzaine de publications environ sur ce sujet (I.3.3.3, p 37).

Comme la plupart des publications traitant de la douleur liée à une mammite, notre étude a évalué l'activité de couchage des animaux grâce à l'utilisation d'accéléromètres (Yeiser 2011; De Boyer des Roches et al. 2017; Fogsgaard, Bennedsgaard, Herskin 2015; Medrano-Galarza et al. 2012; Cyples et al. 2012); d'autres ont utilisé l'enregistrement vidéo et l'analyse du comportement par un ou plusieurs observateurs (Fogsgaard et al. 2012; Siivonen et al. 2011; Zimov et al. 2011; Hopster, van der Werf, Blokhuis 1998). Les données que nous avons collectées concernent des pas de temps relativement courts (de 1 à 6h), afin d'évaluer ce comportement en l'absence d'intervention humaine qui est susceptible de déranger les animaux et de modifier leur comportement et leur attitude (Fogsgaard et al. 2012; De Boyer des Roches et al. 2017; Millman 2013). Le comportement de couchage à l'aide d'un accéléromètre est souvent évalué dans des publications étudiant les conséquences cliniques d'une pneumonie, d'une castration ou d'un écornage, avec ou sans analgésie, de boiteries, à la suite d'un transport, et dans l'évaluation du rythme circadien lors de la séparation mère-veau (Theurer, Amrine, White 2013; Coetzee et al. 2013, 2017; Shearer et al. 2013; Veissier, Le Neindre, Trillat 1989).

D'autres critères, sont eux aussi informatifs lors de mammite : ils quantifient l'activité des animaux en mesurant le nombre de pas à l'aide de podomètres (Yeiser 2011; Kester, Sorter, Hogan 2015; Medrano-Galarza et al. 2012; Stangaferro et al. 2016), le comportement alimentaire par des enregistrements vidéos ou l'utilisation d'auges individuelles électroniques permettant de connaître la quantité de ration ingérée sur la période analysée (Fogsgaard et al. 2012; Fogsgaard, Bennedsgaard, Herskin 2015; Yeiser 2011; Sepúlveda-Varas et al. 2016; Siivonen et al. 2011; Zimov et al. 2011; Stangaferro et al. 2016). Dans notre étude, nous avons évalué le comportement alimentaire au moment de l'évaluation comportementale en stabulation, par l'absence ou la présence d'arumination ou d'anorexie et cliniquement par la diminution de la fréquence des contractions ruminales ou le défaut de remplissage ruminal.

Contrairement à Medrano-Galarza et al. (2012); Fogsgaard, Bennedsgaard, Herskin et al. (2015) qui ont utilisé des enregistrements vidéos, nous avons fait une observation directe des animaux pendant la traite. L'évaluation clinique et la réalisation d'échographies mammaires pendant la traite, avant et/ou après le décrochage de la griffe, rendaient difficile le positionnement de la caméra afin qu'elle enregistre correctement le comportement des animaux. Pour ces mêmes raisons, le temps de séjour en salle de traite est différent selon les dates. Dans notre étude, le temps d'observation correspond à la durée où la vache est effectivement en train d'être traite, alors que dans l'étude de Medrano-Galarza et al. (2012), il s'étend du moment où la vache entre en salle de traite jusqu'au post-trempage du dernier trayon. Pour Fogsgaard, Bennedsgaard, Herskin (2015), il correspond au temps passé dans la cage du robot de traite.

L'observation du comportement durant la traite est aussi utilisée pour l'étude du tempérament des animaux en lien avec leur production laitière (Hedlund, Løvlie 2015) et de la relation homme-animal. Elles étudient la relation homme-animal en fonction de la douceur des manipulations, de l'habituation précoce des primipares au contact de l'homme (Ivemeyer, Pisani, Knierim 2015) et dans le cadre d'un nouvel environnement de traite (Rushen et al. 2001). Toutes ces publications évaluent la fréquence des pas et des coups de pied pendant la traite, avec des définitions relativement similaires. Munksgaard et al. (2001) ont évalué en plus la fréquence des mouvements de la queue et, comme dans notre étude, Rushen et al. (2001) ont mesuré la fréquence des défécations, des mictions et des vocalisations.

Les données sur l'attitude et la posture des animaux lors de mammites sont hétérogènes entre les études. Certains comportements évalués sont semblables à ceux de notre étude : position de la tête durant le couchage, inactivité, appui sur une surface (Fogsgaard et al. 2012), énophtalmie (Fogsgaard, Bennedsgaard, Herskin 2015), piétinements (Rasmussen et al. 2011; Siivonen et al. 2011), trémulations musculaires, position de la queue (Rasmussen et al. 2011), position des membres (Medrano-Galarza et al. 2012), vocalisation (Hopster, van der Werf, Blokhuis 1998). Comme dans les études de Fogsgaard et al. (2012), Rasmussen et al. (2011) et Siivonen et al. (2011), l'évaluation du léchage avait été envisagée mais suite à une erreur technique, ces données n'ont pas été enregistrées. Ces études évaluent aussi l'intérêt pour la mamelle (Fogsgaard et al. 2012), les comportements sociaux (Sepúlveda-Varas et al. 2016),

les comportements d'élimination (miction et défécation) (Hopster, van der Werf, Blokhuis 1998).

Sur des animaux avec différentes maladies courantes en élevage, Gleerup et al. (2015) évalue l'attention portée à l'environnement, la position de la tête et des oreilles, les expressions faciales, la présence de tremblements musculaires, d'une érection pileuse sur la ligne de dos, de report du poids d'un côté du corps, de la vocalisation ou de l'émission de plaintes et du bruxisme. Dans différents contextes chirurgicaux (biopsie du foie, castration), la position de couchage anormale (décubitus latéral ou décubitus sternal avec membres étendus), l'attention envers l'environnement et le port de la tête sont analysés (de Oliveira et al. 2014; Prunier et al. 2013; Mølgaard et al. 2012). Lors de manipulations douloureuses (caudectomie, castration, ébourgeonnage, marquage au fer), les vocalisations ne sont pas toujours spécifiques de la douleur notamment chez le veau, contrairement aux comportements de léchage (Prunier et al. 2013; Gleerup et al. 2015; Mølgaard et al. 2012). Les postures anormales en station debout (report de poids, piétinement, modification des appuis) ont été étudiés lors de castration (Prunier et al. 2013; de Oliveira et al. 2014) et surtout de boiteries, avec de plus en plus l'utilisation d'échelle visuelle analogique et attribution d'un score pour quantifier la douleur (Shearer et al. 2013; Coetzee et al. 2017; Fortineau, Guattéo, Holopherne-Doran 2013).

Le Qualitative Behaviour Assessment (QBA) utilisé dans notre étude est une méthode basée sur la compréhension et l'interprétation du langage corporel d'un animal par un observateur averti, permettant d'accéder à l'état émotionnel de l'animal (Wemelsfelder 2007). Cette méthode est répétable, relativement fiable et corrélée au comportement physique des animaux par le biais d'un éthogramme classique chez les bovins (Rousing, Wemelsfelder 2006; de Vries et al. 2011; Ebinghaus et al. 2016).

De nombreuses publications l'utilisent au sein du protocole du Welfare Quality® afin d'évaluer le bien-être animal avant ou après une période sans accès au pâturage (de Graaf, Ampe, Tuytens 2017), ou de séjour dans une stabulation entravée (Vučemilo et al. 2012) par exemple. Il peut aussi être utilisé dans d'autres espèces comme le bison (De Rosa et al. 2015). Le QBA est aussi utilisé pour évaluer la relation homme-bovin (Ellingsen et al. 2014; Ebinghaus et al. 2016), les conditions de logement des bovins (Góis et al. 2016), le stress

durant le transport (Stockman et al. 2011) et le comportement social (Rousing, Wemelsfelder 2006).

Tout comme les études précédentes, les descripteurs du QBA sont synthétisés par une analyse à composantes principales, conformément au protocole du Welfare Quality® (Welfare Quality 2009). Dans ce protocole, les signes de maladie et le QBA sont regroupés, mais aucune publication ne traitait de l'état émotionnel des animaux dans le cadre d'une maladie induite expérimentalement.

Le comportement des animaux est perturbé par un changement de leur environnement de vie. Aussi, afin que les vaches s'habituent à notre présence, nous n'avons pas pris en compte les premières observations, comme recommandé par Theurer, Amrine, White (2013). Le recours à des équipements comme les accéléromètres et l'enregistrement vidéo permet de s'affranchir en partie de ce problème et d'analyser *a posteriori* le comportement de l'animal en l'absence de l'homme. Les vaches s'habituent rapidement au port des accéléromètres, en 24h environ (Gibbons et al. 2012). Les observations directes du comportement sont rares en cas de mammites (Peters, Silveira, Fischer 2015; Rasmussen et al. 2011; De Boyer des Roches et al. 2017), potentiellement parce que les enregistrements vidéos ne permettent pas la visualisation de certains comportements, et parce que l'identification des animaux peut être difficile (Millman 2013). Elles sont généralement faites lors de l'étude de l'attitude et de la posture des animaux (Gleerup et al. 2015; de Oliveira et al. 2014; Coetzee 2013; Shearer et al. 2013; Mølgaard et al. 2012). Nous avons pris en compte l'influence du rythme circadien sur le comportement de couchage (Veissier, Le Neindre, Trillat 1989) et son potentiel effet sur le comportement lors de la traite.

Dans les expérimentations sur les mammites provoquées par l'inoculation de germes vivants (contrairement à l'injection d'un phlogogène comme le lipopolysaccharide), l'échelle de temps classiquement utilisée est la journée (Fogsgaard et al. 2012, 2015; Kester, Sorter, Hogan 2015; Medrano-Galarza et al. 2012; Yeiser 2011). La définition de phases cliniques, et surtout biologiques, au cours de l'évolution de la mammite avec une échelle de temps infra-journalière est assez innovante (De Boyer des Roches et al. 2017). Ainsi l'analyse des données réalisée par Alice De Boyer des Roches et al. (2017), a permis l'identification de

phases de la mammite par la même méthode, mais avec des marqueurs de l'inflammation et de la douleur : l'évaluation comportementale en stabulation, le comportement de couchage, la température ruminale, la concentration sanguine de l'haptoglobine, de la SAA, du cortisol et du glutathion. De plus, la comparaison des périodes a été réalisée avec des tests non paramétriques (Friedman and post Hoc Dun). Les variables utilisées dans les modèles d'analyse factorielle discriminante permettent de différencier la phase avant l'inoculation et des phases situées après l'inoculation. Les variables non incluses dans le modèle ont soit une variation trop faible en fonction des états pour être prises en compte, soit elles sont fortement corrélées à une autre variable déjà présentes, et donc non informatives en elles-mêmes. Par conséquent, cela signifie que les variables non incluses dans le modèle peuvent tout de même avoir des moyennes significativement différentes entre la phase pré-inoculation et les phases suivantes. Cette analyse ne prend pas en compte l'effet du temps et du traitement immunologique. Aussi, pour compléter notre étude nous avons réalisé des analyses de variance pour connaître les effets de ces autres facteurs.

Un des objectifs de cet essai était de mieux comprendre les mécanismes immunitaires lors d'une infection à *Escherichia coli* et de connaître les résultats de différents protocoles d'immunisation innovants sur l'évolution et l'issue des infections mammaires. La publication de Herry et al. (2017) décrit les résultats de ces infections et explore une partie des mécanismes mobilisés, en exploitant les données cliniques, biologiques dont celles des réponses inflammatoire et immunitaire (cytokines, leucocytes du sang et du lait, protéines inflammatoires, bactériologie). Par conséquent, nous nous contenterons d'évoquer certains de ces facteurs qui ont été considérés comme des marqueurs de la mammite et qui permettaient de distinguer les différentes phases de la mammite ; nous discuterons plus en détails les marqueurs relatifs à la douleur.

La détermination des phases de la mammite est identique à celle déjà publiée pour la même étude, même si l'utilisation des données est légèrement différente (issues d'un plus faible nombre de variables sur les vaches témoins). Comme pour notre étude, la phase pré-clinique (soit 8 heures après inoculation) est la phase qui se distingue le moins bien de la phase pré-inoculation, alors que la phase d'état et la phase de rémission se distinguent parfaitement de celle-ci.

Au vu des résultats de ces analyses, une mammité à *Escherichia coli* est principalement caractérisée par les signes mammaires, l'augmentation du SCS et la diminution de la concentration sanguine en lymphocytes T. Parallèlement, les symptômes mammaires et la CCS, appartiennent aux données les plus souvent prises en compte lors de l'étude des mammites, provoquées par *Escherichia coli* (Fogsgaard et al. 2012; Yeiser 2011; Rasmussen et al. 2011), par *Streptococcus uberis* (Kester, Sorter, Hogan 2015), ou bien par l'injection de LPS d'*Escherichia coli* (Zimov et al. 2011; Cycles et al. 2012; Siivonen et al. 2011), ou celles apparues à la suite d'infections spontanées non caractérisées du point de vue bactériologique (Peters, Silveira, Fischer 2015; Fogsgaard, Bennedsgaard, Herskin 2015; Medrano-Galarza et al. 2012).

Durant la phase pré-clinique, la mammité est caractérisée par un faible nombre d'indicateurs. L'afflux de leucocytes dans la mamelle est illustré par la diminution de la concentration sanguine en lymphocytes T et surtout par l'augmentation de la CCS (ou du SCS) (Rainard 2015), l'augmentation de la CCS chez les animaux non immunisés n'est cependant pas suffisante pour être significativement différente de celle de la phase précédente (De Boyer des Roches et al. 2017).

De plus, certains signes de douleur sont légèrement modifiés en relation avec l'apparition des symptômes mammaires. Que cela soit pour les vaches non immunisées (témoins) ou pour l'ensemble du groupe, la fréquence des changements de position diminue (De Boyer des Roches et al. 2017). Cependant, Fogsgaard, Bennedsgaard, Herskin (2015) montre une dégradation de la santé mammaire associée à une fréquence quotidienne de changements de position significativement supérieure à celle des vaches saines, alors que Yeiser (2011); Cycles et al. (2012); Siivonen et al. (2011) n'ont pas montré de différence significative pour ce critère. La différence avec notre étude est l'échelle de temps considérée qui est en jours dans ces dernières publications. De plus, les mammites dans l'étude de Fogsgaard, Bennedsgaard, Herskin (2015) sont des mammites spontanées alors que dans les autres études, elles sont induites avec *Escherichia coli* (Yeiser 2011) ou par injection de LPS (Cycles et al. 2012; Siivonen et al. 2011).

Dans notre étude, le taux sanguin de cortisol est significativement augmenté alors que pour les vaches non immunisées, il existe seulement une tendance à l'augmentation ($p < 0,06$). De

plus, les vaches témoins ont une diminution significative de l'état clinique général ($p < 0,05$), alors que pour le reste des vaches, il existe seulement une tendance ($p = 0,06$) sous-tendant le fait que la sévérité de la mammite n'est pas la même entre tous les animaux, et qu'elle diffère entre les groupes témoin et immunisé (De Boyer des Roches et al. 2017). Cependant les analyses de variance montrent que seul le temps influence ces critères. La concentration sanguine de cortisol est augmentée lors de mammites provoquées par l'injection de LPS après 8 heures environ (Hopster, van der Werf, Blokhuis 1998; Zimov et al. 2011). Dans le même temps, Hopster, van der Werf, Blokhuis (1998) rapporte une diminution de la concentration sanguine des lymphocytes, et Zimov et al. (2011) une altération clinique de la mamelle.

Avant l'inoculation, deux vaches avaient la queue légèrement plaquée contre les cuisses (signe suggérant une douleur postérieure) alors qu'aucune d'entre elles ne présentait ce signe durant la phase pré-clinique. Dans les 4,5 h après une biopsie du foie, les vaches gardent leur queue plaquée 63 ± 43 secondes, contrairement aux vaches témoins ($p = 0,016$) (Mølgaard et al. 2012). Lors de mammites induites par inoculation d'*Escherichia coli*, la fréquence ou le score des vaches plaquant leur queue sur la mamelle ne sont pas significativement différents de ceux de la période précédant l'inoculation (De Boyer des Roches et al. 2017; Rasmussen et al. 2011). Sur les 4,5 heures après la biopsie, Mølgaard et al. (2012) observe les vaches pendant 1h25 par tranche de 5 min, alors que Rasmussen les a observées moins de 3 minutes, une fois par jour. Dans la présente étude et celle rapportée par De Boyer des Roches et al. (2017), les vaches étaient observées pendant moins de 5 minutes, 1 à 4 fois par jour. La position de la queue n'est probablement pas un indicateur précoce de mammites. Cependant, il est peut-être nécessaire de rechercher ce comportement sur des périodes de temps prolongées, voire en l'absence de la présence humaine.

La phase pré-clinique nous indique l'apparition de signes considérés comme associés à la douleur. Cependant la construction du modèle, sa solidité imparfaite, et les faibles différences significatives avec l'analyse des animaux témoins montre qu'il est difficile de définir des indicateurs solides de la douleur et de la présence d'une mammite dans les 8 heures suivant le début de l'infection. Afin de s'assurer que la modification de la fréquence des changements de position est un bon indicateur, l'étude en phases avec le moins possible d'interventions humaines serait nécessaire.

À la phase d'état (12h à 24h après l'inoculation), les marqueurs de la mammites sont nettement plus nombreux et en partie différents de ceux de la phase pré-clinique. On observe des variations marquées des marqueurs de l'immunité et de l'inflammation, en adéquation avec les résultats d'Herry et al. (2017) qui indique pour la plupart de fortes variations et/ou des valeurs extrêmes (TNF α , IFN- γ pour les vaches immunisés, concentration cellulaire sanguine, CCS, neutrophiles et lymphocytes dans le lait, température ruminale et score clinique de la mamelle). Il note seulement un début d'augmentation pour les concentrations en IL-22 dans le lait et en SAA dans le sang 12h après l'inoculation, et en haptoglobine 16 heures après l'inoculation.

Mise à part la dégradation du score clinique de la mamelle, les marqueurs de la douleur sont différents de ceux de la phase pré-clinique. Un stress détériore l'état émotionnel des animaux, comme lors d'un transport où les animaux non habitués sont nerveux, agités et stressés contrairement aux bovins habitués qui sont neutres ou calmes et relâchés (Stockman et al. 2011). Ellingsen et al. (2014) ont aussi montré que des vaches laitières avec une humeur négative (stressée, craintive, effrayée, nerveuse) sont plus fréquemment observées dans les troupeaux où l'éleveur est dominant/agressif ou nerveux/instable. De la même manière, suite à la douleur, l'humeur de l'ensemble des vaches ou des uniquement des témoins est devenu négative (axe 1 du QBA) durant cette phase d'état (De Boyer des Roches et al., en préparation).

Lors de mammites apparues spontanément, la fréquence des coups de pied durant la traite augmente de deux jours avant le diagnostic jusqu'à 10 jours après (Fogsgaard, Bennedsgaard, Herskin 2015), soit seulement le jour du diagnostic (Medrano-Galarza et al. 2012). Les augmentations sont du même ordre : + 0,21/min, + 1,7/traites (Fogsgaard, Bennedsgaard, Herskin 2015), + 0,1/min (Medrano-Galarza et al. 2012) que celle mesurée ici. De surcroît, dans d'autres contextes considérés stressants comme un changement du lieu de traite ou la présence d'un individu inconnu devant la vache pendant la traite, la fréquence des coups de pied diminue (Rushen et al. 2001) ou la différence n'est pas significative, malgré un taux de cortisol augmenté (Munksgaard et al. 2001).

