



Université  
de Toulouse

# THÈSE

En vue de l'obtention du

## DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par *L'Institut National Polytechnique*

Discipline ou spécialité : *Pathologie, Toxicologie, Génétique & Nutrition*

---

Présentée et soutenue par *Iltud MADEC*

Le *19 mai 2008*

**Titre :** *Effets du sémi chimique MHUSA (Mother Hens' Uropygial Secretion Analogue) sur le stress des poulets de chair.*

*Approches zootechnique, physiologique et comportementale.*

---

### JURY

*Pr Jean DAYDE, Président.*

*Pr Xavier MANTECA, Rapporteur.*

*Pr Giovanni RE, Rapporteur.*

*Pr Patrick PAGEAT, Tuteur.*

*Dr Jean-François GABARROU, Tuteur.*

*Pr Xavier FERNANDEZ, Membre.*

*Dr Anne-Marie LESENEY, Membre.*

---

**Ecole doctorale :** *Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries*  
**Unité de recherche :** *Institut de Recherche Phérosynthèse, Ecole d'Ingénieurs de Purpan*

**Directeur(s) de Thèse :** *Pr Vassilia THEODOROU*

**Rapporteurs :** *MM. les Pr X. MANTECA et G. RE*

# SOMMAIRE

Remerciements

Liste des publications

Liste des sigles et abréviations

Liste des illustrations

## ***INTRODUCTION***

**Partie I** : contexte de l'étude

**Partie II** : objectifs de travail et résultats

**Partie III** : discussion générale

## ***CONCLUSION***

Bibliographie

Table des matières

« On aime sa mère presque sans le savoir,  
et on ne s'aperçoit de toute la profondeur  
des racines de cet amour qu'au moment  
de la séparation dernière. »

Guy de Maupassant

## Remerciements

Ce mémoire n'est pas un aboutissement, mais une étape. Néanmoins ce moment marque, comme tous les moments forts d'une vie. Il faut maintenant passer à autre chose en se servant de cette dernière comme d'un atout. Cette étape m'a vu grandir et évoluer vers une certaine forme de maturité, j'espère en faire partager mon entourage. C'est ce dernier, tant professionnel que personnel (parfois les deux sont conjugués), que je souhaite remercier dans ce message.

Je voudrais avant tout remercier tous les membres du jury, dont une force, à l'heure de la mondialisation, est de compter MM Xavier MANTECA et Giovanni RE, respectivement espagnol et italien, comme rapporteurs de mon travail. C'est pour moi une grande fierté.

Bénéficiaire du soutien de MM Jean DAYDE et Xavier FERNANDEZ apporte un crédit scientifique supplémentaire au jugement de mon travail. Merci à eux de me faire l'honneur de leur présence.

Pour m'avoir fait toucher la recherche et m'avoir accompagné dans mes années étudiantes, je souhaite remercier Jean-François GABARROU, de l'Ecole d'Agriculture de PURPAN. Je le remercie également d'avoir eu confiance en mes capacités et d'avoir mis ce travail sur les rails, conjointement avec PHEROSYNTHESE, dont je suis un témoin de l'évolution depuis ces quelques (huit !) années passées. Son Directeur, Patrick PAGEAT, a été un formidable relais en ce qui concerne ma formation scientifique. Je lui sais aussi, et surtout, gré de m'avoir apporté autre chose qu'uniquement une connaissance et une formation scientifique, dont je ne pouvais me satisfaire.

Anne-Marie LESENEY a, quant à elle, observé le long cheminement qui m'a fait l'homme que je suis aujourd'hui ; il était inconcevable de ne pas l'avoir dans ce jury de qualité.

Enfin, je remercie vivement Vassilia THEODOROU pour avoir pris la direction de cette thèse, mais que des obligations professionnelles ont empêchée d'assister à la soutenance.

PHEROSYNTHESE est une équipe qui a beaucoup évolué. C'est un plaisir de partager un aboutissement tel que ce travail avec tous ses membres. J'y suis arrivé comme salarié, j'y ai aujourd'hui des attaches. Au sein de cet Institut de recherche, M Hugues de LEYSSAC, sans jamais remettre mes choix scientifiques en cause, a débloqué les fonds nécessaires à la bonne marche de mon travail : je le remercie de cette marque de confiance.

Le long processus aboutissant à ce mémoire m'a fait passer par divers types de travaux. Le bureau est une chose, mais la recherche ne se conçoit pas sans

« manips ». A PHEROSYNTHESE, à l'INRA de Tournefeuille (salut à toute l'équipe, particulièrement à Mathilde et à Hélène pour leur aide), dans les élevages (hommage aux travaux de Anne, de Delphin et de Didier ; à la collaboration du Dr Chabrol, de M Grinan et des éleveurs).

Une réussite comme celle-ci ne peut aboutir sans soutien personnel. Toutes les personnes qui sont à l'origine de ce que je suis aujourd'hui y ont contribué. Je voudrais citer en particulier mes parents, géniteurs qui ont ensuite façonné le personnage, doivent être fiers du fiston. Personnellement, je suis fier des expériences acquises grâce à eux. Notre famille est dispatchée entre quatre zones géographiques (très) éloignées, mais la mondialisation nous rapproche.

Ce soutien vient aussi des proches, que l'on reconnaît dans les moments difficiles où la peur est plus forte que tout. Bruno, Lionel et Dominique sont de ceux-là parce qu'ils savent comment je fonctionne. Les proches nous soutiennent et nous aident : merci à mes deux correctrices attitrées pour leur acharnement à me faire écrire français.

Ce soutien vient aussi des très proches. Pour boucler la boucle de cette tirade et reparler d'étape, nous y sommes une fois de plus. Celle-ci est différente. J'espère que tout ce que nous avons connu jusqu'à présent est anecdotique par rapport à ce qui nous arrivera, ensemble. Quoiqu'il arrive.

## Liste des publications

### Journaux à comité de lecture

---

✦ Madec, I., J.F. Gabarrou, H. Eutamene, C. Lecuelle, L. Bougrat, M. Levêque, V. Theodorou and P. Pageat. Influence of a mother-hen odorous secretion on the hypothalamic-pituitary-adrenal and immune reaction in domestic chickens (*Gallus gallus domesticus*) experiencing a standardized stress-eliciting situation. Soumis pour publication à *Brain Behaviour and Immunity*, le 02 août 2008.

✦ Madec, I., J.F. Gabarrou, E. Gaultier, J. Bowen and P. Pageat. Effects of a maternal odorant on innate fear response in domestic chickens (*Gallus gallus*). Soumis pour publication à *Applied Animal Behaviour Science*, le 19 mars 2008.

✦ Madec, I., J.F. Gabarrou, D. Moulin, L. Bougrat, C. Lafont-Lecuelle and P. Pageat. Effects of a semiochemical on Conversion Index and related indicators on fast growing broilers housed during 42 days. Accepté pour publication à *Poultry Science*, sous réserve de modifications, version révisée soumise le 21 mars 2008.

✦ Madec, I., J.F. Gabarrou, D. Saffray and P. Pageat Broilers (*Gallus gallus*) are less stressed if they can smell a mother odorant. Accepté pour publication au *South African Journal of Animal Science*, publication prévue dans le Vol. 38 n°3, août 2008.

✦ Madec, I., J.F. Gabarrou and P. Pageat. Influence of a maternal odorant on copying strategies in chicks facing isolation and novelty during a standardized test. Accepté pour publication à *Neuro-Endocrinology Letters*, publication prévue dans le Vol. 29 n°4, août 2008.

✦ Madec, I., P. Pageat, L. Bougrat, D. Saffray, C. Lafont, C. Falewee, M.A. Gervasoni, A. Bollart and J.F. Gabarrou. 2006. Influence of a Semiochemical Analogue on Growing Performances and Meat Quality of Broilers. *Poult. Sc.*, 85, 2112-2116.

✦ Madec, I., P. Pageat, L. Bougrat, C. Lecuelle-Lafont, D. Saffray, C. Falewee, A. Bollart, P. Chabrol and J.F. Gabarrou. 2008. Influence of a preen gland secretion on growth and meat quality of heavy broilers. *Animal*, 2:4, 631-635.

✦ Madec, I., J.F. Gabarrou, D. Guillaumey, L. Bougrat, C. Lecuelle and P. Pageat. 2008. Are 35 days enough to observe a reduction of stress by using a hen's semiochemical analogue on chickens (*Gallus gallus domesticus*) housed under high density? *Poult. Sc.*, 87, 222-225.

## Congrès et parutions dans les annales de journaux à comité de lecture

---

- ✦ Madec, I., J.F. Gabarrou, A. Bruneau, L. Bougrat, D. Saffray, B. Silliart and P. Pageat. 2004. The use of a hen's odorant analogue to control stress consequences in broilers. *Poult. Sc.*, 83, suppl. 1, 920.
- ✦ Madec, I., J.F. Gabarrou, A. Bollart and P. Pageat. 2006. Effects of a semiochemical analogue on meat quality of twelve weeks old label broilers (preliminary results). *World's Poult. Sc. J.* 62, suppl., 253.
- ✦ Madec, I., J.F. Gabarrou, D. Guillaume and P. Pageat. 2006. Effects of a semiochemical analogue on stress parameters of four weeks old broilers (preliminary results). *World's Poult. Sc. J.* 62, suppl., 577.
- ✦ Madec, I., J.F. Gabarrou, D. Moulin, D. Guillaume and P. Pageat. 2008. Using a semiochemical enhances growth and reduces stress in fast growing broiler chickens (*Gallus gallus*). Preliminary results. *Poult. Sc.* 64, suppl. 2, 322-323.
- ✦ Madec, I., E. Gaultier, J.F. Gabarrou and P. Pageat. 2008. A mother-hen odorant reduces stress reactions in chickens (*Gallus gallus*). *Poult. Sc.* 64, suppl. 2, 382.
- ✦ Madec, I., J.F. Gabarrou, V. Theodorou, H. Eutamene and P. Pageat. Using a mother-hen odorant reduces stress and moderates the immune system in chickens (*Gallus gallus*). Preliminary results. *Poult. Sc.* 64, suppl. 2, 269.