La dégradation de l'attitude générale (vaches moins attentives avec la tête basse), l'apparition ou l'augmentation de l'intensité des signes cliniques observés, est visible indifféremment dans tout le groupe et chez les bovins non immunisés, alors que le port des oreilles basses n'est

visible qu'en considérant l'ensemble des animaux. Alice De Boyer des Roches et al. (2017) rapporte aussi des concentrations sanguines en cortisol et en SAA différentes de celles de l'état initial. D'après l'analyse de variance, le port des oreilles et le cortisol sont seulement influencés par le temps ($p < 0,03$). La différence de résultat peut s'expliquer par la différence d'effectifs entre les deux études pour le port des oreilles, et par une corrélation forte du cortisol par une autre variable présente dans le modèle.

Dans l'étude de Glerup et al. (2015), chez les bovins malades, les fréquences du port bas des oreilles et/ou du hérissément du poil sur la ligne de dos (pilo-érection) sont significativement différentes de ces fréquences chez les bovins sains, même si la pilo-érection est observable peu fréquemment car elle évolue rapidement. Dans notre expérimentation, ce signe clinique inclus dans la grille comportementale que nous avons utilisée, ainsi que la trémulation des muscles, ont été observés respectivement 8 et 5 fois durant toute la durée d'observation. Dans leurs études, Glerup et al. (2015) et Rasmussen et al. (2011) n'ont jamais ou rarement observé ce signe ; ils l'ont donc exclu de leur analyse. Le signe clinique le plus fréquemment noté dans notre grille comportementale est l'énophtalmie (40 fois sur toute la durée d'observation). Dans l'étude de Fogsgaard, Bennedsgaard, Herskin (2015) (mammites spontanées), l'énophtalmie est incluse dans le score clinique car c'est un indicateur de l'intensité de la déshydratation et de la douleur (Institut de l'Élevage 2008). Lors de mammites, il n'y a pas d'étude montrant une dégradation de l'attitude générale dans le sens de notre étude. Cependant Fogsgaard et al. (2012) et Kester, Sorter, Hogan (2015) montrent une augmentation du temps d'inactivité après l'inoculation mammaire. La sensation douloureuse lors de castration ou de maladie diminue la vigilance des bovins envers l'environnement et modifie le port de tête (Glerup et al. 2015; de Oliveira et al. 2014).

Durant la phase de rémission, le nombre et le type d'indicateurs sont relativement similaires à ceux de la phase d'état. Les critères cliniques, certains critères immunologiques et inflammatoires (lymphocytes B et T dont les CD8, haptoglobine et SAA sanguines, IL-22, TNF α , et cellules du lait) sont identiques. On note l'augmentation de la proportion de neutrophiles dans le sang et la ré-apparition du cortisol comme indicateur de la phase de rémission.

Pour les vaches non immunisées, cette phase est seulement caractérisée par des concentrations sanguines élevées en haptoglobine, en SAA et un rapport glutathion réduit/oxydé augmenté. Autant dans la phase aiguë de la mammites (phase pré-clinique et d'état dans notre étude), les indicateurs significativement différents entre les groupes (immunisé/non-immunisé) sont peu fréquents, autant de 32 h à 80 h après l'inoculation (phase de rémission), Herry et al. (2017) ont observé de nombreuses différences significatives entre les vaches immunisées et celles qui ne l'étaient pas. La température ruminale et le score clinique mammaire sont affectés par le Temps et il existe une interaction statistique Temps*Traitement, contrairement aux indicateurs comportementaux de cette phase, qui ne sont influencés que par le Temps. Le faible effectif, des variables différentes dans l'étude d'Alice De Boyer des Roches et al. (2017), et les variations entre groupes pendant cette phase semblent expliquer les différences de résultats avec notre étude.

Dans notre essai, les indicateurs comportementaux restent en faveur de l'apparition de la douleur : l'état émotionnel des vaches est dégradé, elles sont moins attentives avec la tête et les oreilles basses, des signes cliniques sont observables, elles lèvent plus souvent le pied durant la traite et elles passent plus de temps couchées. Cependant, entre la phase initiale et celle de rémission, les différences des indicateurs communs aux phases d'état et de rémission sont moins marquées qu'entre la phase initiale et celle d'état (Tableau 10)

Tableau 10 : Comparaison des variables comportementales indicatrices dans les phases d'état et de rémission

Variables	Moyenne ± Erreur standard			
	Pré-inoculation	Phase d'état	Rémission	
QBA axe 1	2,59±0,23	-1,34±0,30	0,24±0,37	
Evolution des coups de pied à la traite	0	0,21±0,08	0,10±0,04	/min
Attitude générale	18,06±4,87	46,76±5,22	47,78±4,58	%
Position des oreilles	13,89±5,43	39,89±8,20	46,67±7,23	%
Signes cliniques	0,69±0,69	9,26±2,32	9,72±2,37	%

Le temps passé couché est augmenté. L'étude de Fogsgaard et al. (2012) très similaire à la nôtre (inoculation mammaire d'*Escherichia coli*, et les vaches sont leurs propres témoins) montre une augmentation du temps passé en décubitus le deuxième jour après l'inoculation. Cependant dans de nombreuses autres études, traitant de mammites d'étiologie différente

(induites par *Escherichia coli*, par injection de LPS ou apparues spontanément), les vaches passent moins de temps couchées dans les deux jours après l'inoculation ou après le diagnostic, soit par comparaison à elles-mêmes (Siivonen et al. 2011; Cycles et al. 2012) soit par rapport à des vaches saines (Yeiser 2011; Fogsgaard, Bennedsgaard, Herskin 2015; Medrano-Galarza et al. 2012). Mis à part Fogsgaard et al. (2012), ces publications n'indiquent pas le temps de manipulation des animaux et si certains ont été écartés de l'analyse. Durant notre étude, les vaches ont été longuement manipulées, en particulier durant les deux premiers jours de l'expérimentation, si l'on ne retire pas les moments où elles étaient dérangées, les vaches passaient 37,1% de leur temps couchées le jour de l'inoculation contre 40,9% la veille.

Juste après une castration, les bovins passent moins de temps couchés et une autre étude a montré qu'ils passaient plus de temps en décubitus dans les cinq jours suivant l'intervention chirurgicale (Theurer, Amrine, White 2013; Coetzee 2013). Dans le cas d'une affection respiratoire induite par *Mannheimia haemolytica*, soit les vaches passent plus de temps couchées par rapport aux vaches saines, soit la différence n'est pas significative par rapport à la période avant l'inoculation. Theurer, Amrine, White (2013) soulignent que ces résultats dissemblables peuvent être dus à la durée totale d'enregistrement, au possible changement de comportement dans le temps, ou à une intensité de la douleur différente suivant les études. Lors de boiteries induites ou de changement d'environnement, les bovins restent couchés plus longtemps (Coetzee et al. 2017; Shearer et al. 2013), d'autant plus si un stress supplémentaire apparaît, comme la séparation mère-veau (Veissier, Le Neindre, Trillat 1989).

De plus, le changement d'environnement et la séparation mère-veau modifie le cycle circadien (Veissier, Le Neindre, Trillat 1989). La mammite pourrait avoir le même effet, l'évolution du temps de couchage ayant une évolution à tendance sinusoïdale qui est atténuée. La modification du temps de couchage est, au minimum, un indicateur de stress. L'étude de la mammite avec une intervention humaine minimale, et une échelle de temps basée sur l'évolution de la mammite, où les contrôles seraient des animaux sains et les animaux malades avant inoculation, permettrait d'appréhender les effets de la manipulation et les éventuels changements de comportement durant l'évolution de la mammite.

D'après nos résultats, des critères comportementaux, dont certains avaient été inclus dans la grille comportementale, ne sont pas de bons indicateurs de mammites.

Après l'induction de la mammites, les expressions faciales sont différentes sur un nombre croissant de bovins. Dans l'étude de Glerup et al. (2015), les bovins malades ont un faciès plus tendu ou effrayé que les bovins sains. Suite à une castration ou lors de boiteries, les postures sont généralement modifiées avec par exemple des animaux en décubitus sternal avec les antérieurs étendus vers l'avant ou un report du poids d'un membre sur l'autre ou contre un appui (Prunier et al. 2013; de Oliveira et al. 2014). Cependant lors de diverses maladies ou d'une biopsie du foie, les positions de couchage ne sont pas systématiquement modifiées (Prunier et al. 2013; de Oliveira et al. 2014) et Fogsgaard et al. (2012) ne rapporte aucune différence significative pour l'appui contre un support. Même si nos résultats descriptifs indiquent une légère augmentation de la proportion d'animaux avec des postures anormales après l'inoculation, les variations entre les phases sont probablement trop faibles et ne sont pas significatives.

Au sein de l'item « activités anormales », les vocalisations, le bruxisme ou les plaintes n'ont jamais été observés. Mise à part, Hopster qui observe une fréquence de vocalisation augmentée dans les huit heures suivant l'injection de LPS, ces comportements sont rarement observés chez les bovins adultes dans ces circonstances (Mølgaard et al. 2012; Glerup et al. 2015). Indifféremment, les veaux vocalisent face au stress de la contention comme à la douleur du marquage au fer (de Oliveira et al. 2014). Ces items de la grille comportementale ne sont pas de bons indicateurs de la douleur lors d'une mammites. Afin de limiter l'effet de leurs faibles sensibilités ou spécificités, ils pourraient être regroupés.

Durant la traite, la fréquence combinée de la vocalisation, de la défécation et de la miction est augmentée pour les vaches isolées sans présence humaine (Rushen et al. 2001). Dans ce même contexte de stress, et lors de mammites, le nombre de pas augmente (Rushen et al. 2001; Fogsgaard, Bennedsgaard, Herskin 2015; Medrano-Galarza et al. 2012). Dans notre étude, la réalisation d'échographie de la mamelle a prolongé d'au moins 45 minutes, le temps de séjour en salle de traite, ajoutant un stress supplémentaire, avec comme conséquence, une augmentation du piétinement (+ 0,25 pas par minute avant inoculation).

Les mammites à *Escherichia coli* sont caractérisées par une phase aiguë avec des symptômes marqués (Leslie, Petersson-Wolfe 2012; Herry et al. 2017). Cette phase aiguë coïncide avec la phase d'état que nous avons identifiée, où toutes les catégories de variables

sont modifiées. Pendant la phase de rémission un assez grand nombre de ces modifications sont encore présentes. Plusieurs facteurs comportementaux sont de bons indicateurs de ces phases, l'humeur des vaches évaluées par le QBA, la fréquence des coups de pied pendant la traite, la vigilance des bovins envers l'environnement et le port de la tête. Les autres items de l'évaluation comportementale comme le port des oreilles et les signes cliniques sont sûrement des indicateurs corrects s'ils sont étudiés groupés, tout comme le temps passé couché et le nombre de pas pendant la traite si les interventions humaines sont limitées dans le temps. La phase pré-clinique est plus difficile à caractériser. Cependant les critères mis en évidence comme la CCS, les signes cliniques mammaires, les changements de position, la concentration en lymphocytes T et en cortisol sont probablement de bons indicateurs à étudier et qui devraient être inclus dans les études des mammites cliniques quelle que soit l'étiologie.

Conclusion générale

Les résultats de cette étude et la définition des phases que nous avons faite contribuent à améliorer les connaissances sur les mammites des vaches laitières provoquées par *E. coli*. Effectivement, l'identification des bons indicateurs permet de mieux définir la sévérité de l'affection tout en s'affranchissant des changements liés à la dynamique de l'infection. L'utilisation des phases dans d'autres contextes douloureux, pourrait élucider les divergences persistantes que nous avons relevées entre les études. Les indicateurs comportementaux comme l'humeur, la vigilance, le port de tête des bovins, l'agitation pendant la traite sont nécessaires afin d'avoir une vue globale de l'évolution de la maladie entre les animaux ou les groupes expérimentaux. Dans un contexte où le bien-être animal devient un enjeu sociétal et la prise en charge de la douleur des bovins une problématique de santé à part entière, ces indicateurs devraient contribuer à mieux évaluer la sensation de douleur lors de ces épisodes infectieux et en améliorer la prise en charge.

AGREMENT SCIENTIFIQUE

En vue de l'obtention du permis d'imprimer de la thèse de doctorat vétérinaire

Je soussigné, Gilles FOUCRAS, Enseignant-chercheur, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, directeur de thèse, certifie avoir examiné la thèse de **Alexandra LUSSERT** intitulée « **Analyse multiparamétrique et évaluation comportementale lors de mammites à *Escherichia coli* induites chez les bovins.** » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

Fait à Toulouse, le 15 septembre 2017
Professeur Gilles FOUCRAS
Enseignant chercheur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse



Vu :
La Directrice de l'Ecole Nationale
Vétérinaire de Toulouse
Isabelle CHMITELIN



Vu :
Le Président du jury :
Professeur ~~Eric OSWALD~~ **Eric OSWALD**
Chef de Service
Laboratoire de Bactériologie-Hygiène
Institut Fédératif de Biologie
330 av. de Grande Bretagne - TSA 40031
31059 TOULOUSE CEDEX 9



Vu et autorisation de l'impression :
Président de l'Université
Paul Sabatier
Monsieur Jean-Pierre VINEL

Le Président de l'Université Paul Sabatier
par délégation,
La Vice-Présidente de la CFVU



Régine ANDRE-OBRECHT

M Alexandra LUSSERT
a été admis(e) sur concours en : 2012
a obtenu son diplôme d'études fondamentales vétérinaires le : 23/06/2016
a validé son année d'approfondissement le : 04/07/2017
n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

III. Bibliographie

AKERS, R. Michael et NICKERSON, Stephen C., 2011. Mastitis and its Impact on Structure and Function in the Ruminant Mammary Gland. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*. décembre 2011. Vol. 16, n° 4, pp. 275-289. DOI 10.1007/s10911-011-9231-3.

ALI, A. K. A. et SHOOK, G. E., 1980. An Optimum Transformation for Somatic Cell Concentration in Milk¹. *Journal of Dairy Science*. 1 mars 1980. Vol. 63, n° 3, pp. 487-490. DOI 10.3168/jds.S0022-0302(80)82959-6.

BABADJI, Ramdane, 1999. L'animal et le droit : à propos de la Déclaration universelle des droits de l'animal. *Revue Juridique de l'Environnement*. 1999. Vol. 24, n° 1, pp. 9-22. DOI 10.3406/rjenv.1999.3607.

BALLOU, M. A., 2015. Growth and development symposium: inflammation: role in the etiology and pathophysiology of clinical mastitis in dairy cows. *Journal of animal science*. 2015. Vol. 90, n° 5, pp. 1466–1478.

BANNERMAN, Douglas D., PAAPE, Max J., LEE, Jai-Wei, ZHAO, Xin, HOPE, Jayne C. et RAINARD, Pascal, 2004. Escherichia coli and Staphylococcus aureus Elicit Differential Innate Immune Responses following Intramammary Infection. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 5 janvier 2004. Vol. 11, n° 3, pp. 463-472. DOI 10.1128/CDLI.11.3.463-472.2004.

BARONE, Robert, 1990. *Anatomie comparée des mammifères domestiques. 4. Splanchnologie. 2. Appareil uro-génitale, foetus et ses annexes, péritoine et topographie abdominale. 2.* éd. Paris : Vigot. ISBN 978-2-7114-9012-2. ENVV: A.03.00-BAR-A (4)

BOTREL, Marie-Anne, HAENNI, Marisa, MORIGNAT, Eric, SULPICE, Philippe, MADEC, Jean-Yves et CALAVAS, Didier, 2010. Distribution and Antimicrobial Resistance of Clinical and Subclinical Mastitis Pathogens in Dairy Cows in Rhône-Alpes, France. *Foodborne Pathogens and Disease*. mai 2010. Vol. 7, n° 5, pp. 479-487. DOI 10.1089/fpd.2009.0425.

BURGAT, Florence, 1997. *La protection de l'animal*. Paris : Presses universitaires de France. Que-sais-je ? ISBN 978-2-13-048255-0.

BURVENICH, Christian, VAN MERRIS, Valérie, MEHRZAD, Jalil, DIEZ-FRAILE, Araceli et DUCHATEAU, Luc, 2003. Severity of E. coli mastitis is mainly determined by cow factors. *Veterinary Research*. septembre 2003. Vol. 34, n° 5, pp. 521-564. DOI 10.1051/vetres:2003023.

CIWF, 2017. Trophées 2017 : un grand bond pour les lapins. *CIWF France* [en ligne]. 29 juin 2017. [Consulté le 25 août 2017]. Disponible à l'adresse : <https://www.ciwf.fr/>

COETZEE, Johann F., SHEARER, J. K., STOCK, Matthew L., KLEINHENZ, Michael D. et VAN AMSTEL, Sarel R., 2017. An Update on the Assessment and Management of Pain Associated with Lameness in Cattle. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 1 juillet 2017. Vol. 33, n° 2, pp. 389-411. DOI 10.1016/j.cvfa.2017.02.009.

COETZEE, Johann F., 2013. Assessment and Management of Pain Associated with Castration in Cattle. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 1 mars 2013. Vol. 29, n° 1, pp. 75-101. DOI 10.1016/j.cvfa.2012.11.002.

CYPLES, J. A., FITZPATRICK, C. E., LESLIE, K. E., DEVRIES, T. J., HALEY, D. B. et CHAPINAL, N., 2012. Short communication: The effects of experimentally induced *Escherichia coli* clinical mastitis on lying behavior of dairy cows. *Journal of dairy science*. 2012. Vol. 95, n° 5, pp. 2571–2575.

DE BOYER DES ROCHES, Alice, FAURE, Marion, LUSSERT, Alexandra, HERRY, Vincent, RAINARD, Pascal, DURAND, Denys et FOUCRAS, Gilles, 2017. Behavioral and patho-physiological response as possible signs of pain in dairy cows during *Escherichia coli* mastitis: A pilot study. *Journal of Dairy Science*. juillet 2017. DOI 10.3168/jds.2017-12796.

DE GRAAF, S., AMPE, B. et TUYTTENS, F. a. M., 2017. Assessing dairy cow welfare at the beginning and end of the indoor period using the Welfare Quality (R) protocol. *Animal Welfare*. mai 2017. Vol. 26, n° 2, pp. 213-221. DOI 10.7120/09627286.26.2.213.

DE OLIVEIRA, Flávia Augusta, LUNA, Stelio Pacca Loureiro, DO AMARAL, Jackson Barros, RODRIGUES, Karoline Alves, SANT'ANNA, Aline Cristina, DAOLIO, Milena et BRONDANI, Juliana Tabarelli, 2014. Validation of the UNESP-Botucatu unidimensional composite pain scale for assessing postoperative pain in cattle. *BMC veterinary research*. 2014. Vol. 10, n° 1, pp. 200.

DE ROSA, G., GRASSO, F., WINCKLER, C., BILANCIONE, A., PACELLI, C., MASUCCI, F. et NAPOLITANO, F., 2015. Application of the Welfare Quality protocol to dairy buffalo farms: Prevalence and reliability of selected measures. *Journal of Dairy Science*. octobre 2015. Vol. 98, n° 10, pp. 6886-6896. DOI 10.3168/jds.2015-9350.

DE VRIES, M., BOKKERS, E.A.M., DIJKSTRA, T., VAN SCHAIK, G. et DE BOER, I.J.M., 2011. Invited review: Associations between variables of routine herd data and dairy cattle welfare indicators. *Journal of Dairy Science*. juillet 2011. Vol. 94, n° 7, pp. 3213-3228. DOI 10.3168/jds.2011-4169.

DOCKÈS, A. C., KLING-EVEILLARD, F., JACQUINOT, M. et BÈCHE, J. M., 2007. Consommateurs et éleveurs de bovins face à la problématique du bien-être animal. *Renc. Rech. Ruminants (14)*. 2007. pp. 285–292.

DUBIN, Adrienne E. et PATAPOUTIAN, Ardem, 2010. Nociceptors: the sensors of the pain pathway. *Journal of Clinical Investigation*. 1 novembre 2010. Vol. 120, n° 11, pp. 3760-3772. DOI 10.1172/JCI42843.

DUPAS, Fanny, 2005. *Le statut juridique de l'animal en France et dans les états membres de l'Union Européenne : Historique, bases juridiques actuelles et conséquences pratiques*. Thèse d'exercice vétérinaire. Toulouse : Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse. BU - ENVT: Réserve

EBINGHAUS, Asja, IVEMEYER, Silvia, RUPP, Julia et KNIERIM, Ute, 2016. Identification and development of measures suitable as potential breeding traits regarding dairy cows' reactivity towards humans. *Applied Animal Behaviour Science*. décembre 2016. Vol. 185, pp. 30-38. DOI 10.1016/j.applanim.2016.09.010.

ELLINGSEN, Kristian, COLEMAN, Grahame J., LUND, Vonne et MEJDELL, Cecilie M., 2014. Using qualitative behaviour assessment to explore the link between stockperson behaviour and dairy calf behaviour. *Applied Animal Behaviour Science*. avril 2014. Vol. 153, pp. 10-17. DOI 10.1016/j.applanim.2014.01.011.

EUROPEAN COMMISSION, 2015. 442: *Attitudes of Europeans towards Animal Welfare*. Special Eurobarometer. European Union. Disponible à l'adresse : <http://ec.europa.eu>

FARM ANIMAL WELFARE COMMITTEE, 1992. FAWC update the five freedoms. . 17 octobre 1992. Vol. 131, n° 16, pp. 357. BU - ENVT: Couloir

FERRAN, Aude et BOUSQUET-MELOU, Alain, 2014. Pharmacologie des anti-inflammatoires disponibles pour les animaux de rente. *Bulletin des GTV*. décembre 2014. N° 76, pp. 35-40.

FITZPATRICK, Colleen, 2011. *Assessing and mediating pain in dairy cows with experimentally-induced clinical mastitis* [en ligne]. Disponible à l'adresse : <https://atrium.lib.uoguelph.ca/xmlui/handle/10214/3183>

FOGSGAARD, K.K., BENNEDSGAARD, T.W. et HERSKIN, M.S., 2015. Behavioral changes in freestall-housed dairy cows with naturally occurring clinical mastitis. *Journal of Dairy Science*. mars 2015. Vol. 98, n° 3, pp. 1730-1738. DOI 10.3168/jds.2014-8347.

FOGSGAARD, K.K., RØNTVED, C.M., SØRENSEN, P. et HERSKIN, M.S., 2012. Sickness behavior in dairy cows during *Escherichia coli* mastitis. *Journal of Dairy Science*. février 2012. Vol. 95, n° 2, pp. 630-638. DOI 10.3168/jds.2011-4350.

FORTINEAU, Olivier, GUATTÉO, Raphaël et HOLOPHERNE-DORAN, Delphine, 2013. *Vade-mecum de gestion de la douleur bovine*. Paris : Éd. Med'com. ISBN 978-2-35403-188-6.

FOUCRAS, Gilles, 2014. Inflammation, mécanismes d'action et intérêt thérapeutique des anti-inflammatoires. *Bulletin des GTV*. décembre 2014. N° 76, pp. 27-34.

FOURICHON, C., BEAUDEAU, F., BAREILLE, N. et SEEGER, H., 2001. Incidence of health disorders in dairy farming systems in western France. *Livestock Production Science*. mars 2001. Vol. 68, n° 2-3, pp. 157-170. DOI 10.1016/S0301-6226(00)00249-9.

FOURICHON, C., SEEGER, H., BAREILLE, N. et BEAUDEAU, F., 2001. Estimation des pertes et de l'impact économiques consécutifs aux principaux troubles de santé en élevage bovin laitier. In : *Rencontres Recherches Ruminants* [en ligne]. Paris. 5 décembre 2001. pp. 137-143. Disponible à l'adresse : <http://www.journees3r.fr/>

FOURICHON, C., SEEGER, H., BEAUDEAU, F., VERFAILLE, L. et BAREILLE, N., 2001. Health-control costs in dairy farming systems in western France. *Livestock Production Science*. mars 2001. Vol. 68, n° 2-3, pp. 141-156. DOI 10.1016/S0301-6226(00)00248-7.

FRANCE CONSEIL ELEVAGE et INSTITUT DE L'ELEVAGE, 2013. *Mammites cliniques* [en ligne]. février 2013. Disponible à l'adresse : <http://idele.fr/>

GIBBONS, Jenny, MEDRANO-GALARZA, Catalina, DE PASSILLÉ, Anne Marie et RUSHEN, Jeffrey, 2012. Lying laterality and the effect of IceTag data loggers on lying

behaviour of dairy cows. *Applied Animal Behaviour Science*. 2012. Vol. 136, n° 2, pp. 104–107.

GLEERUP, Karina Bech, ANDERSEN, Pia Haubro, MUNKSGAARD, Lene et FORKMAN, Björn, 2015. Pain evaluation in dairy cattle. *Applied Animal Behaviour Science*. octobre 2015. Vol. 171, pp. 25-32. DOI 10.1016/j.applanim.2015.08.023.

GÓIS, Karen Camille Rocha, CEBALLOS, Maria Camila, SANT'ANNA, Aline Cristina et COSTA, Mateus José Rodrigues Paranhos da, 2016. Using an observer rating method to assess the effects of rotational stocking method on beef cattle temperament over time. *Revista Brasileira de Zootecnia*. septembre 2016. Vol. 45, pp. 501-508. DOI 10.1590/s1806-92902016000900001.

HALASA, T., HUIJPS, K., ØSTERÅS, O. et HOGVEEN, H., 2007. Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: A review. *Veterinary Quarterly*. janvier 2007. Vol. 29, n° 1, pp. 18-31. DOI 10.1080/01652176.2007.9695224.

HEDLUND, Louise et LØVLIE, Hanne, 2015. Personality and production: Nervous cows produce less milk. *Journal of Dairy Science*. septembre 2015. Vol. 98, n° 9, pp. 5819-5828. DOI 10.3168/jds.2014-8667.

HERRY, Vincent, GITTON, Christophe, TABOURET, Guillaume, RÉPÉRANT, Maryline, FORGE, Laurine, TASCIA, Christian, GILBERT, Florence B., GUITTON, Edouard, BARC, Céline, STAUB, Christophe, SMITH, David G. E., GERMON, Pierre, FOUCRAS, Gilles et RAINARD, Pascal, 2017. Local immunization impacts the response of dairy cows to *Escherichia coli* mastitis. *Scientific Reports*. décembre 2017. Vol. 7, n° 1. DOI 10.1038/s41598-017-03724-7

HOGAN, Joe et LARRY SMITH, K., 2003. Coliform mastitis. *Veterinary Research*. septembre 2003. Vol. 34, n° 5, pp. 507-519. DOI 10.1051/vetres:2003022.

HOPSTER, Hans, VAN DER WERF, Joop TN et BLOKHUIS, Harry J., 1998. Stress enhanced reduction in peripheral blood lymphocyte numbers in dairy cows during endotoxin-induced mastitis. *Veterinary immunology and immunopathology*. 1998. Vol. 66, n° 1, pp. 83–97.

HUDSON, C., WHAY, H. et HUXLEY, J., 2008. Recognition and management of pain in cattle. *In Practice*. 1 mars 2008. Vol. 30, n° 3, pp. 126-134. DOI 10.1136/inpract.30.3.126.

INSTITUT DE L'ELEVAGE, 2008. *Maladies des bovins*. 4°. France agricole.

INSTITUT DE VEILLE SANITAIRE, 2014. Données relatives aux toxi-infections alimentaires collectives déclarées en France en 2014. *Santé publique France* [en ligne]. 2014. Disponible à l'adresse : <http://invs.santepubliquefrance.fr/>

INTERNATION ASSOCIATION FOR THE STUDY OF PAIN, 1994. Part III : Pain Terms, A Current List with Definitions and Notes on Usage. In : *Classification of chronic pain* [en ligne]. Second Edition. Seattle : H. Merskey and N. Bogduk. pp. 209-214. IASP Task Force on Taxonomy. Disponible à l'adresse : <http://www.iasp-pain.org/Taxonomy#Pain>

IVEMEYER, Silvia, PISANI, Marialuisa et KNIERIM, Ute, 2015. Short-term ante-calving handling of dairy heifers in relation to heifers' behaviour and udder health after parturition.

Applied Animal Behaviour Science. octobre 2015. Vol. 171, pp. 33-38. DOI 10.1016/j.applanim.2015.08.022.

KESTER, H.J., SORTER, D.E. et HOGAN, J.S., 2015. Activity and milk compositional changes following experimentally induced *Streptococcus uberis* bovine mastitis. *Journal of Dairy Science*. février 2015. Vol. 98, n° 2, pp. 999-1004. DOI 10.3168/jds.2014-8576.

KIDD, B. L. et URBAN, L. A., 2001. Mechanisms of inflammatory pain. *BJA: British Journal of Anaesthesia*. 1 juillet 2001. Vol. 87, n° 1, pp. 3-11. DOI 10.1093/bja/87.1.3.

LAMINE, Claire, 2006. Mettre en parole les relations entre hommes et animaux d'élevage. Circulation des récits et mise en débat. *Ethnographiques.org* [en ligne]. 2006. N° 9. Disponible à l'adresse : <http://www.ethnographiques.org/>

LE PARISIEN, 2017. Bien-être animal : huit enseignes françaises de la distribution récompensées. *leparisien.fr* [en ligne]. 29 juin 2017. Disponible à l'adresse : <http://www.leparisien.fr/>

LEBART, Ludovic, MORINEAU, Alain et PIRON, Marie, 1995. *Statistique exploratoire multidimensionnelle* [en ligne]. Dunod. Paris. Disponible à l'adresse : <http://horizon.documentation.ird.fr>

LESLIE, Kenneth E. et PETERSSON-WOLFE, Christina S., 2012. Assessment and Management of Pain in Dairy Cows with Clinical Mastitis. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. juillet 2012. Vol. 28, n° 2, pp. 289-305. DOI 10.1016/j.cvfa.2012.04.002.

MAVANGIRA, Vengai et SORDILLO, Lorraine M., 2017. Role of lipid mediators in the regulation of oxidative stress and inflammatory responses in dairy cattle. *Research in Veterinary Science* [en ligne]. 2 août 2017. DOI 10.1016/j.rvsc.2017.08.002.

MEDRANO-GALARZA, C., GIBBONS, J., WAGNER, S., DE PASSILLÉ, A. M. et RUSHEN, J., 2012. Behavioral changes in dairy cows with mastitis. *Journal of dairy science*. 2012. Vol. 95, n° 12, pp. 6994–7002.

MILLMAN, Suzanne T., 2013. Behavioral Responses of Cattle to Pain and Implications for Diagnosis, Management, and Animal Welfare. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. mars 2013. Vol. 29, n° 1, pp. 47-58. DOI 10.1016/j.cvfa.2012.11.007.

MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE, DE L'AGROALIMENTAIRE ET DE LA FORÊT, 2016. *Le plan écantibio 2012-2016, synthèse et principales réalisations* [en ligne]. Ecoantibio 2017. Disponible à l'adresse : <http://agriculture.gouv.fr/>

MOBERG, G. P., 2000. Biological response to stress: implications for animal welfare. In : *The biology of animal stress: basic principles and implications for animal welfare*. Wallingford : CABI. pp. 1-21. ISBN 978-0-85199-359-1.

MØLGAARD, L., DAMGAARD, B.M., BJERRE-HARPØTH, V. et HERSKIN, M.S., 2012. Effects of percutaneous needle liver biopsy on dairy cow behaviour. *Research in Veterinary Science*. décembre 2012. Vol. 93, n° 3, pp. 1248-1254. DOI 10.1016/j.rvsc.2012.04.001.

MOLONY, V. et KENT, J. E., 1997. Assessment of acute pain in farm animals using behavioral and physiological measurements. *Journal of animal science*. 1997. Vol. 75, n° 1, pp. 266–272.

MUNKSGAARD, L, DEPASSILLÉ, A.M, RUSHEN, J, HERSKIN, M.S et KRISTENSEN, A.M, 2001. Dairy cows' fear of people: social learning, milk yield and behaviour at milking. *Applied Animal Behaviour Science*. juillet 2001. Vol. 73, n° 1, pp. 15-26. DOI 10.1016/S0168-1591(01)00119-8.

OIE, 2002. Code sanitaire pour les animaux terrestres. *OIE - World organisation for animal health* [en ligne]. 2002. [Consulté le 10 novembre 2016]. Disponible à l'adresse : <http://www.oie.int/fr/>

OIE, 2014. Objectifs et actions de l'OIE en matière de bien-être animal. *OIE - World organisation for animal health* [en ligne]. 2014. [Consulté le 10 novembre 2016]. Disponible à l'adresse : <http://www.oie.int/fr/>

ORDRE NATIONAL VÉTÉRINAIRE, 2015. Bien-être animal, définitions scientifiques et perception sociétale. In : *Vétérinaire, le professionnel garant du bien-être animal* [en ligne]. Paris. 24 novembre 2015. Disponible à l'adresse : <https://www.veterinaire.fr/>

PETERS, M. D. P., SILVEIRA, I. D. B. et FISCHER, V., 2015. Impact of subclinical and clinical mastitis on sensitivity to pain of dairy cows. *animal*. décembre 2015. Vol. 9, n° 12, pp. 2024-2028. DOI 10.1017/S1751731115001391.

POUTREL, Bernard, 2015. Prévalence en France des pathogènes impliqués dans les mammites bovines selon leur sévérité. *Bulletin des GTV*. août 2015. N° 79, pp. 51-54.

PRUNIER, A., MOUNIER, L., LE NEINDRE, P., LETERRIER, C., MORMÈDE, P., PAULMIER, V., PRUNET, P., TERLOUW, C. et GUATTEO, R., 2013. Identifying and monitoring pain in farm animals: a review. *Animal*. juin 2013. Vol. 7, n° 06, pp. 998-1010. DOI 10.1017/S1751731112002406.

RADOSTITS, Otto M, GAY, Clive C, HINCHCLIFF, Kenneth W et CONSTABLE, Peter D, 2007. Diseases of the mammary gland. In : *VETERINARY MEDICINE, a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats*. 10th Edition. Saunders, Elsevier limited. pp. 673-762. BU - ENVT: R.01.00-RAD-V

RAINARD, Pascal, 2015. Mécanismes immunitaires dans la glande mammaire et implications thérapeutiques. *Bulletin des GTV*. juin 2015. N° 78, pp. 53-57.

RASMUSSEN, Ditte B., FOGSGAARD, Katrine, RØNTVED, Christine M., KLAAS, Ilka C. et HERSKIN, Mette S., 2011. Changes in thermal nociceptive responses in dairy cows following experimentally induced *Escherichia coli* mastitis. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 2011. Vol. 53, n° 1, pp. 32.

RÉMY, Dominique, BOSQUET, Gérard, GOURREAU, Jean-Marie, GUIOILLIER, Loïc, LABBE, Jean-François, SALAT, Olivier, SCHMITT-VAN DE LEEMPUT, Ellen et VIN, Hubert, 2010. *Les mammites*. Paris : France agricole. ISBN 978-2-85557-171-3.

RÉPUBLIQUE FRANÇAISE, 1804. *Code civil - Article 528* [en ligne]. 4 février 1804. [Consulté le 8 novembre 2016]. Disponible à l'adresse : <https://www.legifrance.gouv.fr/>

RÉPUBLIQUE FRANÇAISE, 1976a. *Loi n° 76-629 du 10 juillet 1976 relative à la protection de la nature - Article 9* [en ligne]. 10 juillet 1976. [Consulté le 7 novembre 2016]. Disponible à l'adresse : <https://www.legifrance.gouv.fr/>

RÉPUBLIQUE FRANÇAISE, 1976b. *Code rural (ancien) - Article 276* [en ligne]. 10 juillet 1976. [Consulté le 7 novembre 2016]. Disponible à l'adresse : <https://www.legifrance.gouv.fr/>

RÉPUBLIQUE FRANÇAISE, 2015. *Code civil - Article 515-14* [en ligne]. 16 février 2015. [Consulté le 8 novembre 2016]. Disponible à l'adresse : <https://www.legifrance.gouv.fr/>

REVIEW ON ANTIMICROBIAL RESISTANCE, 2016. *Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendation* [en ligne]. Disponible à l'adresse : <https://amr-review.org/>

RICHARD, Mathieu, 1995. *CAMPBELL, BIOLOGIE*. 3ème édition. Saint-Laurent, Québec : Editions du Renouveau Pédagogique Inc. Campbell. ISBN 2-8041-2084-8.

ROBERTSON, I. S., KENT, J. E. et MOLONY, V., 1994. Effect of different methods of castration on behaviour and plasma cortisol in calves of three ages. *Research in veterinary science*. 1994. Vol. 56, n° 1, pp. 8–17.

ROUSING, Tine et WEMELSFELDER, Françoise, 2006. Qualitative assessment of social behaviour of dairy cows housed in loose housing systems. *Applied Animal Behaviour Science*. décembre 2006. Vol. 101, n° 1-2, pp. 40-53. DOI 10.1016/j.applanim.2005.12.009.

RUSHEN, J, MUNKSGAARD, L, MARNET, P.G et DEPASSILL?, A.M, 2001. Human contact and the effects of acute stress on cows at milking. *Applied Animal Behaviour Science*. juillet 2001. Vol. 73, n° 1, pp. 1-14. DOI 10.1016/S0168-1591(01)00105-8.

SEEGERS, Henri, FOURICHON, Christine et BEAUDEAU, François, 2003. Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds. *Veterinary Research*. septembre 2003. Vol. 34, n° 5, pp. 475-491. DOI 10.1051/vetres:2003027.

SEPÚLVEDA-VARAS, Pilar, PROUDFOOT, Kathryn L., WEARY, Daniel M. et VON KEYSERLINGK, Marina A.G., 2016. Changes in behaviour of dairy cows with clinical mastitis. *Applied Animal Behaviour Science*. février 2016. Vol. 175, pp. 8-13. DOI 10.1016/j.applanim.2014.09.022.