## Congrès avec comité de lecture

---

- ✦ Pageat, P., I. Madec, D. Saffray, C. Lafont. 2004. Picking and mutual feather picking in poultries: differential diagnosis. *Proceedings AVSAB, Philadelphia, USA*, 35-36.
- ✦ Madec, I., D. Saffray, J.F. Gabarrou, C. Lafont, L. Bougrat, J. Gigante and P. Pageat. 2005. Comparison of the behaviour of three groups of chickens during their growth. *Proceedings 5th IBVM, Minneapolis USA*, 78-81.
- ✦ Madec, I., J.F. Gabarrou, D. Saffray, C. Lafont, M.A. Gervasoni, A. Bollart and P. Pageat. 2005. Influence of a putative appeasing pheromone on behaviour of broilers: a tool for a better understanding of behaviour – preliminary results. *Proceedings 5th IBVM, Minneapolis USA*, 257-261.
- ✦ Alnot-Perronin, M., I. Madec, C. Lafont and P. Pageat. 2006. Behavioral and biological evaluation of psittacids suffering of stress-related disorders. *Proceedings 12th ECABM, Ghent, Belgium*, 44-45.

## Liste des sigles et des abréviations

ACTH : Adreno Cortico Tropic Hormone

APP : Accute Phase Protein

BEA : Bien Etre Animal

CHOL : Cholestérol (total)

CS : Corticostérone

DFD : Dark Firm Dry

ELISA : Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay

FAO : Food and Agriculture Organisation

GLU : Glycémie (taux de glucose circulant)

GMQ : Gain Moyen Quotidien

HLR : Ratio Hétérophiles/Lymphocytes

IC : Indice de Consommation

IHVM : Hyperstrié Ventral Intermédiaire et Médian

MHUSA : Mother Hen Uropygial Secretion Analogue

PC : Poids de Carcasse

PSE : Pale Soft Exudative

PV : Poids Vif

TI : Tonic Immobility

TRIGLY : Triglycérides

TVM : Taux de Viande Maigre

## Liste des illustrations

Illustration 1 : comparaison des conditions de vie entre élevage industriel et habitat naturel pour le poulet moderne.....	17
Illustration 2 : causes et conséquences des comportements déviants du poulet domestique .....	18
Illustration 3 : inadaptation des conditions de vie du poulet domestique.....	20
Illustration 4 : caractérisation des types d'élevages industriels de poulets .....	21
Illustration 5 : vue d'ensemble d'incubateurs d'oeufs .....	22
Illustration 6 : manipulations lors du tri des poussins .....	22
Illustration 7 : vue d'ensemble d'un bâtiment d'élevage .....	23
Illustration 8 : représentation de la densité d'élevage .....	23
Illustration 9 : les « fives freedoms » .....	25
Illustration 10 : enrichissement du milieu, exemple des perchoirs .....	26
Illustration 11 : réduire les conflits physiques, les lunettes.....	27
Illustration 12 : stress et système nerveux .....	33
Illustration 13 : le ratio hétérophyles/lymphocytes.....	34
Illustration 14 : taille relative des bulbes olfactifs.....	38
Illustration 15 : rapport entre bulbe olfactif et hémisphère cérébral.....	39
Illustration 16 : trajet des odeurs chez l'oiseau.....	40
Illustration 17 : situation anatomique de la glande uropygiale.....	43
Illustration 18 : histologie de la glande uropygiale et glandes sébacées.....	44
Illustration 19 : histologie de la glande uropygiale, les lobes internes.....	45
Illustration 20 : histologie de la glande uropygiale, schéma de coupe .....	45
Illustration 21 : démonstration de l'importance de la présence maternelle pour le jeune...	49

Illustration 22 : chromatogrammes à l'origine de la création de MHUSA .....	50
Illustration 23 : étapes amenant à la création de MHUSA.....	51
Illustration 24 : le bloc diffuseur de MHUSA .....	52
Illustration 25 : influence de MHUSA sur le poids d'abattage .....	54
Illustration 26 : valeurs du Ratio Hétérophiles/Lymphocytes (HLR) et de corticostérone (CS) selon le sexe et le type de production (essais en élevage).....	55
Illustration 27 et 28 : marqueurs de stress lors d'un isolement en cage de verre .....	55
Illustration 29 : influence de MHUSA sur le taux de corticostérone de poulets lors d'un isolement en cage de verre .....	56
Illustration 30 : influence de MHUSA le ratio hétérophiles/lymphocytes de poulets lors d'un isolement en cage de verre .....	56
Illustration 31 : influence de MHUSA sur la production de IFN $\gamma$ lors d'un isolement de poulets en cage de verre.....	56
Illustration 32: influence de MHUSA sur la production de IL6 lors d'un isolement de poulets en cage de verre .....	57
Illustration 33 : test de choix.....	57
Illustration 34: influence de MHUSA sur le comportement des poulets.....	58
Illustration 35 : influence de MHUSA sur le comportement des poulets face à un évènement potentiellement stressant.....	58
Illustration 36: visiteur vs prédateur et MHUSA vs placebo (comportement) .....	58
Illustration 37 : stress et items comportementaux .....	59
Illustration 38 : isolation de poulets en cage de verre .....	145
Illustration 39 : descriptif du tunnel pour le test de choix.....	147
Illustration 40 : exemple de grille de position.....	149
Illustration 41 : apparition des hormones du stress .....	151
Illustration 42 : calcul théorique d'un indice de consommation .....	158
Illustration 43 : modélisation du stress en élevage.....	161
Illustration 44 : comment comparer la native et MHUSA.....	163

# **Introduction**

En dépit de l'opposition fréquente entre les intérêts des Hommes et des animaux, le bien-être animal est devenu une variable d'intérêt majeur prise en compte par l'Homme. Duncan et Fraser (1997) définissent trois aspects du bien-être animal. Le premier concerne l'esprit, incluant des sensations opposées comme le plaisir et la souffrance ; le deuxième le corps, dont les maladies et les blessures représentent l'essentiel ; le troisième l'expression d'un comportement libre. Cette description constitue une marque de respect de l'Homme envers l'animal, auquel on reconnaît une vie psychique personnelle.

Dans les années 1960, au Royaume-Uni, apparaissent les premiers bâtiments accueillant des animaux, notamment des poules élevées en cage. Nous sommes alors entré dans une période de confrontation entre les besoins de l'Homme et ceux de l'animal. Aujourd'hui ce dilemme est d'autant plus crucial que la production mondiale de viande animale doit augmenter parallèlement à la démographie planétaire. Le poulet (avec le porc) devient la viande dont le taux de production connaît le plus fort accroissement (Speedy, 2003). On peut avancer que la production de poulet possède un potentiel de progression plus important que celle de porc. D'abord, dans les pays industrialisés, les consommateurs sont à la recherche d'une nourriture « saine » : maigre, facile à cuisiner. Parallèlement, les éleveurs attendent des retours financiers les plus réguliers possibles. La filière de production exige également des produits faciles à transporter, transformer et emballer, ce à quoi répondent les techniques modernes. Ensuite, le poulet représente une viande qui peut être consommée dans le monde entier. Elle ne souffre d'aucun rejet dû à la religion (à l'inverse du porc pour les musulmans, des vaches sacrées en Inde...), à la taille de l'animal (pas d'obligation de conserver les restes de l'animal tué, facilité d'élevage...), à sa qualité organoleptique (facilité de préparation, viande maigre...) ou à sa transformation (taille des emballages, facilité de stockage...). Enfin, le poulet élevé pour sa viande possède un excellent rendement nourriture/gain de poids. Pour ces raisons, nous nous sommes intéressé à la production de poulets de chairs (élevé pour sa viande).

Les besoins alimentaires humains expliquant les productions industrielles actuelles, contrôlées et autorisant des pertes minimales, comment alors se nourrir en respectant les besoins fondamentaux des animaux ? La logique commerciale actuelle doit satisfaire une demande sociale sévère en trois parties : le prix devra être compétitif, la qualité du produit irréprochable et le respect du bien-être animal pris en compte et transparent. Or, les techniques de production actuelles ne permettent pas d'atteindre simultanément ces trois objectifs, car orientées vers une vente à bas prix, elles se font le plus souvent au détriment du bien-être et/ou de la qualité du produit (l'animal). Afin de permettre aux producteurs de volailles de répondre aux attentes sociales tout en continuant à être rémunérés par leur activité, il convient de déterminer les verrous bloquant la mise en place de la réalisation harmonieuse des trois attentes (prix, qualité et bien-être animal) imposées par cette demande sociale. Nous pouvons imaginer tenter de conjuguer les nécessités de l'Homme et celles du poulet domestique, en partant des besoins de ce dernier, plutôt que de ceux du premier. Diminuer le stress animal peut permettre de réconcilier les objectifs de production avec les attentes des consommateurs. D'abord, en obtenant une viande de meilleure qualité due à la diminution de comportements déviants. Ensuite en optimisant les rapports de productivité dus à une mobilisation des énergies pour la croissance animale. Enfin, en apportant une meilleure image de la production dans la mesure où les animaux subissent des stress moins intenses.