SHEARER, Jan K., STOCK, Matthew L., VAN AMSTEL, Sarel R. et COETZEE, Johann F., 2013. Assessment and Management of Pain Associated with Lameness in Cattle. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 1 mars 2013. Vol. 29, n° 1, pp. 135-156. DOI 10.1016/j.cvfa.2012.11.012.

SIIVONEN, Jutta, TAPONEN, Suvi, HOVINEN, Mari, PASTELL, Matti, LENSINK, B. Joop, PYÖRÄLÄ, Satu et HÄNNINEN, Laura, 2011. Impact of acute clinical mastitis on cow behaviour. *Applied Animal Behaviour Science*. juillet 2011. Vol. 132, n° 3-4, pp. 101-106. DOI 10.1016/j.applanim.2011.04.005.

STANGAFERRO, M.L., WIJMA, R., CAIXETA, L.S., AL-ABRI, M.A. et GIORDANO, J.O., 2016. Use of rumination and activity monitoring for the identification of dairy cows with health disorders: Part II. Mastitis. *Journal of Dairy Science*. septembre 2016. Vol. 99, n° 9, pp. 7411-7421. DOI 10.3168/jds.2016-10908.

STOCKMAN, C. A., COLLINS, T., BARNES, A. L., MILLER, D., WICKHAM, S. L., BEATTY, D. T., BLACHE, D., WEMELSFELDER, F. et FLEMING, P. A., 2011. Qualitative Behavioural Assessment and quantitative physiological measurement of cattle naïve and habituated to road transport. *Animal Production Science*. 2011. Vol. 51, n° 3, pp. 240-249.

SUOJALA, L., KAARTINEN, L. et PYÖRÄLÄ, S., 2013. Treatment for bovine *Escherichia coli* mastitis – an evidence-based approach. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 1 décembre 2013. Vol. 36, n° 6, pp. 521-531. DOI 10.1111/jvp.12057.

THEURER, Miles E., AMRINE, David E. et WHITE, Brad J., 2013. Remote Noninvasive Assessment of Pain and Health Status in Cattle. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. mars 2013. Vol. 29, n° 1, pp. 59-74. DOI 10.1016/j.cvfa.2012.11.011.

THOMPSON-CRISPI, Kathleen, ATALLA, Heba, MIGLIOR, Filippo et MALLARD, Bonnie A., 2014. Bovine Mastitis: Frontiers in Immunogenetics. *Frontiers in Immunology* [en ligne]. 7 octobre 2014. Vol. 5. DOI 10.3389/fimmu.2014.00493.

UNION EUROPÉENNE, 1992. *Traité de Maastricht* [en ligne]. 1992. [Consulté le 8 novembre 2016]. Disponible à l'adresse : <http://www.cvce.eu/>

UNION EUROPÉENNE, 1997. *Protocole pour la protection et le bien-être des animaux - Traité d'Amsterdam* [en ligne]. 11 octobre 1997. C340. [Consulté le 8 novembre 2016]. Disponible à l'adresse : <http://eur-lex.europa.eu/>

UNION EUROPÉENNE, 2004. *Article III - 121 de la Constitution Européenne* [en ligne]. 16 décembre 2004. C310/1. [Consulté le 8 novembre 2016]. Disponible à l'adresse : <http://eur-lex.europa.eu/>

VEISSIER, Isabelle, LE NEINDRE, P. et TRILLAT, G., 1989. The use of circadian behaviour to measure adaptation of calves to changes in their environment. *Applied Animal Behaviour Science*. 1989. Vol. 22, n° 1, pp. 1–12.

VUČEMILO, Marija, MATKOVIĆ, Kristina, ŠTOKOVIĆ, Igor, KOVAČEVIĆ, Saša, BENIĆ, Marijan et OTHERS, 2012. Welfare assessment of dairy cows housed in a tie-stall system. *Mljekarstvo*. 2012. Vol. 62, n° 1, pp. 62.

WELFARE QUALITY, 2009. *Welfare Quality assessment protocol for cattle* [en ligne]. 2009. Welfare Quality Consortium Lelystad, Netherlands. [Consulté le 29 août 2016]. Disponible à l'adresse : <http://www.welfarequalitynetwork.net/>

WEMELSFELDER, Françoise, 2007. How animals communicate quality of life: the qualitative assessment of behaviour. *Animal Welfare-Potters Bar Then Wheathampstead*, 16, 25. Disponible à l'adresse : <http://animalstudiesrepository.org/>

WENZ, John R., GARRY, Franklyn B. et BARRINGTON, George M., 2006. Comparison of disease severity scoring systems for dairy cattle with acute coliform mastitis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 1 juillet 2006. Vol. 229, n° 2, pp. 259-262. DOI 10.2460/javma.229.2.259.

YEISER, Emily Elizabeth, 2011. The use of activity measures in combination with physiological factors as indicators of disease in dairy cattle. [en ligne]. 2011. Disponible à l'adresse : <https://vtechworks.lib.vt.edu/handle/10919/44255>

ZIMOV, Jennifer L., BOTHERAS, Naomi A., WEISS, William P. et HOGAN, Joseph S., 2011. Associations among behavioral and acute physiologic responses to lipopolysaccharide-induced clinical mastitis in lactating dairy cows. *American journal of veterinary research*. 2011. Vol. 72, n° 5, pp. 620–627.

IV. Annexes

A. Déclaration Universelle des Droits de l'Animal	91
B. Principes directeurs pour le bien-être animal	93
C. Tableau de synthèse des comportements étudiés et leur significativité dans les publications évaluant le comportement lors de mammites	94
D. Détermination des périodes : analyses factorielles discriminantes	95
E. Tableau bilan de la comparaison des périodes	98
F. Publication : Alice de Boyer des Roches et al. (2017).....	100

A. Déclaration Universelle des Droits de l'Animal

La Déclaration Universelle des Droits de l'animal a été proclamée solennellement le 15 octobre 1978 à la Maison de l'UNESCO à Paris. Elle constitue une prise de position philosophique sur les rapports qui doivent désormais s'instaurer entre l'espèce humaine et les autres espèces animales. Son texte révisé par la Ligue Internationale des Droits de l'Animal en 1989, a été rendu public en 1990.

PRÉAMBULE :

Considérant que la Vie est une, tous les êtres vivants ayant une origine commune et s'étant différenciés au cours de l'évolution des espèces,

Considérant que tout être vivant possède des droits naturels et que tout animal doté d'un système nerveux possède des droits particuliers,

Considérant que le mépris, voire la simple méconnaissance de ces droits naturels provoquent de graves atteintes à la Nature et conduisent l'homme à commettre des crimes envers les animaux,

Considérant que la coexistence des espèces dans le monde implique la reconnaissance par l'espèce humaine du droit à l'existence des autres espèces animales,

Considérant que le respect des animaux par l'homme est inséparable du respect des hommes entre eux,

IL EST PROCLAME CE QUI SUIT :

Article premier

Tous les animaux ont des droits égaux à l'existence dans le cadre des équilibres biologiques. Cette égalité n'occulte pas la diversité des espèces et des individus.

Article 2

Toute vie animale a droit au respect.

Article 3

Aucun animal ne doit être soumis à de mauvais traitements ou à des actes cruels.

Si la mise à mort d'un animal est nécessaire, elle doit être instantanée, indolore et non génératrice d'angoisse.

L'animal mort doit être traité avec décence.

Article 4

L'animal sauvage a le droit de vivre libre dans son milieu naturel, et de s'y reproduire.

La privation prolongée de sa liberté, la chasse et la pêche de loisir, ainsi que toute utilisation de l'animal sauvage à d'autres fins que vitales, sont contraires à ce droit.

Article 5

L'animal que l'homme tient sous sa dépendance a droit à un entretien et à des soins attentifs.

Il ne doit en aucun cas être abandonné, ou mis à mort de manière injustifiée.

Toutes les formes d'élevage et d'utilisation de l'animal doivent respecter la physiologie et le comportement propres à l'espèce.

Les exhibitions, les spectacles, les films utilisant des animaux doivent aussi respecter leur dignité et ne comporter aucune violence.

Article 6

L'expérimentation sur l'animal impliquant une souffrance physique ou psychique viole les droits de l'animal.

Les méthodes de remplacement doivent être développées et systématiquement mises en œuvre.

Article 7

Tout acte impliquant sans nécessité la mort d'un animal et toute décision conduisant à un tel acte constituent un crime contre la vie.

Article 8

Tout acte compromettant la survie d'une espèce sauvage, et toute décision conduisant à un tel acte constituent un génocide, c'est à dire un crime contre l'espèce.

Le massacre des animaux sauvages, la pollution et la destruction des biotopes sont des génocides.

Article 9

La personnalité juridique de l'animal et ses droits doivent être reconnus par la loi.

La défense et la sauvegarde de l'animal doivent avoir des représentants au sein des organismes gouvernementaux.

Article 10

L'éducation et l'instruction publique doivent conduire l'homme, dès son enfance, à observer, à comprendre, et à respecter les animaux.

La Déclaration Universelle des Droits de l'Animal a été proclamée solennellement à Paris, le 15 octobre 1978, à la Maison de l'Unesco.

Son texte révisé par la Ligue Internationale des Droits de l'Animal en 1989, a été rendu public en 1990.

Source : (Babadji 1999), (Burgat 1997)

B. Principes directeurs pour le bien-être animal

1. Il existe une relation très forte entre la santé animale et le bien-être animal.
2. Les « cinq libertés » universellement reconnues (être épargné de la faim, de la soif et de la malnutrition, être épargné de la peur et de la détresse, être épargné de l'inconfort physique et thermique, être épargné de la douleur, des blessures et des maladies, et être libre d'exprimer des modes normaux de comportement) offrent des orientations précieuses pour le bien-être animal.
3. Les « trois R » universellement reconnus (réduction du nombre d'animaux, raffinement des méthodes expérimentales et remplacement des animaux par des techniques non animales) offrent des orientations précieuses pour l'utilisation des animaux aux fins de la science.
4. L'évaluation scientifique du bien-être animal implique divers éléments qu'il convient d'étudier ensemble ; la sélection et la pondération de ces éléments comportent souvent des hypothèses fondées sur des valeurs qu'il faut rendre aussi explicites que possible.
5. L'utilisation des animaux à des fins d'agriculture, d'enseignement et de recherche, et pour la compagnie, les loisirs et le spectacle apporte une contribution majeure au bien-être des personnes.
6. L'utilisation des animaux comporte la responsabilité éthique de veiller à la protection de ces animaux dans toute la mesure du possible.
7. L'amélioration du bien-être animal à la ferme peut souvent accroître la productivité et la sécurité sanitaire des aliments, et donc être source d'avantages économiques.
8. Il faut fonder la comparaison des normes et principes directeurs en matière de bien-être animal sur l'équivalence des résultats en se fiant à des critères d'objectifs plutôt que sur la similitude des systèmes en utilisant des critères de moyens.

Source : (OIE 2002)

C. Tableau de synthèse des comportements étudiés et leur significativité dans les publications évaluant le comportement lors de mammites

Les comportements des animaux malades montrent des différences significatives (S) ou non significatives (NS) par rapport à des animaux sains (S), traités avec des AINS (T), à eux-mêmes sains (P) ou entre deux groupes inoculés ayant une concentration sanguines basale de cortisol différentes (C).

Tableau 11 : Synthèse des comportements étudiés et leur significativité dans différentes publications

Types de mammites	Inoculé par <i>E. coli</i> (1,2,3,4) ou <i>S. uberis</i> (5)						Spontané				Inoculé par LPS					
	<i>P</i>	<i>T</i>	<i>P</i>	<i>P</i>	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>S et P</i>	<i>P</i>	<i>P</i>	<i>P</i>	<i>P</i>	<i>P</i>	<i>P</i>	<i>P</i>	<i>S et T</i>	<i>C</i>
Publications	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
<u>Activité</u>																
Pas		NS			S	S	S		S			S				
Debout	NS	S										S				
Inactivité	S				S											
Temps de couchage	S	S	NS			S	S				S	S		NS		
Latéralité du couchage	S	NS					NS				NS	NS				
Changements de position	S	NS	S			S					NS	NS				
Prise alimentaire	S					S		S				S		NS		
Quantité ingérée	NS	S				S		S					S			
Boisson	NS											NS				
Rumination	S		NS						S			NS	NS	NS		
<u>Traite</u>																
Coup de pied						S		S								
Pas						S		S								
<u>Autres</u>																
Postures et attitude statique	NS		S/ NS				NS									
Postures et attitude dynamique	S			S/ NS											S	
Sensibilité par stimulation				S						NS			S			

Sources : (1) Fogsgaard et al. (2012), (2) Yeiser (2011), (3) De Boyer des Roches et al. (2017), (4)Rasmussen et al. (2011), (5) Kester, Sorter_, Hogan (2015), (6) Fogsgaard, Bennedsgaard, Herskin (2015), (7)Medrano-Galarza et al. (2012), (8) Sepúlveda-Varas et al. (2016),(9) Stangaferro et al. (2016), (10) Peters, Silveira, Fischer (2015),(11) Cyples et al. (2012), (12) Siivonen et al. (2011), (13) Fitzpatrick (2011), (14) Zimov et al. (2011), (15) (Hopster, van der Werf, Blokhuis (1998).

D. Détermination des périodes : analyses factorielles discriminantes

- Première analyse :

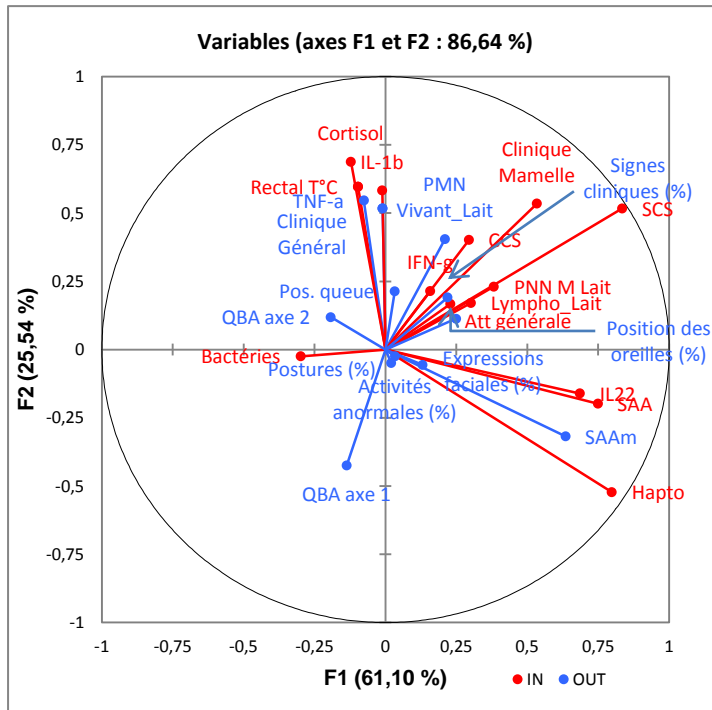


Figure 20 : Représentation graphique de la corrélation des axes et des variables incluses (IN) ou non incluses (OUT) au modèle de la première analyse factorielle discriminante

Discrimination des temps T0, T8, T12, T16, T24, T32, T40, T56, T64 et T80 avec les variables comportementales du QBA et de l'évaluation en stabulation ; les variables cliniques du score générale, de la mamelle et de la température rectale ; toutes les variables du lait (cytokines, cellules et bactéries) et certaines variables biochimique (cortisol, haptoglobine, SAA).

Tableau 12 : Test unidimensionnel d'égalité des moyennes, corrélations des axes avec les variables incluses au modèle de la première analyse factorielle discriminante

Variabiles « IN » (incluses dans le modèle)	p-value	Corrélation avec l'axe 1	Corrélation avec l'axe 2
Température rectale	< 0,0001	-0,097	0,597
Score clinique de la mamelle	< 0,0001	0,534	0,535
IL22	< 0,0001	0,685	-0,160
IFN- γ	< 0,0001	0,158	0,214
IL-1	< 0,0001	-0,012	0,583
GNN Mort dans le lait	< 0,0001	0,382	0,230
Lymphocytes dans le lait	< 0,0001	0,301	0,171
Bactéries dans le lait	< 0,0001	-0,299	-0,024
CCS	< 0,0001	0,294	0,402
SCS	< 0,0001	0,835	0,517
Haptoglobine	< 0,0001	0,798	-0,523
SAA	< 0,0001	0,749	-0,198
Cortisol	< 0,0001	-0,122	0,688
Attitude générale (%)	0,002	0,229	0,167

Tableau 13 : Résultats de la validation croisée de la première analyse factorielle discriminante

de/Vers	0	8	12	16	24	32	40	56	64	80	Total	% correct
0	18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	18	100%
8	9	8	0	1	0	0	0	0	0	0	18	44,4%
12	0	1	15	2	0	0	0	0	0	0	18	83,3%
16	0	0	2	16	0	0	0	0	0	0	18	88,8%
24	0	0	0	3	13	2	0	0	0	0	18	72,2%
32	0	0	0	0	0	16	2	0	0	0	18	88,9%
40	0	0	0	0	0	2	9	2	3	0	16	56,3%
56	0	0	0	0	0	0	3	8	3	3	17	47,1%
64	0	0	0	0	0	0	1	5	7	4	17	41,2%
80	0	0	0	0	0	0	2	1	3	12	18	66,7%
Total	27	9	17	22	13	20	17	16	16	19	176	69,3%

- Deuxième analyse

Discrimination des temps de T0 à T80 en fonction des variables du lait (cytokines, cellules et bactéries), le cortisol et le score clinique de la mamelle.