Diverses méthodes existent pour diminuer l'impact du stress chez les animaux. Des résultats prometteurs, montrant un moindre impact du stress, ont été obtenus en mettant des mammifères dans un environnement olfactif similaire à celui qu'ils auraient au contact de leur mère (Pageat et Gaultier, 2003). Fort de ce constat, nous nous proposons de tester une hypothèse similaire en prenant comme modèle animal le poulet domestique. Ce

travail s'avère novateur à deux points de vue. D'abord, il s'agit de la première tentative effectuée sur un non mammifère, ce qui induit le second point : le lien d'attachement maternel, présent par défaut chez les mammifères, est en élevage potentiellement inexistant. Le poulet élevé pour sa viande n'a jamais été, n'est pas et ne sera jamais en contact avec sa mère. L'apprentissage de l'odeur maternelle n'a donc pas pu avoir lieu, ce qui suppose des conditions d'étude différentes de celles testées sur mammifères. L'approche choisie consiste à mettre le poussin, au premier jour d'élevage, dans une atmosphère rassurante se rapprochant artificiellement de celle créée par la mère.

Notre projet est de déterminer les effets d'un bouquet moléculaire nommé MHUSA (*Mother Hens' Uropygial Secretion Analogue*), un analogue de sécrétion de poules suitées, sur le poulet. A cet effet, nous dressons, dans un premier temps, un état des conditions d'existence du poulet domestique. Nous retraçons l'évolution historique de sa domestication pour comprendre les particularités de l'élevage moderne. Les causes et conséquences du stress qu'il subit dans de telles situations sont ensuite présentées, avant d'aborder l'olfaction et la communication chimique chez les oiseaux, domaines qui constituent le fondement de notre hypothèse. Dans un deuxième temps nous décrivons les objectifs du travail et les moyens mis en œuvre pour le mener à bien. A partir de là, nous développons notre approche par l'expérimentation. Les clés d'interprétation zootechnique, physiologique et comportementale nous permettent d'évaluer les répercussions de la diffusion de MHUSA dans l'atmosphère des poulets. Les résultats sont présentés sous forme de communications scientifiques, dont 6 articles publiés ou acceptés pour publication. Dans la troisième partie, la discussion générale, les résultats sont repris, synthétisés et analysés. Nous terminons sur les perspectives et les possibilités d'extension de notre travail.

# **Partie I : contexte de l'étude**

Le poulet domestique

Le stress

Olfaction et communication

# Chapitre I : le poulet domestique

## 1. Ses origines zoologiques

---

La domestication des espèces animales dans un but nutritif pour l'Homme a entraîné ce dernier à sélectionner des animaux ayant une capacité à croître rapidement et à se reproduire facilement. Appleby *et al.* (2004) ont recherché les origines de la poule domestique telle que nous la connaissons aujourd'hui. D'après eux, son ancêtre est la *red jungle fowl* (coq doré ou coq bankiva).

Selon la classification taxinomique, l'oiseau que nous allons étudier tout au long de ce travail fait partie de l'embranchement *Chordata*, de la classe *Aves*, Ordre *Galliformes*, famille des *Phasianidae* et du genre *Gallus*. On considère qu'il s'agit d'une sous-espèce de la *red jungle fowl* (*Gallus*) et que l'on doit par conséquent lui attribuer le nom binomial : *Gallus gallus* (Linnaeus 1758), ou *Gallus gallus domesticus* puisqu'il s'agit de la poule domestique.

Des annales archéologiques donnent des indices sur la domestication de la poule, en Chine, dès 3200 avant JC (West et Zou, 1988). La revue par Appleby *et al.* (2004) indique des traces vers 6000 avant JC. Différentes sous-espèces de la *red jungle fowl* existent encore en Inde du sud (*Gallus gallus sonnerati*) et de l'est (*G. g. murghti*), en Malaisie (*G. g. spadiceus*), ainsi qu'au Cambodge et en Thaïlande (*G. g. gallus*). Le long de la chaîne de l'Himalaya, ces animaux sont confinés dans des zones denses de végétation et au niveau de l'isotherme 10°C. Il s'agit toutefois d'une espèce adaptable, ce qui explique sa distribution spatiale élargie au monde entier.

## 2. Les étapes de sa domestication

---

Au début de sa domestication, le poulet était sacrifié pour des actes religieux et/ou utilisé pour des **combats** de coqs. Cet animal a alors subi une sélection influencée par le phénotype *guerrier*, relatif au combat. De façon plus générale, Hale (1962) montre que les espèces ayant satisfait à la domestication, que ce soit mammifères ou oiseaux, possèdent des caractéristiques communes. Les animaux issus de ces espèces forment des groupes de taille importante au sein desquels existe une hiérarchie. Un groupe se présente comme un ensemble d'entités d'un mâle pour plusieurs femelles, ce qui constitue un harem. A l'intérieur de celui-ci, le mâle domine les femelles et les signes sexuels sont d'ordre **comportemental** et non sous forme de couleurs ou de caractéristiques morphologiques prononcées.

La structure comportementale des espèces domestiquées dans un but de production a donné l'idée d'un mode d'élevage en grand nombre. La hiérarchie sociale permet d'éviter les bagarres, et la promiscuité permet aux mâles de s'accoupler avec des femelles. Les éleveurs ont **altéré les structures sociales** et/ou les marquages sexuels pour permettre le succès d'accouplements aléatoires. L'importance des relations parents/jeunes est utilisée mais de façon détournée : elles permettent aux jeunes de se socialiser plus facilement à l'Homme ou à d'autres individus que leur parents, mais appartenant à la

même espèce. Le développement précoce réduit aussi la durée de présence parentale, essentielle au jeune.

D'autres composantes comportementales présentent des intérêts particuliers pour l'élevage à fort effectif. On note par exemple la flexibilité des besoins nutritionnels (comme la nécessité de fouiller ou de picorer), l'adaptation à différents climats et le faible besoin de mouvements. Toutefois, lorsque les poulets sont en groupe, l'influence des congénères peut devenir négative : agressions, picage ou, conflits hiérarchiques répétés (si l'effectif est important). Cette dernière situation, retrouvée dans la majorité des élevages industriels actuels, entraîne également une restriction des mouvements, due à l'influence de la combinaison entre la densité, la taille de l'effectif (groupe) et du bâtiment (Gross et Siegel, 1983b). Ainsi, si la *red jungle fowl* est une espèce vivant au sol et adaptable à un large panel d'environnements, les limites de l'adaptabilité du poulet domestique apparaissent avec la **pauvreté de l'environnement** (Jones, 1987).

Historiquement, les Romains ont été les premiers à élever la poule pour la production agricole. Ils ont ainsi créé des races spécialisées (par sélection phénotypique) qu'ils utilisaient avant tout pour la production d'œufs. La domestication pour la production a disparu avec le déclin de l'Empire Romain et n'est réapparue qu'au XIXe siècle. Des sociétés de production ont alors vu le jour, créant des souches dérivées de deux principales origines. Les Brahma, Cocchin, Pekin et Malay sont des souches asiatiques et les Ancona, Andalusian, Leghorn et Minorca sont de type méditerranéen. L'amélioration de ces races s'est effectuée grâce aux croisements et à la sélection, dans un but de productivité, jusqu'à nos jours. On note ainsi 58 races de poules dans le *British Poultry Standards Handbook* et 51 races de poules dans le catalogue *American Standards of Perfection* dans les années 1850. Au début du XXe siècle, la spécialisation des races pour la production de viande apparaît, alors que les poules étaient essentiellement utilisées pour la production d'œufs. Dans les années 1950, la production de viande de poulet s'est localisée aux Etats-Unis, puis s'est répandue au reste du monde. Aujourd'hui la production annuelle de poulets de chair est d'environ **40 milliards de têtes** (selon la FAO). On ne parle plus de races mais de souches qui représentent plutôt des lignées issues de la sélection.

Aujourd'hui, les croisements de souches sont de deux types selon leur spécialisation : production d'œuf ou de viande. Les souches de poulets de chair (production de viande), ou *broilers*, sont issues de races de format important comme les Cornish ou les Plymouth. Elles ont été **sélectionnées** sur le taux de croissance, le rendement en viande, le taux de viande blanche ou l'efficacité alimentaire. Ainsi des indicateurs existent et permettent d'évaluer ces critères. Le **taux de croissance** est caractérisé par le Gain Moyen Quotidien (GMQ, masse prise en moyenne par jour et par un poussin, en g/j). Le rendement en viande est reflété par le différentiel entre le **Poids Carcasse** (PC) et le **Poids Vif** (PV), le taux de viande blanche par la teneur en graisse (relative au pourcentage de **gras abdominal**). L'efficacité de la conversion alimentaire se mesure au travers de l'**Indice de Consommation** (IC, quantité d'aliment nécessaire à une croissance de 1kg de PV de l'animal).