Figure 21 : Représentation graphique de la corrélation des axes et des variables incluses (IN) ou non incluses (OUT) au modèle de la deuxième analyse factorielle discriminante

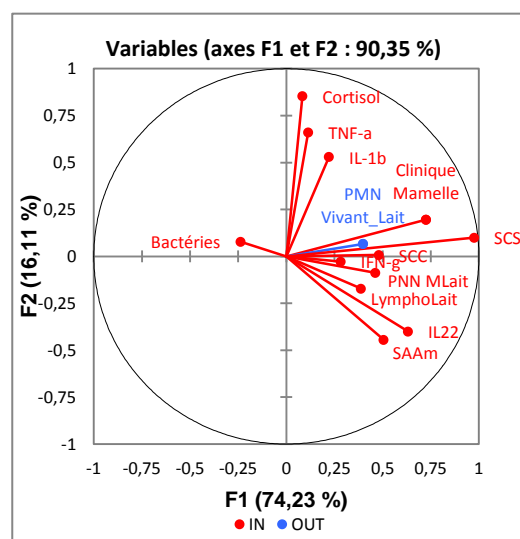


Tableau 14 : Test unidimensionnel d'égalité des moyennes, corrélations des axes avec les variables incluses au modèle de la deuxième analyse factorielle discriminante

Variables « IN » (incluses dans le modèle)	p-value	Corrélation avec l'axe 1	Corrélation avec l'axe 2
Score clinique mammaire	< 0,0001	0,726	0,196
IL-22	< 0,0001	0,632	-0,400
SAA dans le lait	< 0,0001	0,505	-0,444
IFN- γ	< 0,0001	0,283	-0,028
TNF α	< 0,0001	0,114	0,661
IL-1 β	< 0,0001	0,221	0,531
GNN mort dans le lait	< 0,0001	0,462	-0,087
Lymphocytes dans le lait	< 0,0001	0,387	-0,172
Bactéries dans le lait	< 0,0001	-0,237	0,078
SCC	< 0,0001	0,481	0,008
SCS	< 0,0001	0,976	0,100
Cortisol	< 0,0001	0,084	0,854

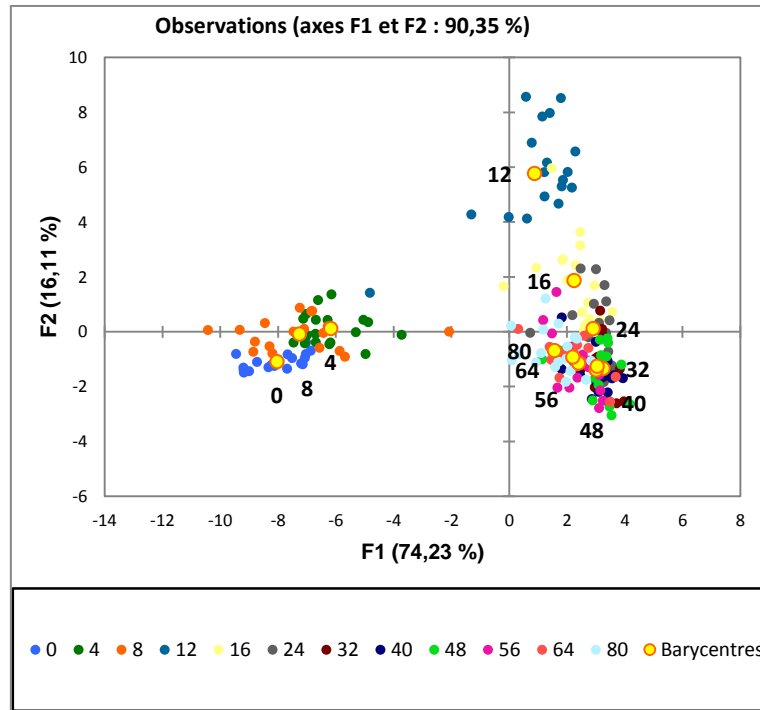


Figure 22 : Résultat graphique de la deuxième analyse factorielle discriminante

Tableau 15 : Résultats de la validation croisée de la deuxième analyse factorielle

de \ Vers	0	4	8	12	16	24	32	40	48	56	64	80	Total	% correct
0	16	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	18	88,89%
4	1	17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	18	94,44%
8	4	4	9	0	0	0	0	0	0	0	0	1	18	50,00%
12	0	1	0	15	2	0	0	0	0	0	0	0	18	83,33%
16	0	0	0	1	13	3	0	0	0	0	0	1	18	72,22%
24	0	0	0	0	2	10	1	0	3	2	0	0	18	55,56%
32	0	0	0	0	0	0	7	6	1	4	0	0	18	38,89%
40	0	0	0	0	0	0	4	5	1	4	2	2	18	27,78%
48	0	0	0	0	0	2	1	1	6	4	2	2	18	33,33%
56	0	0	0	0	0	0	0	2	2	6	3	5	18	33,33%
64	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	5	10	18	27,78%
80	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	5	12	18	66,67%
Total	21	24	9	16	17	15	13	14	13	24	17	33	216	56,02%

E. Tableau bilan de la comparaison des périodes

Les variables incluses dans le modèle sont notés NS, si en plus les moyennes de la phase post-inoculation sont significativement différentes de la phase pré-inoculation, elles sont notés S.

Tableau 16 : Synthèse des variables contributives lors de la comparaison des phases post-inoculation avec la phase pré-inoculation

	Phase pré-clinique	Phase d'état	Phase de rémission	
Comportement	QBA axe 1		S	
	QBA axe 2	NS	NS	
	Coup de pied	NS	S	S
	Pas	NS	NS	NS
	Attitude générale	NS	S	S
	Expressions faciales		NS	
	Position des oreilles	NS	S	S
	Postures	NS	NS	NS
	Activités anormales		NS	NS
	Position de la queue	S		NS
	Signes cliniques	NS	S	S
	Temps passé couché			S
	Changements de position	S	NS	NS
	Clinique	Température ruminale		S
Température rectale		NS		NS
Score clinique général		NS		
Score clinique mammaire		S	S	S
Sang	Leucocytes	NS	S	
	GNN (%)	NS		S
	GNN (10 ⁹ /mL)	NS	NS	
	Monocytes (%)	NS	S	NS
	Monocytes (10 ⁹ /mL)	NS		NS
	Lymphocytes B (%)	NS	S	S
	Lymphocytes B (10 ⁹ /mL)		S	S
	Lymphocytes T (%)		S	
	Lymphocytes T (10 ⁹ /mL)	S	S	S
	Lymphocytes T $\gamma\delta$	NS	S	NS
	Lymphocytes T CD4	NS	S	
	Lymphocytes T CD8	NS	S	S
	Haptoglobine		S	S
	SAA	NS	S	S
	Cortisol	S		S
Glutathion réduit/oxydé	NS		NS	

	Phase pré-clinique	Phase d'état	Phase de rémission
Lait	IL-22		S
	SAA		S
	IFN- γ		S
	TNF- α	NS	S
	IL-1 β	NS	
	GNN mort	NS	S
	GNN vivant	NS	S
	Lymphocytes		S
	Bactéries		S
	CCS	S	
	SCS	S	S



Behavioral and patho-physiological response as possible signs of pain in dairy cows during *Escherichia coli* mastitis: A pilot study

Alice de Boyer des Roches,^{*1} Marion Faure,^{*} Alexandra Lussert,[†] Vincent Herry,[†] Pascal Rainard,[‡] Denys Durand,^{*} and Gilles Foucrast[†]

^{*}Université Clermont Auvergne, Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), VetAgro Sup, UMR Herbivores, F-63122 Saint-Genès-Champagnelle, France

[†]Université de Toulouse, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse (ENVT), INRA, Interactions Hôtes-Agents Pathogènes (IHAP), F-31076 Toulouse, France

[‡]Infectiologie et Santé Publique (ISP), INRA, Université de Tours, UMR1282, F-37380 Nouzilly, France

ABSTRACT

Bovine mastitis is one of the most common diseases in the dairy industry and it is a major welfare problem. Pain during mastitis is generally assessed through behavior but a combination of indicators would increase the chances of detecting pain and assessing its intensity. The aim of this study was to assess behavioral and patho-physiological responses as possible signs of pain experienced by cows after experimental intramammary challenge (mastitis) with *Escherichia coli*. Six Holstein-Friesian cows received an inoculation of *E. coli* P4 in one healthy quarter. Evolution of the disease was assessed using bacteriological growth and somatic cell counts (SCC). Cows' response to the challenge was monitored by direct behavioral and clinical observations, data loggers, rumen temperature sensors, and indicators of inflammation, stress, and oxidative status. From all data recorded, the variables that contributed most to the discrimination of mastitis phases were obtained by factorial discriminant analysis. Baseline levels of all indicators corresponded to values before challenge. Specifically, we weighted data relating to lying behavior by the observations at the same hour of the day before challenge to eliminate the circadian rhythm effect. We identified 3 phases that were discriminated by factorial discriminant analysis with good performance. Nine indicators varied according to the phase of the disease: cows' attitude toward their surroundings, tail position, clinical signs, ear position, variation of postural changes, concentrations of haptoglobin and serum amyloid A (SAA), cortisol blood levels, and rumen temperature (as a surrogate for body temperature). In phase 1 (4 to 8 h postinoculation), *E. coli* proliferated exponentially in milk but inflamma-

tion indicators remained at baseline levels. Cows were less attentive toward their surroundings (median score, 0.63), and postural changes (lying/standing) were less frequent (0.75 times from baseline). In phase 2 (12 to 24 h postinoculation), bacterial concentrations peaked around 12 h and then began to decrease concomitantly with a sharp SCC increase. Cows were less attentive toward their surroundings (score, 0.54), had high plasma cortisol (31.3 ng/mL) and SAA (100.3 µg/mL) concentrations, and rumen temperature was increased (40.3°C). In phase 3 (32 to 80 h postinoculation), bacterial concentrations decreased concomitantly with high SCC levels. Cows had high levels of haptoglobin (0.57 mg/mL) and SAA (269 µg/mL) but showed no behavioral changes. Dairy cows displayed changes of behavioral, inflammatory, and stress parameters after *E. coli* mammary inoculation. Our results suggest that cows may have experienced discomfort in the preclinical phase (phase 1) and pain in the acute phase (phase 2) but neither discomfort nor pain in the remission phase (phase 3). Although larger controlled studies are needed to confirm our findings, this knowledge could be useful for early detection of *E. coli* mastitis and for decision-making regarding the initiation of pain-relief treatment during mastitis in dairy cows. This would improve animal welfare and potentially faster disease remission.

Key words: dairy cow, mastitis, pain, multiparametric analysis, *Escherichia coli*

INTRODUCTION

Mastitis is one of the major problems affecting the welfare of dairy cows (European Food Safety Authority, 2009; Leslie and Petersson-Wolfe, 2012). During mastitis, the concomitant inflammation of the udder, increased intramammary pressure, and increased external pressure (e.g., from an adjacent limb on a swollen udder) are believed to induce pain (Fitzpatrick et al., 2000; Leslie and Petersson-Wolfe, 2012). Recently,

Received February 24, 2017.

Accepted May 31, 2017.

¹Corresponding author: alice.deboyordesroches@vetagro-sup.fr

cattle practitioners in the United Kingdom scored pain associated with acute *Escherichia coli* mastitis at 7 on a value scale from 0 to 10 (Huxley and Whay, 2006). Unfortunately, the management of painful conditions in cattle is still infrequently considered in practice (Hudson et al., 2008), although treating the pain experienced by cows during clinical mastitis results in decreased edema, a lower SCC, and a reduced risk of culling (McDougall et al., 2009; Fitzpatrick et al., 2013). One reason for the inconsistencies of pain relief in cattle is the difficulty in assessing pain properly (Huxley and Whay, 2006; Flecknell, 2008).

Numerous methodologies have been used to assess or quantify the levels of pain experienced by farm animals (Prunier et al., 2013). Studies on pain mainly measure an animal's pain response to a noxious stimulus by recording the incidence of a clearly defined pattern of behaviors (e.g., abnormal standing or lying; Fogsgaard et al., 2012, 2015), changes in the levels of stress response [e.g., hypothalamus-pituitary-adrenal (HPA) axis such as cortisol release (Hopster et al., 1998) or autonomous nervous system such as heart-rate increase (Fitzpatrick et al., 2000)], or in levels of biochemical markers of oxidative stress (Salvemini et al., 2011; Sharma et al., 2016) and inflammation (e.g., haptoglobin and serum amyloid A, SAA; Eckersall et al., 2001). Unfortunately, it is not possible to allocate a "pain score" based on changes in only one of these indicators because most of them are not specific or sensitive enough. For instance, HPA axis and autonomous nervous system activity are related to stressful situations (Molony and Kent, 1997; Prunier et al., 2013). Changes in activity may result from pain (Theurer et al., 2012) but can also be early signs of sickness (Veissier et al., 1989). Previous studies on how cows feel pain during mastitis generally focused on 1 or 2 types of indicators (e.g., clinical and behavioral; Fogsgaard et al., 2012), but did not, to our knowledge, combine information of various types of indicators. Such a combination would increase the chance of detecting pain and assessing its intensity. Moreover, although the severity of mastitis is well described in the scientific literature (Schukken et al., 2011), knowledge is still lacking on the levels of pain experienced by cows according to the phase of the disease (e.g., preclinical, acute phase, and remission).

The aim of this study was to assess the behavioral and patho-physiological responses, as possible signs of pain experienced by cows during *E. coli* mastitis. We hypothesized that (1) the pain experienced by cows varies according to the timeline of *E. coli* mastitis, and (2) a multiparametric approach combining several indicators, already tested in experimental surgery conditions (Faure et al., 2017), would be efficient in discriminating pain levels during mastitis.

MATERIALS AND METHODS

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

Animals, Housing, and Feeding

The study was conducted at the INRA animal facility (PFIE, Nouzilly, France). Six Holstein-Friesian cows in their first parity were used. They were part of a larger study on the effect of local immunization on the response of dairy cows to *E. coli* mastitis (Herry et al., 2017). The 6 cows used in the current study were involved as a control group in the above-mentioned study that used 18 animals in total. Detailed information on the protocol can be found elsewhere (Herry et al., 2017). Here, only information relative to the 6 animals used in the current study is provided.

The 6 cows were housed in a loose housing, deep-bedded barn (space allowance per cow, 20 m²; 15 m² of bedded area and 5 m² of walking area) at INRA PFIE. They were fed once per day (at 1000 h) a diet based on corn silage, hay, soybean meal, and concentrate, which met the dietary requirements for transition and early lactation. The mixed ration was regularly pushed back toward the cows during the day and refusals were always >5%. They were allowed water ad libitum. The cows were milked twice a day (at 0800 and 1600 h) by experienced stockpersons in a milking parlor adjacent to the barn.

Experimental Design

The experiment was a longitudinal study, with the individual dairy cow being her own control, examining the effects of experimental *E. coli* infection. The *E. coli* strain P4 classified as O32:H37, ECOR Phylogenetic group A, and multilocus sequence type ST10 (Blum et al., 2012) was used for intramammary challenge as previously indicated.

Cows were challenged at 44 to 56 (average 49) DIM. Before challenge, all quarters were checked for the absence of IMI by performing bacteriological analysis and SCC measurement on foremilk stripping. Inoculated quarters were free of infection: the milk had SCC <50,000 cells/mL and contained no viable bacteria. One quarter of each cow was challenged by infusion with 1 mL of the bacterial suspension (1,000 cfu/mL). Inoculation was performed at midnight on d 0 just after complete milking of the gland and 8 h before the next

milking. Complete milkings subsequent to inoculation took place twice a day, and milk samples were collected at 8, 16, 32, 40, 56, 64, 80, and 104 h postinoculation.

Data Collection

Milk samples, behavioral observations, and physiological measurements were performed at regular intervals from 42 h (behavior) or just before (time 0; milk, blood) *E. coli* inoculation up to 80 h postinoculation (Figure 1) by 2 experienced veterinarians.

Milk Leukocytes, Bacterial Count, and Phase of Mastitis

Bacteriological examinations were conducted over 80 h postinoculation (Figure 1). Somatic cell counts were determined from aseptically taken milk samples from the challenged quarters using a cell counter (Fossomatic model 90; Foss Food Technology, Hillerød, Denmark), and bacteriological analysis was performed by plating 50 μ L of 10-fold dilutions of foremilk samples over sheep blood-esculin agar, incubating overnight at 37°C, and enumerating *E. coli* colonies. Details of these procedures are described elsewhere (Herry et al., 2017).

Based on the kinetic variation in the milk bacterial population and SCC observed in the 6 cows, we divided the observational period into phases reflecting the evolution of the mastitis.

Behavior Evaluation Scheme

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

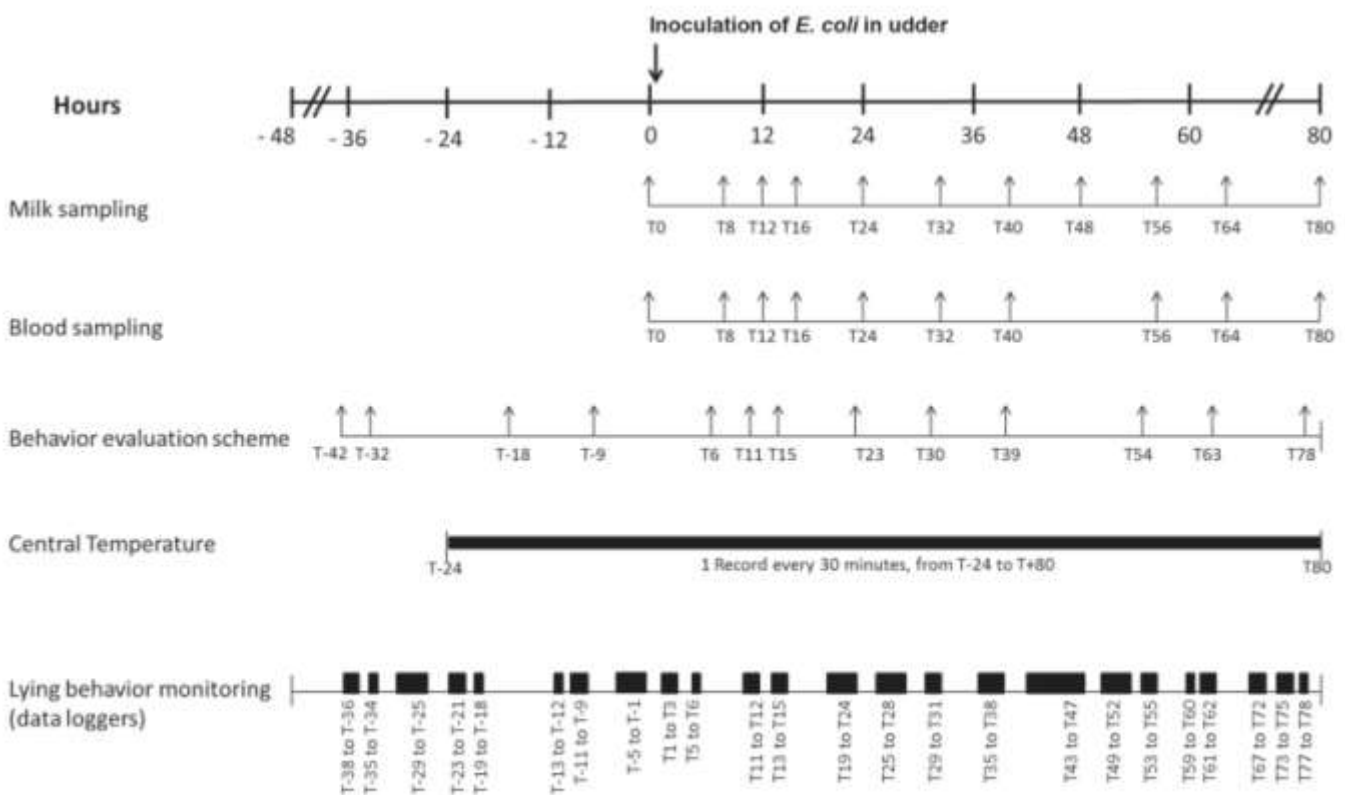


Figure 1. Experimental protocol for investigating the effects of inoculation of *Escherichia coli* in the udder of 6 Holstein-Friesian cows on milk indicators, physiological indicators, and behavioral indicators. Inoculation took place just after time (T) 0 hours.

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

Item	Score and criterion	Maximum score
General attitude: Attention toward the surroundings and head position (Hudson et al., 2008; Prunier et al., 2013)	<ul style="list-style-type: none"> • (0) Cow active or attentive, and has her head at or above the line of spinal column • (0.5) Cow not active, does not look at the observer • (1) Cow avoids eye contact, is not active, not sleeping and not ruminating • (1) Cow's head below the line of spinal column 	2
Ear position (Gleerup et al., 2015)	<ul style="list-style-type: none"> • (0) Both ears forward or one ear forward or back and the other moving back and forth • (1) Ears lower than spinal column, with an increased distance between ears and the opening facing downwards 	1
Facial expression (Gleerup et al., 2015)	<ul style="list-style-type: none"> • (0) Attentive or neutral look with no furrows above nostrils • (1) Strained look with furrows above nostrils 	1
Standing posture (de Oliveira et al., 2014)	<ul style="list-style-type: none"> • (0) Normal standing: standing, walking, eating, or investigating with no apparent abnormalities • (1) Standing unsteadily, sometimes the body leaning against a wall, or back arched standing, or standing with weight shifting on hind legs 	1
Limb posture (de Oliveira et al., 2014)	<ul style="list-style-type: none"> • (0) Normal posture of the legs • (1) Standing with hind limbs extended caudally, or a leg held in suspension, or forelegs and hind legs brought closer 	1
Lying position (Robertson et al., 1994)	<ul style="list-style-type: none"> • (0) Normal sternal recumbency • (0.5) Sternal recumbency with the hindlimbs partially or fully extended • (1) Lateral recumbency with one shoulder on the ground, with full or partial extension of one or both hind limbs 	1
Miscellaneous abnormal behaviors (Hudson et al., 2008; Prunier et al., 2013)	<ul style="list-style-type: none"> • (0) Normorexia or rumination • (1) Foot stamping • (1) Hyporexia or anorexia • (1) Absence of rumination 	3
Tail position (Mølgaard et al., 2012)	<ul style="list-style-type: none"> • (0) Normal position of tail • (0.5) Central part of tail slightly pressed against udder base • (1) Central part of tail pressed against udder base 	1
Clinical signs (Hudson et al., 2008)	<ul style="list-style-type: none"> • (0) Normal eyes, smooth hair coat, no shivering • (1) Presence of eyes sunken into orbits • (1) Obviously erect hair coat • (1) Shivering of muscles • (1) Shivering • (1) Panting 	5

Lying Behavior Monitoring

Lying behavior was monitored with data loggers (Hobo Pendant G Data Logger, Onset Computer Corp., Pocasset, MA) attached to the medial side of the hind leg of each cow with Vet Wrap (3M Corp., St-Paul, MN). Loggers were fixed in a position so that the x-axis was parallel to the ground, the y-axis was perpendicular to the ground pointing upward, and the z-axis was parallel to the ground pointing away from the sagittal plane (Ito et al., 2009; Cyples et al., 2012). The loggers recorded the *g*-force on the *x*-, *y*-, and *z*-axes at 1-min intervals from 48 h preinoculation until 80 h postinoculation, and the data were downloaded using Onset HOBOWare software (Onset Computer Corp.), which converted the *g*-force readings into degrees of tilt. These data were exported into Excel (Microsoft Corp., Redmond, WA). Data were selected to keep lying/standing positions of the cows only when these activities were undisturbed by humans (Figure 1). This information was used to determine whether the cow was standing or lying. A macro was subsequently used to calculate

the percentage of undisturbed time spent lying and the number of postural (standing/lying) changes per hour.

Physiological Measurements

Blood samples were collected by venipuncture from the jugular vein to determine physiological parameters at regular intervals from 0 h (i.e., just before *E. coli* inoculation), up to 80 h postinoculation (Figure 1). Blood samples were collected into evacuated tubes containing Na₂-EDTA (2 tubes of 10 mL) or lithium heparin (2 tubes of 10 mL).

Haptoglobin and SAA plasma concentrations were determined by immunoprecipitation (Auboiron et al., 1990) and by ELISA kit (catalog no. TP 802, Tridelata Development Ltd., Maynooth, Co. Kildare, Ireland). Central body temperature was monitored every 30 min using a ruminal sensor (Thermobolus, Medria Elevage, Châteaubourg, France), validated to monitor dairy cows' health in commercial farms (Bareille et al., 2014).

Plasma cortisol concentration was determined by radioimmunoassay (Boissy and Bouissou, 1994). High-

performance liquid chromatography was used to measure plasma concentrations of oxidized and reduced glutathione (GSH/GSSG; Martin and White, 1991).

Statistical Analyses

From the cows' response to *E. coli* mammary inoculation (i.e., counts of *E. coli* and SCC in milk), we identified 4 main phases of mastitis: phase 0 corresponded to times before inoculation (−48 to 0 h), phase 1 included 4 to 8 h postinoculation; phase 2, 12 to 24 h postinoculation; and phase 3, 32 to 80 h postinoculation.

For behavioral data recorded through the behavior evaluation scheme, we established behavioral categories ("item" in Table 1) that comprised several behavioral criteria (e.g., the item "miscellaneous abnormal behaviors" comprised normorexia and/or rumination, foot stamping, hyporexia or anorexia, and absence of rumination). For each cow in each phase and for each criterion, we multiplied its frequency of observation by its initial score, giving a weighted score. In each behavioral item, we first summed all the weighted scores for each cow at each phase and then divided this by the maximum reachable weighted score. The final composite score for each behavioral item was thus expressed on a 0–1 value scale.

To eliminate the circadian rhythm effect on the cows' lying behavior (Veissier et al., 1989), we weighted the data relating to lying behavior (i.e., time spent lying and number of postural changes per hour) by the observations at the same hour on the day before challenge. We then calculated a ratio = (data from hour H_i to hour H_j observed postchallenge)/(data at hour H_i to hour H_j recorded 24 h prechallenge) for further analyses. This allowed us to assess the variation in postinoculation lying behavior indicators from baseline levels.

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

We performed a factorial discriminant analysis to statistically discriminate the phases of mastitis disease. Discriminant analysis highlights the variables on which the q groups differ and identifies at most $q - 1$ linear combinations of variables that best discriminate the groups (Lebart et al., 1995). We ran the analysis using all the behavioral and physiological measures (inflammation, oxidative stress, HPA). To interpret the discriminant components (axes) of the factorial discriminant analysis, we focused on variables with a correlation of absolute value with the axis >0.3 . We estimated the performances of the final predictive model on the

current data set by running a leave-one-out cross-validation, which calculates the probability for each animal to be accurately classified in the correct mastitis phase (Arlot and Celisse, 2010). This multiparametric analytical approach enabled us to calculate the probability of each cow belonging to each phase. The number of cows correctly classified after cross-validation enabled us to calculate the performance of the final model: accuracy [(true positive + true negative)/(true negative + false negative + true positive + false positive)], sensitivity (percentage of cows correctly predicted to belong to a phase; true positive/true positive + false negative), and specificity (percentage of cows correctly predicted to not belong to a phase; true negative/true negative + false positive). Finally, we compared cows' responses between phases, taking into account the variables from the final model (see above). Because sample size was small ($n = 6$ cows) and variables followed a non-normal distribution, nonparametric Friedman and post hoc Dunn tests were used. We fixed the significance threshold at $P = 0.05$, and a trend was considered when $0.05 < P < 0.10$. Analyses were performed using R 3.3.2 (R Core Team, 2014) and XLSTAT 2015 (Microsoft Excel, <https://www.xlstat.com/>).

RESULTS

Response to *E. coli* Inoculation and Determination of Mastitis Phases

All cows included in the data set tested positively for *E. coli* bacteria upon inoculation. This model resulted in acute clinical mastitis, confirmed by the high variations in the number of *E. coli* and SCC in milk during the observation period (Figure 2). From the cows' response to *E. coli* mammary inoculation, we identified 4 main phases of mastitis: phase 0 corresponded to times before inoculation, phase 1 (4 to 8 h postinoculation), phase 2 (12 to 24 h postinoculation), and phase 3 (32 to 80 h postinoculation).

In phase 0, cows were free of mammary infection (no growth in milk) and had SCC of 14.5×10^3 cells/mL (range: 8×10^3 to 37×10^3 cells/mL; Figure 3). We detected a significant increase in *E. coli* concentration in phase 1 (median, 5,515 cfu/mL; range: 250–440,000 cfu/mL), followed by a decrease in phase 2 (5,050 cfu/mL; range: 470–290,000 cfu/mL) and phase 3 (385 cfu/mL; range: 0–156,000 cfu/mL; Figure 3). A significant increase in SCC was observed in phase 2 (median, 42.1×10^6 cells/mL, range: 7.27×10^6 to 195.6×10^6 cells/mL) and phase 3 (median, 12.9×10^6 cells/mL, range: 3.22×10^6 to 85.0×10^6 cells/mL), but values remained low in phase 1 (62.0×10^3 cells/mL, range: 9.00×10^3 to $1,174 \times 10^3$ cells/mL), compared with baseline levels

(14.5×10^3 cells/mL range: 8.0×10^3 to 37×10^3 cells/mL; Figure 3).

Cows' Lying Behavior Before Inoculation

The percentage of undisturbed time spent lying and the number of postural changes per 24 h from 6 Holstein-Friesian cows before inoculation with *E. coli*, from (relative to time zero, inoculation) -23 h to -17 h (i.e., 0000 to 0700 h, same time of day compared with phase 1), from -13.5 h to -0.5 h (i.e., 1030 to 2330 h, same time of day compared with phase 2), and from -23.5 h

to -0.5 h (i.e., 2330 h the day before to 00 30, same time of day compared with phase 3), are presented in Figure 4. These data were used as baseline levels to further calculate the variation in time lying and in the number of postural changes for phase 1, phase 2 and phase 3.

Discrimination of Pain Experienced by Cows During Phases of Mastitis

Data on all indicators are detailed in Table 2. In phase 0, cows had low levels for all variables. Compared

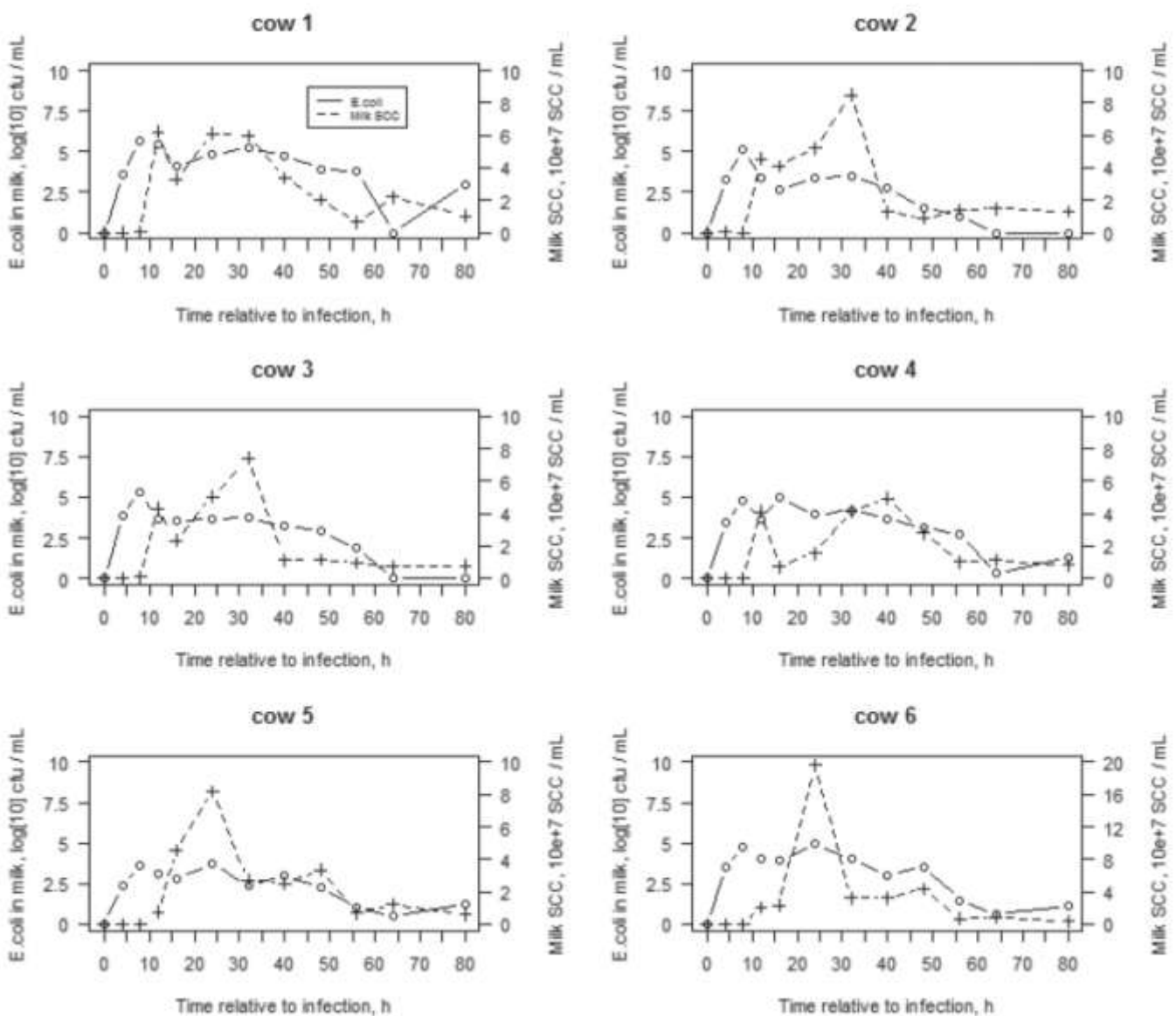


Figure 2. Individual changes in *Escherichia coli* count in milk (\log_{10} cfu/mL) and SCC in milk (10^3 cells/mL) from 6 Holstein-Friesian cows inoculated with *E. coli* at 0 h.

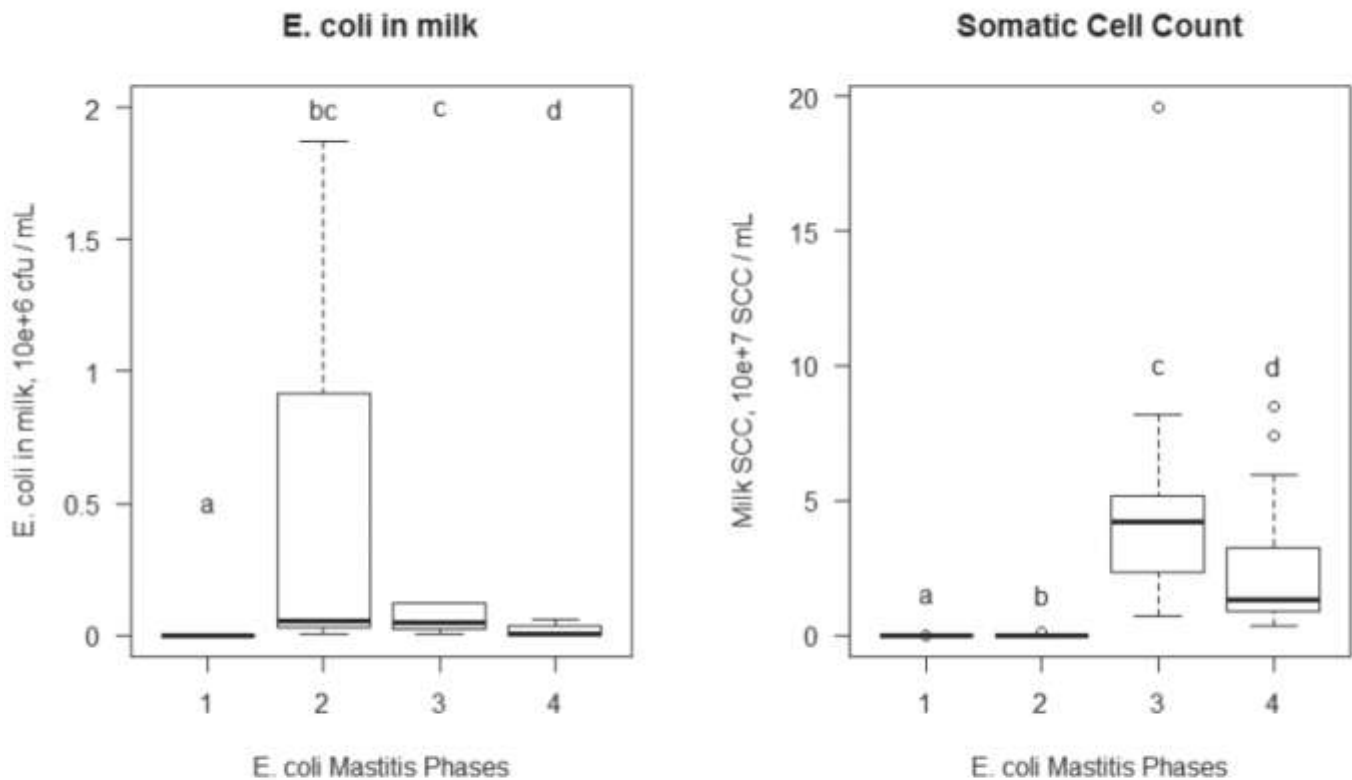


Figure 3. Changes in *Escherichia coli* count in milk (cfu/mL) and SCC in milk (10^7 cells/mL) from 6 Holstein-Friesian cows inoculated with *E. coli*, at 0 h in phase 0 (before inoculation), phase 1 (4 to 8 h postinoculation), phase 2 (12 to 24 h postinoculation), and phase 3 (32 to 80 h postinoculation). Plots with different letters (a-d) differ significantly at $P < 0.05$. Line represents the median (50% of data is greater than this value, which is the middle of data set); box represents the upper (25% of data are greater than this value) and lower (25% of data less than this value) quartiles; whiskers represent the minimum (least value, excluding outliers) and the maximum (i.e., greatest value, excluding outliers); and open circles represent outliers (more than 3/2 times of upper quartile or less than 3/2 times of lower quartile).

with phase 0, cows in phase 1 changed position (lying/standing) less often ($P < 0.05$), were less attentive toward their surroundings and had lower head positions ($P < 0.05$), and showed a small (but nonsignificant) increase in cortisol level ($P = 0.06$). Compared with phase 0, cows in phase 2 were less attentive toward their surroundings and had lower head positions ($P < 0.05$), showed more clinical signs ($P < 0.05$); they also had higher cortisol, SAA and ruminal temperature levels ($P < 0.05$). Finally, cows in phase 3 had higher haptoglobin and SAA levels and higher GSH/GSSG ratio than in phase 0 ($P < 0.05$) but showed no changes in their behavior, in cortisol level, or ruminal temperature.

Discrimination of the 4 phases was tested (Table 3 and Figure 5). Axes 1 and 2 contributed to 61.9 and 37.2%, respectively, of the variance explained by the model. Axis 1 was mostly explained (correlation of each variable to the component) by ruminal temperature (-85.8), cortisol (-76.2), haptoglobin (67.7), cows' tail position (-51.4), SAA (41.8), cows' attention and head

position (-30), and variation in the number of postural changes per hour (30.9). This axis opposed cows in phase 2 to cows in phase 3, with cows in phases 0 and 1 being intermediate.

Axis 2 was mostly explained by SAA (87.1), cows' clinical signs (72.1), haptoglobin (71.6), cortisol (46.7), cows' tail position (44.7), ruminal temperature (43.5), and ear position (30.5). This axis opposed cows in phases 0 and 1 to cows in phases 2 and 3. Figure 4 suggests that (1) the lower the level of the indicators, the more likely the cow is to be in phase 0; (2) the higher the ruminal temperature, cortisol level, and scores for attention and head position, tail position, and the lower the variation of number of postural changes, the more likely the cow is to be in phase 2, and (3) the higher the haptoglobin and SAA levels and score for clinical signs, the more likely the cow is to be in phase 3. After cross-validation, the cows were correctly classified in their original phases for phases 2 and 3, but with lower performance for phases 0 and 1 (Table 4).