Dans les élevages du XXIe siècle, tout est uniformisé, des souches à la dénomination des catégories d'animaux et leur utilisation. On nomme poulet (*Gallus gallus*) une poule ou un coq pas encore adulte, élevé pour sa chair. Un petit poulet mâle est un coquelet, un poulet femelle une poulette. Un mâle castré est nommé chapon, tandis qu'une poulette adulte n'ayant pas encore pondu est une poularde. Le poulet est généralement **abattu entre 35 et 80 jours**, ce qui correspond à une « bande » d'animaux. On distingue différentes parties d'intérêt dans la découpe du poulet de chair. On retiendra les masses pectorales (les « blancs »), les cuisses, les pattes, les ailes ou le foie. La globalisation a aussi fait son

œuvre dans l'industrie de la volaille si bien que seule une demie douzaine de compagnies produit aujourd'hui les souches commerciales. La connaissance récente du génome de la poule permet d'effectuer une sélection plus précise et plus rapide. Par exemple, la connaissance du gène d'intérêt *dwarf* (récessif), exprimé chez la femelle (ingestion alimentaire réduite, format réduit) et non chez sa descendance, de croissance rapide et de format lourd permet une production plus efficace. On parle aussi de « cous nus » dans l'industrie de la volaille : les poulets ne développent pas de plumes autour du cou durant leur croissance. Cette caractéristique permet aux animaux d'évacuer la chaleur corporelle plus facilement à l'âge adulte. Il s'agit là encore d'une caractéristique issue de la sélection : le gène d'intérêt inhibe la production de plumes au niveau du cou. D'une manière générale, on observe des animaux amorphes à croissance rapide, de grand gabarit avec une forte proportion en viande.

Selon le consortium GKS (2004), la variation entre l'ancêtre des volailles et les volailles actuelles est due à des singlons nucléotidiques. Le consortium de recherche montre que cette variation est faible et qu'elle date de la domestication. Cette étude décrit la variation du génome de poule (2,8 millions de nucléotides) fondée sur la comparaison des séquences de trois races domestiques (une pondeuse, une race à viande et une race asiatique sauvage) avec la *red jungle fowl*. On peut imaginer qu'il existe des réminiscences de cet ancêtre commun chez les souches actuellement utilisées pour la production. Les étapes de la domestication ont surtout apporté des transformations phénotypiques. Le poulet domestique (*Gallus gallus domesticus*) apparaît donc comme un animal ayant des **comportements et des nécessités similaires à celui de son ancêtre**. Par exemple, des poulets domestiques peuvent être élevés dans un environnement sauvage (Savory et Mann, 1997). Le répertoire comportemental du poulet reste par conséquent identique à celui de ses ancêtres sauvages. La différence se situe au niveau de la fréquence (et non de l'existence) des items comportementaux. Les travaux de Desforges et Wood-Gush (1975a et 1975b) indiquent à ce titre que l'espèce domestique montre plus de tolérance, moins d'agressivité et une moindre distance respectée par rapport à la présence de l'Homme.

### **3. Ethologie du poulet domestique**

---

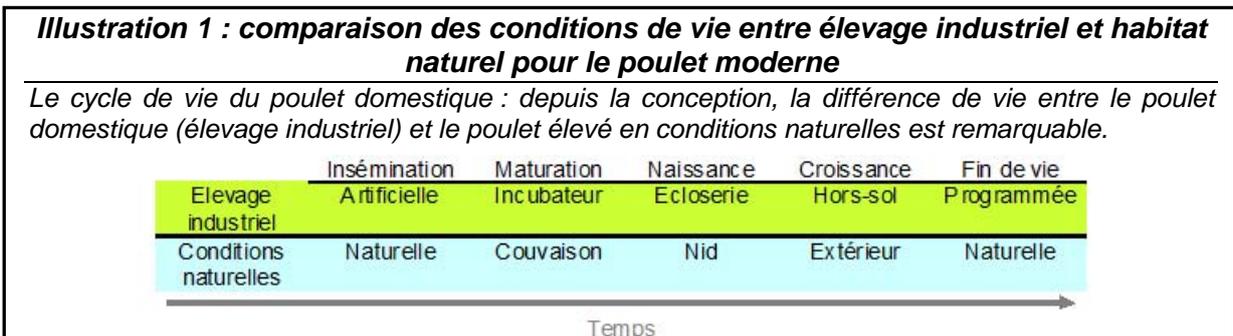
#### **3.1. Expérience, empreinte et attachement**

Selon Lorenz (décrit par Brigandt, 2005), les comportements moteurs sont spécifiques d'une espèce et sont expliqués par l'ancêtre commun duquel les individus de cette espèce descendent. Des comportements instinctifs seraient inscrits dans le génome. Toutefois, le comportement ne peut être réduit à un enchaînement de réflexes, influencés par des stimuli externes. Lorenz met en évidence le fait que les comportements reposent sur un mécanisme de coordination centrale permettant de répondre spécifiquement à des stimuli. La notion de « seuil d'activation » apparaît alors : le comportement ne se déclenche que si le seuil est dépassé. A cela s'ajoutent des mécanismes d'**apprentissage** qui modifient ces seuils. La réussite ou l'échec du **comportement conditionné** est prépondérant dans le niveau du seuil d'activation. Il existe un lien entre la réussite d'une séquence comportementale et son déclenchement futur. Cette importance de l'expérience amène à discuter de la notion d'empreinte.

Lorenz (1937) montre que, dès le premier jour après l'éclosion, les poussins ont la mémoire du premier objet en mouvement qui leur a été présenté et montrent une préférence pour ce dernier en le suivant durant les premiers jours de leur existence. L'auteur qualifie ce comportement d'**empreinte**. Toujours selon Lorenz, elle se distingue des autres formes d'apprentissage par deux caractéristiques. D'abord, la période critique,

de courte durée durant laquelle l’empreinte peut se produire. A l’issue de cette période, l’empreinte est impossible, ou en tout cas très difficile. La seconde caractéristique est l’irréversibilité. Toutefois, cette loi ne semble pas absolue puisque l’on montre par exemple que la potentialité à imprégner décroît de J2 à J4 post éclosion chez le poussin, après quoi l’objet devra être de plus en plus complexe (Parson et Rogers, 1997). Collias (2000) indique que la période passée avec la mère est rassurante pour les poussins et que les comportements de peur et/ou de crainte n’interviennent qu’après la séparation.

Dans les élevages modernes de type industriel, quelle que soit l’espèce animale, les jeunes subissent un stress dû à la séparation d’avec leur mère (sevrage). Cette situation entraîne une augmentation de la concentration des ARNm codant pour les réponses au stress, de l’activité du cerveau et de l’activité de l’hypophyse (Schwerin *et al.*, 2005). Cela indique que le lien avec la mère est quasiment indispensable pour les mammifères, en raison de l’allaitement, que ce soit chez les animaux de rente ou de compagnie (Pageat et Gaultier, 2003). Puisqu’il est montré que les tétrapodes sont communs aux mammifères et aux oiseaux, il semble logique, en reprenant les deux idées précédentes que l’absence du **lien d’attachement chez le poulet** est préjudiciable à son développement. Cette idée, développée par Nicol (2004), reprise dans d’autres publications, selon laquelle les besoins des poulets sont comparables à ceux de leur ancêtre commun, nous amène à discuter des verrous, telle que l’absence maternelle, qui peuvent être forcés et qui subsistent dans les élevages de type industriels. A ce titre, l’illustration 1 présente un parallèle entre les vies d’un poulet d’élevage et son pendant (utopique) dans un milieu naturel. Ainsi, le poussin aurait également **besoin de sa mère** durant une période donnée.



**L’empreinte peut prendre différentes formes**, puisque l’on montre que les poulets réagissent à des couleurs s’ils en ont eu l’expérience et que cela est sous l’influence d’un mécanisme cérébral. Des poussins stimulés par une couleur puis mis dans le noir après avoir subi une ablation du wulst visuel (équivalent du cortex visuel) ne réagissent plus à la présentation de la même couleur (Maekawa *et al.*, 2006). Bateson *et al.* (1977) montrent qu’au niveau neurobiologique, chez le poussin domestique, l’empreinte s’accompagne de modifications chimiques au niveau de l’Hyperstrié Ventral Intermédiaire et Médian (IHVM). La destruction de cette zone empêche les effets de l’entraînement du jeune poussin avec un stimulus. Une empreinte voisine de 360 minutes suffit pour voir apparaître des modifications au niveau synaptique : on constate un accroissement des zones réceptrices post-synaptiques de l’IHVM. Des travaux plus récents confirment cette hypothèse puisque l’expression des protéines du fos (marqueurs de l’activité neuronale) dans l’IHVM augmente 120 minutes seulement après la stimulation de l’individu (Suge et Mc Cabe, 2004). Si on différencie plusieurs types d’empreintes, la plus étudiée reste l’**empreinte filiale**. Il s’agit d’un comportement adaptatif des poussins (la mère sait trouver la nourriture, un lieu permettant le repos et à l’abri des prédateurs...). Suite à l’empreinte filiale, un attachement se développe entre le jeune et ses parents (biologiques ou

adoptifs). Cette empreinte, plus tardive, est qualifiée d'empreinte sexuelle. Elle peut avoir des effets à l'âge adulte, concernant les relations sociales ou le choix du partenaire sexuel. La socialisation commence avant l'éclosion et continue durant la période d'empreinte. Les poussins peuvent également apprendre au travers de comportements de conspécifiques (Collias, 2000). Chez le diamant mandarin (*Taeniopygia guttata*), on montre par exemple que des zones du cortex s'activent lorsque l'animal est mis en présence visuelle d'un partenaire sexuel potentiel (Sadananda et Bischof, 2006).