DISCUSSION

More attention has been focused on pain associated with mastitis over the last decade, but generally only 1 or 2 types of indicators are explored at a time (e.g., behavior, clinical signs, or inflammation). To our knowledge, this study is the first to give a more extensive overview of the whole response, including possible signs of pain, to a mammary challenge, integrating all aspects (behavior, stress response, inflammation, and oxidative stress). This study is also one of the first to define the timeline of behavioral and physiological observation according to *E. coli* growth in the udder and

the cow's immune response (SCC). Previous studies described such responses, but summarized and presented the data for each day (e.g., at d +1, +2, +3, and so on; Fogsgaard et al., 2012). Here, we defined the timeline of observation according to the phases of the disease (preclinical, acute, and remission), and identified the most painful phases. Despite a small number of dairy cows, the findings raise new hypotheses to be tested in larger controlled studies in the field. Our findings should be evaluated against a distinct, separate, and larger set of observations to further validate the model proposed here. These data could be provided by different mastitis challenge experiments (e.g., *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, or other *E. coli* stains) or from naturally occurring clinical cases of mastitis in which the pathogen would have been identified. In addition, the timeline of the cows' response to other pathogens and the associated signs of sickness and of pain should be monitored: some data are available for several *E. coli* strains, but less regarding *Strep. uberis* (Kester et al., 2015) or *Staph. aureus*. Such knowledge will allow farmers and veterinarians to identify when a cow is experiencing pain and to initiate pain relief treatment accordingly.

The short- and medium-term effects of *E. coli* udder inoculation were assessed using both immediate and less immediate indicators. Variations in plasma cortisol and behavior are widely used as indicators of stress in studies on painful procedures such as dehorning or castration (Grøndahl-Nielsen et al., 1999; Coetzee, 2013; Millman, 2013), and also during mastitis (Hopster et al., 1998; Leslie and Petersson-Wolfe, 2012). In these studies, cortisol concentrations increased 2- to 5-fold compared with controls, reflecting high stress levels induced by pain. In our study, we used these indicators alongside less immediate indicators of inflammation (Eckersall et al., 2001) and oxidative stress (Salvemini et al., 2011; Sharma et al., 2016) to obtain a comprehensive overview of the pain experienced by cows.

Before inoculation, baseline levels of plasma cortisol, haptoglobin, SAA, and ruminal body temperature corresponded to the basal values reported in the literature (Hopster et al., 1998; Eckersall et al., 2001; Wenz et al., 2001). The cows expressed no particular behavioral signs of sickness (González et al., 2008; Fogsgaard et al., 2012) or pain (Weary et al., 2006). They spent 55.5% of their undisturbed time lying and changed position 1.18 times per hour, slightly higher than previously published studies on healthy cattle (Ito et al., 2009; Fogsgaard et al., 2012). Thus, before inoculation, the 6 cows did not appear to experience any kind of pain or discomfort.

Escherichia coli proliferated rapidly in milk within 8 h postinoculation, reaching concentrations above 5,500

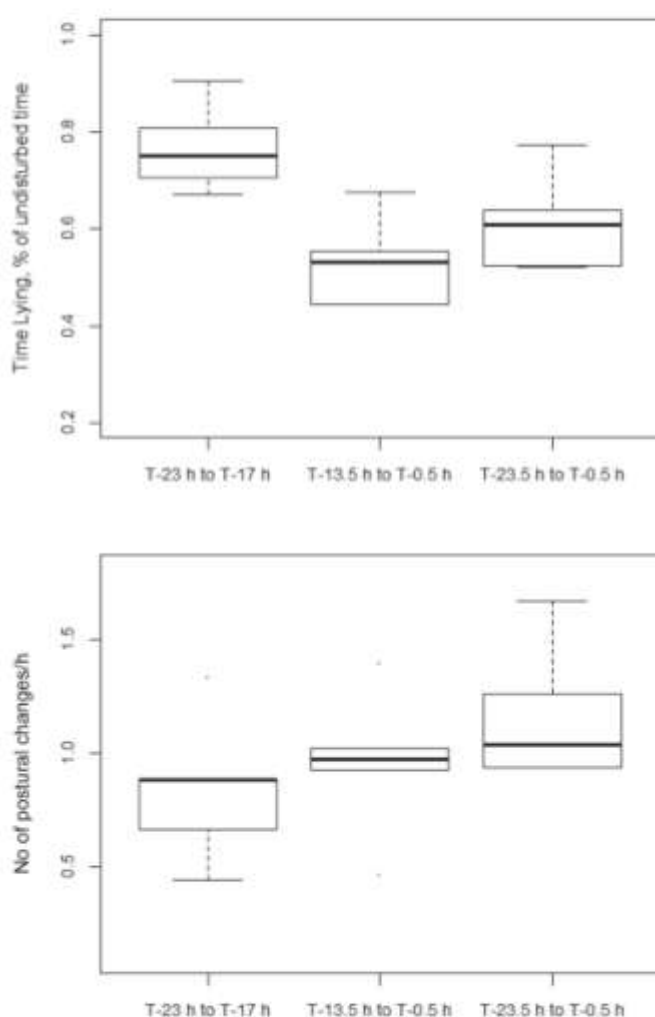


Figure 4. Percentage of undisturbed time spent lying (top panel) and number of postural changes per 24 h (bottom panel) from 6 Holstein-Friesian cows before inoculation with *Escherichia coli*, relative to time (T)0 (time of inoculation): T-23 h to T-17 h (i.e., same moment in the day as phase 1), from T-13.5 h to T-0.5 h (i.e., same moment in the day as phase 2), and from T-23.5 h to T-0.5 h (i.e., same moment in the day as phase 3).

Table 2. Median values [minimum–maximum] of indicators from 6 Holstein-Friesian cows inoculated with *Escherichia coli* at 0 h before inoculation (phase 0), phase 1 (4 to 8 h postinoculation), phase 2 (12 to 24 h postinoculation), and phase 3 (32 to 80 h postinoculation)

Indicator	Phase 0	Phase 1	Phase 2	Phase 3
Behavior				
Score, 0 to 1 value scale				
General attitude (attention and head position)	0.06 [0.00–0.38] ^a	0.63 [0.00–1.00] ^b	0.54 [0.17–0.83] ^b	0.35 [0.15–0.65] ^{ab}
Ear position	0.13 [0.00–0.25]	0.50 [0.00–1.00]	0.50 [0.00–1.00]	0.50 [0.00–1.00]
Facial expression	0.00 [0.00–0.00]	0.00 [0.00–0.00]	0.00 [0.00–0.00]	0.00 [0.00–0.00]
Standing posture	0.00 [0.00–0.00]	0.00 [0.00–0.00]	0.00 [0.00–0.00]	0.00 [0.00–0.00]
Limb posture	0.00 [0.00–0.25]	0.00 [0.00–0.00]	0.00 [0.00–0.33]	0.00 [0.00–0.40]
Lying position	0.00 [0.00–0.00]	0.00 [0.00–0.50]	0.00 [0.00–0.00]	0.00 [0.00–0.00]
Miscellaneous abnormal behaviors	0.00 [0.00–0.00]	0.00 [0.00–0.00]	0.00 [0.00–0.11]	0.00 [0.00–0.07]
Tail position	0.00 [0.00–0.00]	0.00 [0.00–0.00]	0.25 [0.00–0.50]	0.05 [0.00–0.10]
Clinical signs	0.00 [0.00–0.05] ^a	0.00 [0.00–0.00] ^a	0.07 [0.00–0.07] ^b	0.08 [0.00–0.16] ^{ab}
Time lying, % (variation from baseline ¹)	1.00 [1.00–1.00]	1.05 [0.77–1.26]	0.98 [0.91–1.84]	1.11 [0.94–1.25]
No. of postural changes/h (variation from baseline ¹)	1.00 [1.00–1.00] ^a	0.75 [0.33–1.00] ^b	0.92 [0.33–1.00] ^{ab}	1.01 [0.71–1.15] ^a
Inflammation				
Haptoglobin, mg/mL	0.00 [0.00–0.00] ^a	0.00 [0.00–0.00] ^a	0.05 [0.00–0.07] ^{ac}	0.57 [0.47–0.76] ^{bc}
Serum amyloid A, µg/mL	0.00 [0.00–37.5] ^a	13.6 [0.00–48.6] ^{ab}	100.3 [71.8–132.5] ^{bc}	269.1 [181.7–317.4]
Ruminal temperature, °C	39.0 [38.9–39.3] ^a	39.0 [38.9–39.3] ^a	40.3 [39.9–40.5] ^b	39.0 [38.9–39.1] ^a
Hypothalamic-pituitary-adrenal axis				
Cortisol, ng/mL	3.14 [2.10–8.22] ^a	15.0 [4.49–24.3] ^{ab}	31.3 [22.6–38.1] ^b	9.96 [7.99–15.5] ^{ab}
Oxidative stress				
GSH/GSSG ratio ²	0.13 [0.06–0.50] ^{ab}	0.14 [0.09–0.31] ^a	0.16 [0.11–0.32] ^{ab}	0.21 [0.19–0.42] ^b

^a–^c Values within a row with different letters differ significantly (Friedman and post hoc Dunn test, $P < 0.05$).

¹Baseline corresponds to data recorded before *E. coli* challenge from –23 to –17 h (i.e., 0000 to 0700 h) for phase 1; from –13.5 to –0.5 h (i.e., 2330 to 1030 h) for phase 2, and from –23.5 to –0.5 h (i.e., 2330 to 0030 h) for phase 3.

²Ratio of oxidized and reduced glutathione.

Table 3. Factorial discriminant analysis on physiological and behavioral indicators from 6 Holstein-Friesian cows inoculated with *Escherichia coli* indicating proportion of variance explained by each component and correlation of each variable to the component¹

Factorial discriminant analysis	Axis 1	Axis 2
Eigenvalue	0.98	0.92
Total variance explained by component, %	61.9	37.2
Contribution of each variable to components		
Behavior (score)		
Attention and head position*	–30.0	18.0
Ear position	–13.0	30.5
Limb posture	12.6	24.7
Lying position	2.1	–16.7
Miscellaneous abnormal behaviors	–13.5	27.5
Tail position*	–51.4	44.7
Clinical signs*	11.8	72.1
Variation in time lying, % (total undisturbed time)	–16.6	26.9
Variation in no. of postural changes/h (undisturbed time)*	30.9	9.5
Inflammation		
Haptoglobin, mg/mL*	67.7	71.6
Serum amyloid A, µg/mL*	41.8	87.1
Ruminal temperature, °C*	–85.8	43.5
Hypothalamic-pituitary-adrenal axis		
Cortisol, ng/mL*	–76.2	46.7
Oxidative stress		
GSH/GSSG ratio ²	23.2	18.9

¹Bold indicates variables that contributed most to the component.

²Ratio of oxidized and reduced glutathione.

*Variable differed significantly between phases ($P < 0.05$).

cfu/mL. This was followed, 12 to 24 h postinoculation, by a steep increase in SCC due to a huge influx of white blood cells in the milk. This resulted in a decrease in the *E. coli* population, which reverted to baseline levels from 32 to 80 h postinoculation. Although inter-individual variations were observed, the profiles of the *E. coli* development and cellular response of the 6 cows fit the typical overall pattern described in the literature (Schukken et al., 2011). Because the severity of the mastitis disease correlates strongly with *E. coli* count in milk (Schukken et al., 2011), we proposed to assign the mastitis course into 4 phases as follow: baseline (phase 0), preclinical phase (0–8 h postinoculation, phase 1), acute phase (12–24 h postinoculation, phase 2), and remission phase (32–80 h postinoculation, phase 3).

For the first 8 h postinoculation, *E. coli* bacteria increased in milk. Simultaneously, SCC and inflammation markers (haptoglobin, SAA, and ruminal body temperature) remained at baseline levels, and a very small increase in plasma cortisol level ($P = 0.06$) was observed, illustrating the beginning of the stress response. Cows expressed behavioral changes: they were less attentive toward their surroundings and changed less often their posture (lying/standing), which could be due to the endotoxin response. Siivonen et al. (2011) also reported longer standing bouts on the day following an LPS challenge, whereas Cyples et al. (2012) did not find variation in the duration of lying bouts fol-

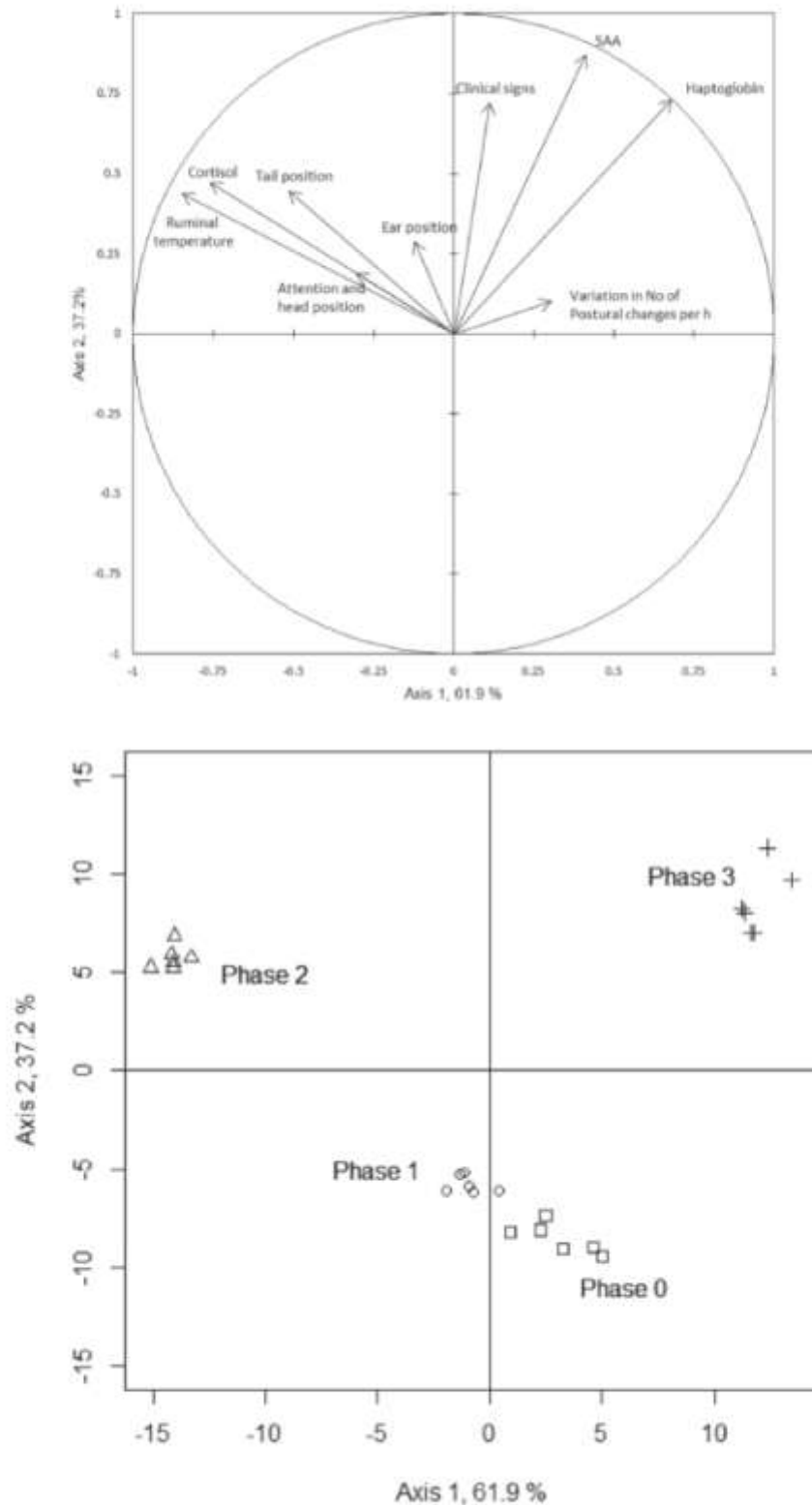


Figure 5. Factorial discriminant analysis on physiological and behavioral indicators from 6 Holstein-Friesian cows inoculated with *Escherichia coli*, in phase 0 (before inoculation), phase 1 (4 to 8 h postinoculation), phase 2 (12 to 24 h postinoculation), and phase 3 (32 to 80 h postinoculation): loadings of the variables with an absolute correlation >0.30 (A) and of the individuals (B) on axis 1 and axis 2 of the factorial discriminant analysis. SAA = serum amyloid A.

lowing LPS challenge. An LPS challenge nevertheless does not reflect on-farm conditions because, unlike our experimental procedure, LPS-associated mastitis does not involve live bacteria. Rather, our findings reflect the typical decrease in activity observed in sick animals (Veissier et al., 2017) as described following an *E. coli* challenge (Fogsgaard et al., 2012). Cows may also have moved less to limit the pressure on the udder when changing posture (e.g., from standing to lying; Stewart et al., 2017). In addition, cows were less attentive toward their surroundings and lowered their heads. This behavior has been described in cattle experiencing sickness (Hart, 1988) and also in several painful situations (for a review, see Weary et al., 2006). Our findings are consistent with those of Gleerup et al. (2015), who included 2 mastitic cows in their sample. Hence, during the initial phase of *E. coli* proliferation, dairy cows may experience some discomfort due to sickness. Pain is a stressor that causes a biological stress response (Viñuela-Fernández et al., 2011). Here, behavioral changes were not associated with a stress response, suggesting that cows did not feel pain during the preclinical phase of mastitis. Observed sickness-related changes could be due to systemic effects of bacteria development rather than local pain due to inflammation.

During the mastitis acute phase, *E. coli* concentrations started to decrease, and SCC increased, enabling inhibition of bacterial growth through phagocytosis and killing (Schukken et al., 2011). Cows had high levels of SAA and increased ruminal temperature, parameters associated with an inflammatory response (Eckersall et al., 2001; Schukken et al., 2011). The timeline of these responses was similar to that in previous studies (Fitzpatrick et al., 2013). In these animals, Herry et al. (2017) reported a peak in concentration of the 3 major proinflammatory cytokines—tumor necrosis factor- α , IL- β , and IL-6—at 12 h postinoculation. Cows kept displaying behavioral changes related to sickness (they were less attentive toward their surroundings) and they had higher cortisol levels. Cortisol elevation has been investigated poorly during mastitis although it is a good indicator of the stress response (Hopster et al., 1998). The magnitude of the cortisol response observed here (35 ng/mL) in response to *E. coli* mastitis was higher

than values previously reported in studies on mastitis following *E. coli* LPS challenge (25 ng/mL; Hopster et al., 1998), during ruminocentesis without anesthesia (14.5 ng/mL; Mialon et al., 2012), or disbudding of calves without anesthesia (4.5 ng/mL; Caray et al., 2015). Our results suggest that cows probably experienced high levels of stress at the start of the inflammatory response and displayed behavioral changes. Additional measures of nociception (Fitzpatrick et al., 2013) would have helped us to better understand whether the observed changes were due to sickness behavior or pain per se. However, according to the behavioral and physiological responses observed, we assume that the acute phase of mastitis might have been associated with cows feeling pain.