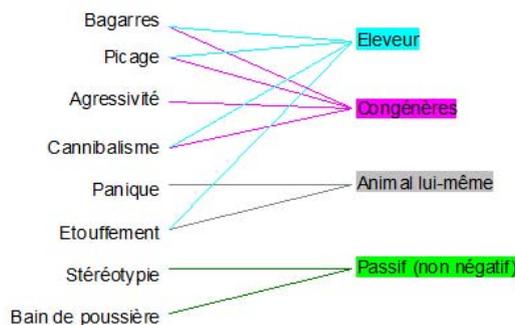
On peut attribuer le terme d'empreinte à d'autres phénomènes. Dans le cas d'une **empreinte environnementale**, les animaux trouvent un chemin vers leur lieu de naissance (cas du saumon, par exemple). Dans les conditions normales, les saumons s'imprègnent de l'odeur complexe du lieu de naissance et la mémorisent. On pourrait à ce titre accrédi-ter l'hypothèse d'une **empreinte olfactive** (Bolhuis et Honey, 1994), aussi nommée **continuité olfactive** (Schaal et al, 2003). Le terme d'**empreinte sociale** fait allusion à une période sensible durant laquelle les contacts sociaux normaux se développent. Ainsi, chez une souche de seiches (*Sepiidae*), des nouveaux-nés mangeront du crabe si leurs aînés le font, alors que spontanément, la préférence ira aux crevettes (Healy, 2006). Les adultes peuvent apprendre à reconnaître leurs jeunes par un phénomène d'empreinte. On parlera alors d'**empreinte parentale**, dont un des exemples les plus connus est la reconnaissance de son agneau par la brebis par l'intermédiaire des cellules mitrales du bulbe olfactif qui permettent l'imprégnation (Signoret *et al.*, 1997). L'empreinte correspond au développement de relations d'attachement sur un modèle de l'environnement, juste après la naissance. Une relation d'attachement se caractérise par un lien affectif envers le sujet (ou l'objet) d'attachement, la présence de ce sujet entraîne un apaisement, un **bien-être** alors que l'absence du sujet entraîne des réactions de **détresse** (Roden et Wechsler, 1997).

### **3.2. Les comportements déviants**

Lorsque le comportement est fonctionnel, cela suggère une interaction positive entre l'environnement et le comportement. Lorsque l'activité diffère de celle attendue, il ne s'agit pas nécessairement d'une malfonction. En élevage de volailles, plusieurs types de comportements déviants sont répertoriés. On qualifie ainsi des activités différentes, ou intervenant à des fréquences supérieures à celles observées dans la « nature ». Elles peuvent être caractérisées par le désavantage qu'elles procurent (illustration 2). Un comportement déviant peut devenir néfaste pour l'individu le pratiquant, pour son entourage ou pour l'éleveur (Appleby *et al.*, 1994).

#### ***Illustration 2 : causes et conséquences des comportements déviants du poulet domestique***

*Relation entre les comportements déviants, à l'origine de stress chez le poulet domestique, et l'univers d'élevage de ce dernier. On constate qu'il y a des interactions entre les différentes causes et conséquences (d'après Appleby *et al.*, 2004).*



Les comportements déviants semblent parfois incompris, si bien qu'on accable souvent l'animal, alors que **l'environnement n'est pas adapté**. Nous pouvons juger de la déviance du comportement du poulet par rapport à ce qui serait considéré comme « normal ». Si les fonctions de l'individu sont correctes, il n'est pas simplement en bonne santé mais montre également des comportements « normaux » : manger, boire, excréter, bouger, respirer et répondre à des stimuli. Tout changement dénote un ou plusieurs soucis. Ainsi un comportement « anormal » dans un élevage industriel de poulets de souche industrielle devient un événement qui différencie cet acte du plus grand nombre dans la même situation (Savory et Mann, 1997). On constate que des poussins émettent des sons particuliers lorsqu'ils se trouvent en présence de nourriture. La sonorité diffère selon la présence ou **l'absence de la mère** (Nicol, 2004). Ce type d'observation est aujourd'hui difficile à entreprendre en élevage industriel. On peut simplement envisager de comparer les cris de poussins avec leur mère à d'autres, sans présence maternelle, en conditions expérimentales.

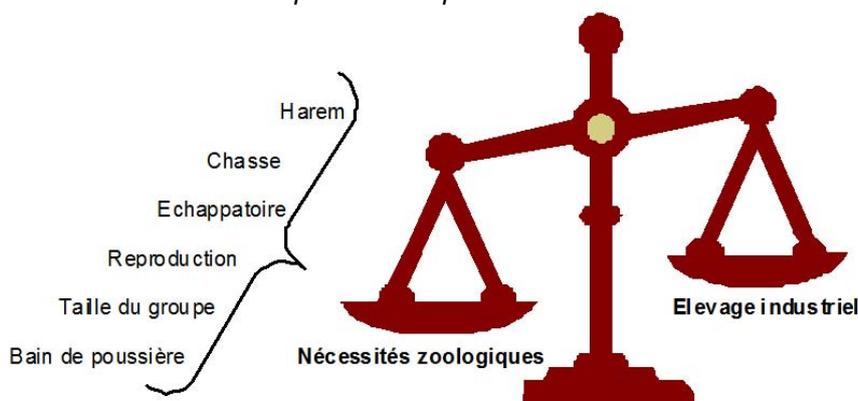
Une vision productiviste et anthropomorphique amènerait à croire qu'une production zootechnique satisfaisante représente un signe de bien-être. A l'opposé, des rendements pauvres (ou moins performants) ne sont pas synonymes de mal-être. Ainsi, l'industrialisation a permis de diminuer l'incidence des maladies, grâce aux vaccins, aux vides sanitaires, à l'évacuation des fientes ou au filtrage de l'air. En revanche, les performances de croissance sont sources de malformations osseuses et cardiaques, observables par des attitudes spécifiques (Puvadolpriod et Thaxton, 2000a). Les variations comportementales observées seront alors adaptatives jusqu'à un seuil au-delà duquel elles deviennent néfastes pour le poulet. Cela montre que des **comportements originels sont encore fonctionnels**, c'est-à-dire qu'ils semblent positifs du point de vue biologique. Par exemple pour l'accès à la nourriture, des comportements autrefois fonctionnels apparaissent aujourd'hui incompatibles avec les techniques d'élevage, puisque l'agressivité pour défendre sa nourriture, par exemple, cause aujourd'hui des défauts de carcasses (griffures, coups de bec). Leonard et Horn (1995) montrent que des coqs de rang inférieur émettent plus de vocalises et se font plus attaquer que les coqs hiérarchiquement supérieurs. Cela montre l'importance des vocalises dans la hiérarchie.

L'environnement d'élevage, aujourd'hui imposé, a été étudié pour être le plus favorable possible au poulet : température, lumière, fréquence des repas... L'âge d'abattage des poulets ne leur permet pas d'atteindre la maturité sexuelle. Le déplacement, une des composantes optionnelle des organismes vivants, n'apparaît pas non plus satisfaite. Les besoins sociaux et physiques ne sont pas assouvis : Jones (1987) montre que l'accès aux bains de poussière et d'eau fait défaut et décrit que la socialisation à l'Homme est défailante à cause des effectifs importants. L'importance du nombre d'individus provoque un manque de stabilisation et de hiérarchie stable (Barnard et Burck, 1979). Ce défaut de structure sociale engendre aussi des phénomènes de picage (Cain *et al.*, 1984). Ces derniers sont préjudiciables à l'animal (bien-être) mais aussi à l'éleveur (déclassement de la carcasse à l'abattoir).

Toutes ces remarques indiquent que **les besoins de l'espèce ne sont pas atteints** et dépendent de l'Homme, qui a focalisé son attention sur les améliorations techniques. L'illustration 3 montre l'incapacité du poulet à s'adapter à l'environnement imposé.

### **Illustration 3 : inadaptation des conditions de vie du poulet domestique**

Prise en considération l'origine du poulet, il apparaît une inadéquation entre les systèmes d'élevage actuels et les besoins de l'animal: l'équilibre n'est pas atteint.



L'observation comportementale d'une espèce constitue une première approche qui permet d'étudier les déviations. Une seconde approche consiste en une observation comparative des espèces, ce qui permet de copier les résultats intéressants et d'éviter de reproduire ceux qui ne le sont pas. Des études montrent par exemple que chez l'oie, mâles et femelles ont des vocalises similaires, et concluent que *Gallus gallus*, du fait de sa polygamie, doit entrer en compétition pour pouvoir se reproduire quand les oies sont en couple (Appleby *et al.*, 2004). Desfroges et Wood-Gush (1975a et 1975b) ont eux étudié un même animal (le canard) en comparant une souche sauvage à une souche domestique. Le canard, testé pour son l'immobilité consécutive à une réaction de peur a aussi fait l'objet des travaux de Miller et Blaich (1988), qui permettent la comparaison avec le poulet domestique. Les fortes croissances consécutives à la sélection ont été étudiées chez la dinde (Huff *et al.*, 2005), qui constitue la production la plus proche du poulet de chair. Les progrès en matière de sélection génétique poussent l'Homme à vouloir éliminer les gènes aux conséquences comportementales négatives pour la production. On pense notamment au cannibalisme, au picage, aux agressions interindividuelles. L'interaction entre les gènes est prouvée : éliminer un gène peut avoir des conséquences négatives sur un facteur codé par plusieurs gènes. Il semble parfois préférable de s'abstenir plutôt que d'effectuer des sélections aléatoires.

## **4. La production de poulets de chair aujourd'hui**

### **4.1. Les techniques d'élevage**

On distingue **trois types majeurs** de production en poulet de chair aujourd'hui, en fonction du mode d'élevage (illustration 4). Les poulets de **type Standard** sont élevés durant cinq à six semaines et atteignent un poids d'abattage de l'ordre de 2000g. Les poulets de **type Lourd** sont généralement abattus en fonction de leur poids d'abattage, qui doit se situer à environ 1500g pour les femelles (7 semaines environ) et 2200g pour les mâles (entre 8 et 9 semaines). Enfin, les poulets de **type Label** sont élevés durant 81 jours minimum. Parfois, les poulets (notamment les *Label*) ont accès à l'extérieur à des moments précis : il s'agit de parcours.

#### **Illustration 4 : caractérisation des types d'élevages industriels de poulets**

Caractéristiques des types de production de poulets de chair les plus représentés en France (ordres de grandeur).

	<b>Standard</b>	<b>Lourd</b>	<b>Label</b>
Abattage Age (j)	35-42	50-(F <sup>a</sup> ) – 60(M <sup>a</sup> )	80
Poids (g)	1800	1500 (F) – 2200(M)	1800 (F) – 2200(M)
Densité <sup>b</sup>	20	14	11
Parcours <sup>c</sup>	Non	Non	Oui
Effectif <sup>d</sup>	8000	10000	4400

<sup>a</sup>M : mâle et F : femelle ; <sup>b</sup>Densité : nombre de poulets/m<sup>2</sup>, <sup>c</sup>Parcours : accès à l'extérieur du bâtiment ; <sup>d</sup>Effectif : nombre de poulets par bâtiment

L'élevage intensif dépend de données scientifiques et du développement technologique. La sélection génétique a entraîné une spécialisation du secteur de l'élevage des souches parentales et grand-parentales. Les poussins sont issus de souches parentales homozygotes ou hétérozygotes (grands-parents homozygotes) pour lesquels la reproduction est le plus souvent naturelle. Une autre caractéristique représentative des élevages industriels réside dans le principe du *all-in, all-out*, synonyme de vide sanitaire entre deux bandes dans le même bâtiment d'élevage. L'avantage de l'élevage en bâtiment est de réduire les coûts de production, d'une part en diminuant les quantités ingérées par les poulets (car ils produisent moins d'efforts), et, d'autre part en réduisant la main d'œuvre humaine. En effet, l'automatisation des structures d'élevage permet de réduire au minimum les interventions humaines.

La majorité des producteurs est intégrée à des compagnies leurs fournissant parfois jusqu'à la totalité de l'appareil. Dans ce dernier cas, on peut assimiler l'éleveur à un prestataire de service, voire un salarié. Ainsi, il utilise un élevage clé en main : bâtiments, nourriture, produits vétérinaires et poussins lui sont imposés. Différentes variantes existent quant au degré d'intégration des éleveurs. Le plus souvent ils sont propriétaires du foncier (bâtiments) et intégrés pour le reste. Les grandes unités de production, décrites par Appleby *et al.* (2004) accueillent jusqu'à **20000 poussins** pour une densité pouvant aller jusqu'à **23/m<sup>2</sup>**. On peut considérer que dans ce type d'élevage l'Homme maîtrise tout. D'abord, les calculs de besoins alimentaires permettent de donner aux poulets des rations hyper énergétiques et hyper protéinées, adaptées à leurs besoins de croissance rapide. La croissance des poussins, d'environ 40g à l'éclosion, leur permet ainsi d'atteindre en moyenne 2000g après 40 jours (illustration 4). Ensuite le contrôle des maladies est effectué en préventif. Les vaccins sont pratiqués par aspersion des œufs ou des poussins dès l'éclosion, ou par distribution dans l'eau de boisson. Concernant l'ambiance générale des univers d'élevage, la période est calculée pour que les animaux aient une croissance optimale. Ainsi, les cycles jour/nuit sont le plus souvent de 23 heures de jour (sur 24 heures) pour stimuler la prise de nourriture. Afin de diminuer les activités locomotrices (pour favoriser l'efficacité alimentaire), les intensités lumineuses sont basses (souvent inférieures à 5 lux). Les structures d'élevage permettent de réguler la température, dont la variation entre le premier jour de la bande et le dernier atteint 10°C (de l'ordre de 33°C pour les nouveaux nés).

En aval de la chaîne de production se situe le secteur de la transformation. Comme tous les autres maillons, ce secteur est largement automatisé. Cet étage de la production est d'ailleurs souvent décrié par les médias, qui relatent notamment les conditions de transport et d'abattage. Post abattage, les animaux ne sont quasiment plus manipulés par l'Homme. Les rares étapes de manutention seront la vérification des carcasses, l'étiquetage et la mise en chambre froide.

#### **4.2. Le cycle de vie du poulet**

Après une **couvaison artificielle** en incubateur (Illustration 5), les poussins naissent en **écloserie** et arrivent dans les bâtiments d'élevage âgés d'un jour. Pour chaque « bande », tous les animaux arrivent le même jour dans un même bâtiment. Les œufs à couvrir proviennent de fermes et sont donnés au « multiplicateur », lieu où ils sont sélectionnés, désinfectés et stockés avant leur mise en place dans des **incubateurs artificiels**. Il s'agit de salles séparées par souche où règne une ambiance régulière de 24°C pour 65% d'hygrométrie. Une entrée d'air neuf en surpression y assure une oxygénation des embryons. Ensuite les étapes se succèdent. L'éclosion se pratique dans une salle séparée, les poussins sont alors posés sur des tapis de tri (illustration 6), pour être transportés vers la salle de stockage puis comptés et mis en boîtes.

### **Illustration 5 : vue d'ensemble d'incubateurs d'œufs**

*Depuis le jour de la ponte, les œufs sont mis dans des incubateurs artificiels. Ils y resteront jusqu'à leur éclosion.*



(<http://aviculturewallonne.naturalforum.net/>)

### **Illustration 6 : manipulations lors du tri des poussins**

*Dans les heures qui suivent leur naissance, les poussins sont triés, sexés et vaccinés. Ces manipulations sont effectuées en routine par l'Homme.*



(<http://aviculturewallonne.naturalforum.net/>)

L'expédition s'effectue ensuite en **caissons de transport**, parfois isolés, chauffés et ventilés. Les poussins sont stockés dans des caisses plastiques ou des cartons d'effectif divers, toujours aérés. Dans les bâtiments d'élevage (illustrations 7 et 8), le sol est généralement couvert de litière (copeaux de bois ou paille), qui restera toute la durée de la bande (illustration 8). Les poussins sont le plus souvent mélangés (sexe ratio de 1 : 50% de mâles et 50% de femelles) même si des producteurs séparent mâles et femelles pour permettre une gestion de l'alimentation différente et atténuer les conflits. Aucun style de

cages n'est utilisé pour ce type de productions et il n'y a **pas de séparation en sous effectifs** dans les bâtiments.

### **Illustration 7 : vue d'ensemble d'un bâtiment d'élevage**

*Vue extérieure d'un bâtiment d'élevage de poulets Labels (essai mené par Phérosynthèse). On remarque le parcours en herbe devant le bâtiment.*



(Phérosynthèse, 2005)

### **Illustration 8 : représentation de la densité d'élevage**

*On note la différence de densité entre les productions Labels et Standards (essais menés par Phérosynthèse).*



(Phérosynthèse, 2005)

En fin de vie, la première étape consiste à ramasser les poulets une fois l'âge (ou le poids) d'abattage atteint. Il peut se faire manuellement ou à l'aide d'une machine entraînant les animaux. Dans tous les cas de figure les animaux sont **stockés dans des caisses** d'environ 20 unités, puis transportés par camion vers l'abattoir. Avant le ramassage, un rationnement alimentaire est observé durant plus de 10 heures afin d'éviter des contaminations par les fientes durant le transport. Une fois les animaux arrivés à l'abattoir, ils sont stockés avant d'être disposés sur les chaînes d'abattage. En plus de la période d'élevage, le ramassage, le transport, la contention, les chargements et déchargements représentent indéniablement un stress pour les poulets, attesté par différentes études (par exemple Nijdam *et al.*, 2004).

Les critères de production des éleveurs de volailles de chair sont directement liés à la demande de la profession. En effet, la demande des consommateurs dicte les impératifs des distributeurs, qui les répercutent sur les producteurs. Ainsi, la vitesse de croissance,

l'intégrité de la carcasse et la qualité de la viande sont principalement mises en avant. Ces paramètres sont tous importants dans le cahier des charges. L'**animal idéal** sera le plus lourd à un âge d'abattage donné, avec une viande indemne de marques et de qualité organoleptique satisfaisante (couleur, teneur en eau et en matière grasse). Pour l'éleveur, il faudra que l'animal montre une efficacité alimentaire optimale. Comme vu plus haut, celle-ci se calcule par l'indice de consommation (ou IC), qui devra être le plus faible possible. Il apparaît que les élevages industriels modernes sont dans l'incapacité d'optimiser le BEA (illustration 3). Paradoxalement, si les techniques d'élevage sont optimisées, les caractéristiques du vivant, telles que décrites par Gayon (2005) sont insatisfaites. En effet, la capacité à satisfaire les trois conditions (développement, maintien en vie, reproduction) citées par Gayon n'est pas atteinte. On constate que seul le métabolisme de base est satisfait puisque ses diverses fonctions sont permises : nutrition, respiration et croissance. Les poulets peuvent se maintenir en vie, se développer en utilisant l'eau et la nourriture distribuées, mais ne peuvent se reproduire. Notons aussi que le développement décrit est de nature physique ; ce qui évite tout anthropomorphisme sur le développement mental du poulet.