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

The animals were fitted with data loggers and rumen temperature sensors—devices used in precision livestock farming. We found that a decrease in the number of postural changes was associated with *E. coli* population growth, and that an increase in ruminal temperature was associated with the start of immune response. Our results suggest that automated lying behavior and ruminal temperature recordings could be valuable on-farm tools for early detection of mastitis, especially to detect the phase of the disease and the associated pain and discomfort in cattle. However, because all animals involved in the current study were healthy before inoculation and the *E. coli* mastitis was experimentally induced, the knowledge gathered here from the preclinical phase (phase 1) cannot be directly applied to cows in commercial settings, especially for early detection of *E. coli* mastitis. Although we took the circadian rhythm of the animal into account in

Table 4. Cross validation of the factorial discriminant analysis (accuracy, sensitivity and specificity) on physiological and behavioral indicators from 6 Holstein-Friesian cows inoculated with *Escherichia coli* in phase 0 (before inoculation), phase 1 (4 to 8 h postinoculation), phase 2 (12 to 24 h postinoculation), and phase 3 (32 to 80 h postinoculation)

From/toward ¹	Phase 0	Phase 1	Phase 2	Phase 3	Accuracy, %	Sensitivity, %	Specificity, %
Phase 0	4	2	0	0	83.3	66.7	88.9
Phase 1	2	4	0	0	83.3	66.7	88.9
Phase 2	0	0	6	0	100	100	100
Phase 3	0	0	0	6	100	100	100

¹After cross-validation, the 6 cows in phase 0 were classified as follows: 4 cows in phase 0 and 2 cows in phase 1.

the analysis, our results must be carefully interpreted, especially because lying behavior was recorded during small bouts. Additional studies with a larger number of undisturbed cows are needed to further validate these hypotheses and to propose models of early detection of disease in dairy cows.

CONCLUSIONS

The present study showed changes in behavior, inflammation, and stress levels in dairy cows after udder inoculation with *E. coli*, indicating that the cows may have felt pain during this period. From *E. coli* and SCC counts in milk, we characterized 4 phases of the disease: before inoculation, preclinical, acute, and remission. The multiparametric approach showed good performance in discriminating these phases. Behavior, inflammation, and the HPA axis played the most important part in this discrimination, confirming that a combination of indicators increases the chance of detecting pain and assessing its intensity. Behavior and HPA axis, but not inflammation indicators, were found to be useful in early detection of mastitis. Cows seemed to experience discomfort during the preclinical phase and pain during the acute phase of the disease. The remission phase did not seem to induce any discomfort in the animals. Pain always has negative effects on animal welfare. Accordingly, when preclinical and acute phases of mastitis are detected in dairy cows, pain relief treatment should be considered. However, additional specific measures of pain response assessed (e.g., pain threshold response; weight shifting between the rear legs; or by flinch, step, and kick response during milking) could help to characterize the level of pain experienced by the cow according to the phase of the disease and thus to alleviate it. This would improve animal welfare and potentially reach the remission phase faster.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the project KOLIMASTIR of the Animal Health and Welfare (ANIHWA) Era-Net (www.anihwa.eu). The authors are grateful for the efforts of the animal caretakers from the Plate-forme d'Infectiologie Expérimentale (PFIE) Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Nouzilly, France, for excellent animal husbandry.

REFERENCES

- Arlot, S., and A. Celisse. 2010. A survey of cross-validation procedures for model selection. *Statist. Surv.* 4: 40-79. <https://doi.org/10.1214/09-SS054>.
- Auboiron, S., D. A. Sparrow, L. Beaubatie, D. Bauchart, J. T. Sparrow, P. M. Lapland, and M. J. Chapman. 1990. Characterization and amino-terminal sequence of apolipoprotein AI from plasma high density lipoproteins in the preruminant calf, *Bos spp.* *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 166:833-839.
- Bareille, N., L. Videcoq, J.-B. Davière, M. Johan, S. Godin, E. Leyrat-Bousquet, J.-P. Lemonnier, J.-M. Lamy, and A. Chanvallon. 2014. Detection of the health disorders of dairy cows by the measurement of their ruminal temperature. Pages 15-18 in *Rencontres Recherches Ruminants*. 21st ed. INRA, Paris, France.
- Blum, S., N. Sela, E. D. Heller, S. Sela, and G. Leitner. 2012. Genome analysis of bovine-mastitis-associated *Escherichia coli* O32:H37 strain P4. *J. Bacteriol.* 194:3732. <https://doi.org/10.1128/JB.00535-12>.
- Boissy, A., and M. F. Bouissou. 1994. Effects of androgen treatment on behavioral and physiological responses of heifers to fear-eliciting situations. *Horm. Behav.* 28:66-83. <https://doi.org/10.1006/hbeh.1994.1006>.
- Caray, D., A. de Boyer des Roches, S. Frouja, S. Andanson, and L. Veissier. 2015. Hot-iron disbudding: stress responses and behavior of 1- and 4-week-old calves receiving anti-inflammatory analgesia without or with sedation using xylazine. *Livest. Sci.* 179:22-28. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2015.05.013>.
- Coetzee, J. F. 2013. Assessment and management of pain associated with castration in cattle. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 29:75-101. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2012.11.002>.
- Cyples, J. A., C. E. Fitzpatrick, K. E. Leslie, T. J. DeVries, D. B. Haley, and N. Chapinal. 2012. Short communication: The effects of experimentally induced *Escherichia coli* clinical mastitis on lying behavior of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 95:2571-2575. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-5135>.
- de Oliveira, F. A., S. P. L. Luna, J. B. do Amaral, K. A. Rodrigues, A. C. Sant'Anna, M. Daolio, and J. T. Brondani. 2014. Validation of the UNESP-Botucatu unidimensional composite pain scale for assessing postoperative pain in cattle. *BMC Vet. Res.* 10:200. <https://doi.org/10.1186/s12917-014-0200-0>.
- Eckersall, P. D., F. J. Young, C. McComb, C. J. Hogarth, S. Safi, A. Weber, T. McDonald, A. M. Nolan, and J. L. Fitzpatrick. 2001. Acute phase proteins in serum and milk from dairy cows with clinical mastitis. *Vet. Rec.* 148:35-41.
- European Food Safety Authority. 2009. Scientific report of EFSA prepared by the Animal Health and Animal Welfare Unit (AHAW) on the effect of farming systems on dairy cow welfare and disease. Annex to the EFSA Journal 1143:284. <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/1143r.pdf>.
- Faure, M., V. Paulmier, A. Boissy, A. de la Foye, A. de Boyer des Roches, and D. Durand. 2017. A multiparametric approach to discriminate the impacts of different levels of invasiveness of surgical procedures in sheep. *Animal* <https://doi.org/10.1017/S1751731117000805>.
- Fitzpatrick, C. E., N. Chapinal, C. S. Petersson-Wolfe, T. J. DeVries, D. F. Kelton, T. F. Duffield, and K. E. Leslie. 2013. The effect of meloxicam on pain sensitivity, rumination time, and clinical signs in dairy cows with endotoxin-induced clinical mastitis. *J. Dairy Sci.* 96:2847-2856. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5855>.
- Fitzpatrick, J. L., A. M. Nolan, F. J. Young, C. J. Hogarth, T. McDonald, A. Weber, P. D. Eckersall, and H. C. Davidstmon. 2000. Objective measurement of pain and inflammation in dairy cows with clinical mastitis. Page 416 in *Proc. Int. Symp. Veterinary Epidemiology and Economics*, Breckenridge, CO. International Symposia on Veterinary Epidemiology and Economics, Breckenridge, CO.
- Flecknell, P. 2008. Analgesia from a veterinary perspective. *Br. J. Anaesth.* 101:121-124. <https://doi.org/10.1093/bja/aen087>.
- Fogsgaard, K. K., T. W. Bennedsgaard, and M. S. Herskin. 2015. Behavioral changes in freestall-housed dairy cows with naturally occurring clinical mastitis. *J. Dairy Sci.* 98:1730-1738. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8347>.
- Fogsgaard, K. K., C. M. Rontved, P. Sørensen, and M. S. Herskin. 2012. Sickness behavior in dairy cows during *Escherichia coli* mas-

- titis. *J. Dairy Sci.* 95:630-638. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4350>.
- Gleerup, K. B., P. H. Andersen, L. Munksgaard, and B. Forkman. 2015. Pain evaluation in dairy cattle. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 171:25-32. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2015.08.023>.
- González, L. A., B. J. Tolkamp, M. P. Coffey, A. Ferret, and I. Kyriazakis. 2008. Changes in feeding behavior as possible indicators for the automatic monitoring of health disorders in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 91:1017-1028. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0530>.
- Grøndahl-Nielsen, C., H. B. Simonsen, J. Damkjær Lund, and M. Hesselholt. 1999. Behavioural, endocrine and cardiac responses in young calves undergoing dehorning without and with use of sedation and analgesia. *Vet. J.* 158:14-20. <https://doi.org/10.1053/tvjl.1998.0284>.
- Hart, B. L. 1988. Biological basis of the behavior of sick animals. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 12:123-137. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(88\)80004-6](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(88)80004-6).
- Herry, V., C. Gittou, G. Tabouret, M. Repérant, L. Forge, C. Tasca, F. B. Gilbert, E. Guittou, C. Barc, C. Staub, D. G. E. Smith, P. Germon, G. Foucras, and P. Rainard. 2017. Local immunization impacts the response of dairy cows to *Escherichia coli* mastitis. *Sci. Rep.* 7:3441. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03724-7>.
- Hopster, H., J. T. N. van der Werf, and H. J. Blokhuis. 1998. Stress enhanced reduction in peripheral blood lymphocyte numbers in dairy cows during endotoxin-induced mastitis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 66:83-97. [https://doi.org/10.1016/S0165-2427\(98\)00189-5](https://doi.org/10.1016/S0165-2427(98)00189-5).
- Hudson, C., H. Whay, and J. Huxley. 2008. Recognition and management of pain in cattle. In *Pract.* 30:126-134. <https://doi.org/10.1136/inpract.30.3.126>.
- Huxley, J. N., and H. R. Whay. 2006. Current attitudes of cattle practitioners to pain and the use of analgesics in cattle. *Vet. Rec.* 159:662-668. <https://doi.org/10.1136/vr.159.20.662>.
- Ito, K., D. M. Weary, and M. A. G. Von Keyserlingk. 2009. Lying behavior: Assessing within- and between-herd variation in freestall-housed dairy cows. *J. Dairy Sci.* 92:4412-4420. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2235>.
- Kester, H. J., D. E. Sorter, and J. S. Hogan. 2015. Activity and milk compositional changes following experimentally induced *Streptococcus uberis* bovine mastitis. *J. Dairy Sci.* 98:999-1004. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8576>.
- Lebart, L., M. Piron, and A. Morineau. 1995. Statistique exploratoire multidimensionnelle. Dunod, Paris, France. http://horizon.documentation.ird.fr/exl-doc/pleins_textes/divers11-10/010007837.pdf.
- Leslie, K. E., and C. S. Petersson-Wolfe. 2012. Assessment and management of pain in dairy cows with clinical mastitis. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 28:289-305. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2012.04.002>.
- Martin, J., and I. N. H. White. 1991. Fluorimetric determination of oxidised and reduced glutathione in cells and tissues by high-performance liquid chromatography following derivatization with dansyl chloride. *J. Chromatogr.* 568:219-225. [https://doi.org/10.1016/0378-4347\(91\)80356-H](https://doi.org/10.1016/0378-4347(91)80356-H).
- Martin, P., and P. Bateson. 2013. *Measuring Behaviour: An Introductory Guide*, 3rd ed. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- McDougall, S., M. A. Bryan, and R. M. Tiddy. 2009. Effect of treatment with the nonsteroidal antiinflammatory meloxicam on milk production, somatic cell count, probability of re-treatment, and culling of dairy cows with mild clinical mastitis. *J. Dairy Sci.* 92:4421-4431. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2284>.
- Mialon, M.-M., V. Deiss, S. Andanson, F. Anglard, M. Doreau, and I. Veissier. 2012. An assessment of the impact of rumenocentesis on pain and stress in cattle and the effect of local anaesthesia. *Vet. J.* 194:55-59. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2012.02.019>.
- Millman, S. T. 2013. Behavioral responses of cattle to pain and implications for diagnosis, management, and animal welfare. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 29:47-58. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2012.11.007>.
- Mølgaard, L., B. M. Damgaard, V. Bjerre-Harpoth, and M. S. Herskin. 2012. Effects of percutaneous needle liver biopsy on dairy cow behaviour. *Res. Vet. Sci.* 93:1248-1254. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2012.04.001>.
- Molony, V., and J. E. Kent. 1997. Assessment of acute pain in farm animals using behavioral and physiological measurements. *J. Anim. Sci.* 75:266-272.
- Prunier, A., L. Mounier, P. Le Neindre, C. Leterrier, P. Mormede, V. Paulmier, P. Prunet, C. Terlouw, and R. Guatteo. 2013. Identifying and monitoring pain in farm animals: A review. *Animal* 7:998-1010. <https://doi.org/10.1017/S1751731112002406>.
- R Core Team. 2014. R Version 2.14.03.3.2. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.R-project.org/>.
- Robertson, I. S., J. E. Kent, and V. Molony. 1994. Effect of different methods of castration on behaviour and plasma cortisol in calves of three ages. *Res. Vet. Sci.* 56:8-17. [https://doi.org/10.1016/0034-5288\(94\)90189-9](https://doi.org/10.1016/0034-5288(94)90189-9).
- Salvemini, D., J. W. Little, T. Doyle, and W. L. Neumann. 2011. Roles of reactive oxygen and nitrogen species in pain. *Free Radic. Biol. Med.* 51:951-966. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.01.026>.
- Schukken, Y. H., J. Gunther, J. Fitzpatrick, M. C. Fontaine, L. Goetze, O. Holst, J. Leigh, W. Petzl, H. J. Schuberth, A. Sipka, D. G. Smith, R. Quesnell, J. Watts, R. Yancey, H. Zerbe, A. Gurjar, R. N. Zadoks, and H. M. Seyfert. 2011. Host-response patterns of intramammary infections in dairy cows. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 144:270-289. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2011.08.022>.
- Sharma, L., A. K. Verma, A. Rahal, A. Kumar, and R. Nigam. 2016. Relationship between serum biomarkers and oxidative stress in dairy cattle and buffaloes with clinical and sub-clinical mastitis. *Biotechnology* 15:96-100. <https://doi.org/10.3923/biotech.2016.96.100>.
- Siivonen, J., S. Taponen, M. Hovinen, M. Pastell, B. J. Lensink, S. Pyörälä, and L. Hänninen. 2011. Impact of acute clinical mastitis on cow behaviour. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 132:101-106. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2011.04.005>.
- Stewart, M., M. T. Wilson, A. L. Schaefer, F. Huddart, and M. A. Sutherland. 2017. The use of infrared thermography and accelerometers for remote monitoring of dairy cow health and welfare. *J. Dairy Sci.* 100:3893-3901. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-12055>.
- Theurer, M. E., B. J. White, J. F. Coetzee, L. N. Edwards, R. A. Mosher, and C. A. Cull. 2012. Assessment of behavioral changes associated with oral meloxicam administration at time of dehorning in calves using a remote triangulation device and accelerometers. *BMC Vet. Res.* 8:48. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-8-48>.
- Veissier, I., P. Le Neindre, and G. Trillat. 1989. The use of circadian behaviour to measure adaptation of calves to changes in their environment. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 22:1-12. [https://doi.org/10.1016/0168-1591\(89\)90075-0](https://doi.org/10.1016/0168-1591(89)90075-0).
- Veissier, I., M. M. Mialon, and K. H. Sloth. 2017. Early modification of the circadian organization of cows' activity in relation to disease or estrus. *J. Dairy Sci.* 100:3969-3974. <http://dx.doi.org/https://doi.org/10.3168/jds.2016-11853>.
- Vinuela-Fernández, I., D. Weary, and P. Flecknell. 2011. Pain. Pages 64-77 in *Anim. Welfare*. M. C. Appleby, J. A. Mench, A. S. Olsson, and B. O. Hughes, ed. CAB International, Wallingford, UK.
- Weary, D. M., L. Niel, F. C. Flower, and D. Fraser. 2006. Identifying and preventing pain in animals. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 100:64-76. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2006.04.013>.
- Wenz, J. R., G. M. Barrington, F. B. Garry, R. P. Dinsmore, and R. J. Callan. 2001. Use of systemic disease signs to assess disease severity in dairy cows with acute coliform mastitis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 218:567-572.

Nom, prénom : Lussert Alexandra

Titre : ANALYSE MULTIPARAMETRIQUE ET EVALUATION COMPORTEMENTALE LORS DE MAMMITE EXPÉRIMENTALE A *ESCHERICHIA COLI* CHEZ LA VACHE LAITIÈRE

Résumé :

La mammite est une maladie majeure dans les élevages laitiers. L'étude du comportement lors de mammite est relativement récent. Dans un contexte où la prévention de l'antibio-résistance et le bien-être animal sont devenus des enjeux de société, une meilleure compréhension de ses mécanismes et de ses conséquences sur la douleur est nécessaire. L'approche globale de notre étude a défini les phases d'une mammite à *Escherichia coli* expérimentale chez des vaches Prim'Holstein, afin de suivre les variations cliniques, inflammatoires, immunitaires et comportementales. L'utilisation d'analyses factorielles discriminantes met en avant des indicateurs de mammite pertinents, parmi les variables étudiées dans chaque catégorie. Ainsi, l'état émotionnel des vaches évalué par le biais du « Qualitative Behaviour Assessment », l'état d'éveil, la position de la tête et des oreilles, l'agitation pendant la traite et le comportement de couchage sont de bons indicateurs pour le suivi de la douleur et/ou de l'inconfort lors de cette maladie.

Mots-clés : *Escherichia coli*, mammite, multiparamétrique, comportement, douleur, vache

Name : Lussert Alexandra

Title : MULTIPARAMETRIC ANALYSIS AND BEHAVIOUR ASSESSMENT THROUGHOUT INDUCED *ESCHERICHIA COLI* MASTITIS ON DAIRY CATTLE

Abstract :

Mastitis is a major disease in dairy cattle, which has a great economic and animal welfare impact. Behaviour changes during a mastitis episode have been considered recently in research. Currently, at a time where prevention of antibiotic resistance and animal welfare become societal issues, a better understanding of mastitis-associated mechanisms and of its painful consequences is required. Global approach used in our study specifies and uses phases of experimentally-induced *Escherichia coli* mastitis in Holstein-Friesian cattle to follow clinical, inflammatory, immune and behavioural variations. Using factorial discriminative analyses, our work identifies the proper indicators of mastitis in each category of studied variables. Here, we show that cow affective state using "Qualitative Behaviour Assessment", alertness, head and ears positions, restlessness during milking, and lying behaviour are good follow-up indicators of pain or discomfort during this disease.

Key-words : *Escherichia coli*, mastitis, multiparametric, behaviour, pain, cattle