## **5. Améliorer les conditions d'élevage**

---

### **5.1. Questionnements éthiques**

La demande sociale, qui influence l'interprofession, insiste sur la notion de bien-être animal (BEA) et son action sur l'animal. Devant l'augmentation de la production avicole, nous voyons que l'opinion publique est interpellée par les méthodes de production. **Des mesures sont demandées** pour répondre à la double attente de productivité et de respect de l'animal. Une enquête, par Rodic *et al.* (2006), montre que de plus en plus de gens sont prêts à payer pour avoir une viande qu'ils considèrent comme meilleure (au niveau gustatif), plus saine (pour la santé) et plus sûre (du point de vue sanitaire). Selon cette même enquête, ce type d'animal est issu d'élevages extensifs. Toutefois, il apparaît impossible aujourd'hui de remettre en cause de manière fondamentale les techniques d'élevage. Ainsi, la taille des effectifs, la durée d'élevage, la période, la contention et du transport pourraient être potentiellement améliorées, voire imposées. La gestion en amont (incubation et éclosion), dans l'état actuel des choses ne peut se faire autrement.

Partant de la notion de BEA, nous sommes en face d'un **paradoxe**. Les souches de production *Standard* actuelles ne sont pas adaptées aux conditions d'élevage extensives, plus en adéquation avec le BEA. Comme le montrent McArthur *et al.* (2006), ces souches, à croissance rapide, montrent une inadaptation à l'accès à des parcours extérieurs. De plus, l'âge d'abattage est incompatible avec l'énergie dépensée par l'activité physique engendrée par l'accès aux parcours. Une première solution serait d'abattre les poulets à l'âge indiqué (40 jours) et donc à un poids en deçà de la valeur classiquement admise. La seconde solution consiste à attendre qu'ils atteignent ce poids et l'on ferait face à des risques de souffrance physique. En effet, des études montrent que pour une croissance au-delà de l'âge prévu, les poulets *Standard* deviennent notamment myopathes (Sandercock *et al.*, 2006). Ceci est une des conséquences de la sélection génétique favorisant la croissance musculaire. Cet état est concrétisé par l'existence de modèles mathématiques, comme celui de Zuidhof (2005), qui permettent de prévoir la croissance des organes en fonction de l'âge. Toutefois, le développement des nouvelles techniques de production ne doit pas être perçu comme une atteinte au BEA. Si les atteintes au BEA sont d'ordre génétique, il est difficile d'étendre des corrections à l'ensemble du secteur de production. Néanmoins des corrections partielles semblent envisageables. Aujourd'hui, le BEA doit être intégré dans une notion globale de sécurité des aliments. Une étude de

Horgan et Gavinelli (2006) montre ainsi que le BEA est perçu comme intégrant la santé de l'animal et donc la sécurité des aliments.

## **5.2. Interventions du législateur**

Le BEA au sens législatif du terme est décrit par la **directive Européenne 98/58/EC** (Caporale *et al.*, 2005) qui vaut pour l'ensemble du monde animal. Diverses autres directives s'y ajoutent, notamment à propos des animaux de ferme. On remarque qu'aucun chapitre n'est consacré aux poulets de chair (contrairement aux poules pondeuses). Le BEA reste difficile à caractériser puisque l'animal doit être en « bonne santé physique et mentale et capable de réaliser ses aspirations » (Dantzer, 2001). Quatre types d'indicateurs biologiques permettent le plus souvent d'estimer le BEA. D'abord l'état de **santé**, puis la mesure des **performances** zootechniques, des indicateurs **physiologiques** et enfin le **comportement** (Smidt, 1983). Le Conseil de l'Europe a établi des recommandations sur le BEA. Ces dernières sont reprises par Bouglhier et Gallouin (2002) qui donnent les cinq points majeurs permettant d'éviter des stress préjudiciables à l'espèce *Gallus gallus* (illustration 9).

- ⇒ L'absence de faim, de soif et de malnutrition
- ⇒ Un environnement climatique et physique non agressif
- ⇒ L'absence de maladie et de blessure
- ⇒ La possibilité d'exprimer le comportement normal de l'espèce
- ⇒ L'absence de peur et d'anxiété.

### **Illustration 9 : les « five freedoms »**

*Les five freedoms (prévention) pour les animaux, recommandées par le conseil sur le bien-être des animaux de rente (the UK's Farm Animal Welfare Council) sont établis pour permettre une adéquation entre les besoin de l'Animal et ceux de l'Homme.*

<b>Se prémunir</b>	<b>Action</b>
Faim et soif	Accès à l'eau et à la nourriture
Inconfort	Environnement approprié, dont zones d'ombre et de repos
Douleur, blessure, maladie	Prévenir ou effectuer des diagnostics rapides
Comportements anormaux	Disposer d'un espace suffisant
Peur et détresse	Interdire les souffrances mentales

Le gouvernement du Royaume-Uni a missionné en 1965 le professeur Roger Brambell pour enquêter sur le bien-être des animaux de l'élevage intensif, en partie pour répondre aux idées soulevées dans le livre *Animal machines* (Harrison, 1964). Sur la base du rapport Brambell, le gouvernement britannique a alors créé en 1967 une entité qui deviendra le *Farm Animal Welfare Council* en 1979. Ses recommandations, accompagnées d'autres plus générales sur le BEA, feront office de loi. Le *Farm Animal Welfare Council* établira les *Five Freedoms* en 1997 (illustration 9). Plus généralement on citera la convention cadre ratifiée par l'Europe sur la protection des animaux dans les élevages (UE, 1976; STE 87), qui donne des principes fondateurs sur l'élevage, les soins et l'hébergement des animaux, en particulier dans les systèmes d'élevage intensifs. La résolution XIV du *Animal Welfare Mandate* (OIE, 2001) indique quant à elle la mise en place de plusieurs **consensus internationaux**.

Après 2012, les nouveaux élevages devront être construits suivant des normes strictes. Un séminaire sur le BEA s'est tenu au Conseil de l'Europe en novembre 2006. Ce dernier, co-organisé par l'Unité du bien-être animal du Conseil de l'Europe et l'Union européenne, avec le soutien de l'organisation mondiale de la santé animale, a examiné la manière dont

les législations et normes actuelles du BEA sont mises en œuvre en Europe. Il s'est appuyé sur l'enquête la plus vaste menée à ce jour sur la question. Les représentants de services vétérinaires nationaux ont statué sur la promotion et l'application de la législation du BEA afin de parvenir à une compréhension commune des règles et pratiques en la matière. Les participants ont notamment discuté des moyens de surmonter les obstacles sociaux, juridiques, économiques et scientifiques qui s'opposent parfois à l'application effective de la législation du BEA.

### **5.3. Réponses de la profession**

Le mode d'élevage représente le premier facteur sur lequel l'Homme est susceptible d'intervenir. Pour maîtriser les facteurs de risque, l'éleveur peut gérer la densité animale, l'intensité lumineuse, le rationnement alimentaire ou encore le parasitisme. Différentes stratégies peuvent aussi être adoptées afin de gérer le BEA dans un élevage. Il s'agit avant tout de **prévenir les situations de stress**. Il est possible par exemple d'annoncer sa présence aux poulets avant d'entrer dans un bâtiment en effectuant une action spécifique (bruit particulier par exemple). Il conviendra également de limiter le nombre de visites de l'éleveur, mais également des personnes étrangères à l'élevage.

Il est établi que des poussins habitués à diverses stimulations présentent des réactions moins importantes face à un stress, par rapport à des individus qui ne l'ont pas été (Ropper et Marpple, 1997). Habituer les poulets, les sociabiliser par des expériences précoces et multiples apporte des résultats satisfaisants en terme de maîtrise du stress. On peut aussi proposer la mise en place d'un nombre « raisonnable » de poulets, tout en leur assurant un espace de vie, un abreuvement et un apport alimentaire de qualité suffisant afin d'éviter la compétition et donc les bagarres (Berri *et al.*, 2005). Des travaux montrent que la réduction de la luminosité ou de la durée d'éclairage dans les bâtiments permet de réduire les combats (Campo et Davila, 2002a). L'enrichissement du milieu par l'intermédiaire de la mise en place de perchoirs, de paille ou d'objets divers, est aussi une technique utilisée (illustration 10) car cela semble favoriser le jeu et le comportement exploratoire (Pettit-Rilez et Estevez, 2001). La mortalité est moindre lorsque des machines plutôt que des Hommes ramassent les poulets (Duncan *et al.*, 1986). Enfin, l'apport d'une alimentation appropriée et notamment supplémentée en vitamines dans la ration permet d'éviter certains comportements déviants comme le piquage ou le cannibalisme (Berri *et al.*, 2005).

#### ***Illustration 10 : enrichissement du milieu, exemple des perchoirs***

*Dans les élevages avec parcours extérieur comme dans les bâtiments d'élevage, des techniques d'enrichissement du milieu (tels que les perchoirs) sont parfois utilisées.*



(Phérosynthèse, 2004)

Différentes **techniques thérapeutiques** sont utilisées pour tenter de briser les effets délétères du stress. Effectuée par l'éleveur, la technique chirurgicale la plus répandue reste la coupe des becs. Cette pratique évite aux animaux des coups de bec, lors de conflits. Ce type de picage entraîne le déclassement de la carcasse et influence la couleur de la viande (Fletcher, 2002). Craig et Muir (1996) montrent néanmoins que les performances diminuent en cas de débecage, mais le picage a une importance matérielle : il entraîne une augmentation de la consommation d'aliments et de la mortalité, ainsi qu'une diminution de la marge brute (Buitenhuis *et al.*, 2002). Les griffures, également source de marques sur la chair et donc de diminution de rendement, sont parfois évitées en coupant les griffes. On peut également considérer la pose de lunettes (illustration 11) comme un acte chirurgical puisque l'on appose des œillères en perforant la paroi nasale. L'usage médical de neurolopetiques a été utilisé pour réduire les comportements agressifs de poulets. Gruss *et al.* (2003) montrent par contre que le mécanisme de l'empreinte est altéré dans le cas d'une utilisation d'Haloperidol® chez des poussins. Durant la croissance, les processus de mémorisations sont également altérés. Des antidépresseurs, testés dans le cadre d'isolation de poussin, montrent une efficacité en condition de laboratoire. Ainsi, l'administration spontanée de phenelzine, d'imipramine ou de maprotiline diminue la néophobie dans ce cas précis (Feltenstein et Sufka, 2005).

#### **Illustration 11 : réduire les conflits physiques, les lunettes**

*Des techniques alternatives, telle que la pose de lunettes, sont utilisées pour éviter les combats.*



(Phérosynthèse, 2004)

L'enrichissement du milieu a été étudié lors de différents travaux pour évaluer les conséquences d'un milieu hypostimulant sur les animaux domestiques. Les cas du chien et du chat ont ainsi été largement analysés, démontrant des troubles du comportement en cas de faible stimulation. Ainsi le parallèle peut être effectué avec les poulets d'élevage au sein desquels on montre **l'importance de la stimulation des petits par leur mère** pour la nourriture ou le danger (Millet et Blaich, 1988).

Des **techniques alternatives** (phytothérapie, aromathérapie, homéopathie), ont été développées et utilisées pour l'Homme. Elles ont ensuite été transposées aux mammifères domestiques, puis aux mammifères d'élevage. Des essais ont été réalisés dans les élevages agricoles. L'homéopathie a surtout été testée dans le cadre de résistances à des bactéries, comme les salmonelles (Berchierie *et al.*, 2006). Partant du principe que les volailles sont capables de discriminer les odeurs (montré par Roper et Marple, 1997), des tests, sans résultats concluants, ont aussi été effectués en élevage en utilisant l'aromathérapie. Les résultats semblent plus concluants avec l'utilisation de la phytothérapie. On citera par exemple les travaux de Dorhoi *et al.* (2006) qui montrent une stimulation de la réponse immunitaire de poulets soumis à des extraits de réglisse, d'ail ou de grand plantain.

Depuis les années 1990, on utilise des **phéromones** pour réguler le stress, là encore majoritairement chez les animaux de compagnie. L'apaisement des animaux en présence de phéromones spécifiques montre que ce type de molécules peut être utilisé en préventif au stress (Pageat et Gaultier, 2003). De plus, il apparaît que l'utilisation d'un analogue de **phéromone maternelle** (cas du chien) dans un but d'apaisement est au moins aussi performant qu'un anxiolytique classique (Gaultier *et al.*, 2005).

#### SYNTHESE PARTIELLE

L'ancêtre du poulet domestique moderne est un animal connu. Chez ses descendants des réminiscences comportementales subsistent. Cela entraîne des frustrations, des comportements déviants dus à une absence du lien d'attachement naturel dans les conditions d'élevage actuelles. Des réponses, plus ou moins concluantes, ont été proposées pour améliorer le bien-être du poulet.

# Chapitre II : le stress

## 1. Définitions

---

Le stress est principalement défini comme une notion de physique désignant la contrainte exercée sur un matériau. C'est un médecin canadien d'origine hongroise, Hans Selye (1907-1982), qui découvrit ce phénomène physiologique et lui attribua le nom de stress. Sa première publication scientifique sur le sujet date de 1936. Le stress, syndrome général d'**adaptation**, ou syndrome d'adaptation de Selye, désigne à l'origine, la réponse ou réaction non spécifique de défense se déroulant à l'intérieur de l'organisme. La signification du terme s'élargit pour englober l'agent responsable de cette réaction.

L'emploi du terme en biologie remonte au début du XX<sup>e</sup> siècle avec les études sur la constance du milieu intérieur et ses conséquences en physiologie de l'accommodation biologique et de l'adaptation. Cette constance, ou **homéostasie**, est la capacité à conserver l'équilibre de fonctionnement en dépit des contraintes extérieures. Pour Claude Bernard, « l'homéostasie est l'équilibre dynamique qui nous maintient en vie » (cité par Clarke, 1961). Si les écarts atteints deviennent trop importants pour être comblés par l'homéostasie, le stress apparaît comme un **moyen correctif** permettant de faire face à la situation. Le terme de stress devient vaste puisqu'il peut désigner à la fois l'agent responsable, la réaction à cet agent, mais aussi l'état dans lequel on se trouve lorsqu'on réagit (Dantzer, 2001). De nombreux stimuli externes et internes peuvent être à l'origine d'une modification de l'homéostasie d'un individu.

Selon Siegel (1995), le stress du poulet peut être de nature physique (température), chimique (agents polluants), social (densité) ou encore environnemental (bâtiment). Les facteurs de stress appliqués à un animal ne sont pas obligatoirement déclencheurs d'une réaction spécifique. Ce qui a provoqué un stress dans un cas n'aura pas forcément le même effet la fois suivante en fonction des agents modulateurs. Selon Broon (2006) le stress en élevage se définit comme un ensemble de **perturbations métaboliques et viscérales** provoquées par des agents agresseurs. Ces derniers agissent sur l'organisme et peuvent être de différents ordres : traumatisme, choc, température, surprise, maladie ou infection.

## 2. Les causes

---

Le stress induit par la chaleur affecte le gain de poids et la consommation (eau et nourriture) des oiseaux (McKee et Harrison, 1995). Spinu *et al.* (2003) montrent que des poulets de chair subissant de fortes **températures** ont une croissance ralentie, une moins bonne productivité et une plus forte mortalité que les poulets élevés à une température optimale. Inversement, les faibles températures augmentent les besoins énergétiques et diminuent la croissance.

Campo et Davila (2002a) indiquent qu'un programme lumineux constant ou quasi-constant rend les animaux plus peureux. Ces auteurs argumentent en disant que la **lumière** influence le bien-être en raison de l'absence de périodes régulières de jour et de nuit. Une durée de lumière trop prolongée réduit la capacité des animaux à dormir, entraînant un stress physiologique.

Selon Gross (1990), une exposition à un **bruit** non familier déclenche une réaction de peur chez les oiseaux. Le même auteur montre aussi qu'un son puissant et court déclenche une réaction physiologique. La sensibilité des oiseaux à la peur augmente si ce stimulus se répète fréquemment.

Les **agents pathogènes** sont responsables de situations de stress liées à une agression de l'organisme qui détériore l'homéostasie (Mathieu et Thibodeau, 1995).

Une réaction apparaît lorsque les animaux sont en manque de **nourriture**. Cette réaction, consécutive à la faim, est d'autant plus importante chez les oiseaux d'élevage habituellement nourris *ad libitum* (De Jong *et al.* 2002). Une accessibilité aux mangeoires insuffisante augmente aussi le niveau de stress des oiseaux (Appleby *et al.*, 1992). Une carence en nutriments (acides aminés et minéraux) peut être à l'origine de comportements associés déviants (Hughes et Duncan, 1972). La forme sous laquelle l'aliment est présenté entraîne l'apparition de comportements anormaux tel que le picage, favorisé avec les aliments en farine comparés à ceux en granulés (Aerni *et al.*, 2000). Au-delà d'un seuil, des nutriments deviennent toxiques et entraînent des comportements anormaux (picage et cannibalisme), en plus de faire décroître la production et de faire augmenter la mortalité (Latshaw *et al.*, 2004).

Dans les élevages où **l'éleveur** est fréquemment dans ses bâtiments avec les animaux (surtout lors des premières semaines), le taux de mortalité est plus faible et les oiseaux ont un comportement moins peureux lorsqu'ils sont mis en présence de stimuli stressant. De plus, un éleveur qui se déplace de façon rapide en poussant rapidement les animaux dans son sillage rend ses volailles peureuses et diminue leur productivité (Cransberg *et al.*, 2000). La socialisation interspécifique (Homme-Animal), décrite notamment par Gross et Siegel (1983b), est importante dans le sens où l'on constate des différences de performances et de résistance aux maladies en faveur des poulets socialisés à l'Homme par des visites régulières. L'action de l'Homme peut aussi être néfaste dans le cadre d'interventions sur les oiseaux : contentions, débecage (McKee et Harrison, 1995).

Des poulets élevés à une faible **densité** ont une meilleure productivité (Davis *et al.*, 2004). A l'opposé, une proximité importante, conséquence d'une forte densité, entraîne une augmentation de la mortalité, des anomalies locomotrices et une dysfonction du sommeil (Spinu *et al.*, 2003).

La **taille du groupe** revêt également une importance dans la capacité des poulets à mettre en place une hiérarchie sociale ou reconnaître les congénères (Appleby *et al.*, 1992). Des groupes de taille trop petite peuvent néanmoins entraîner des déviations pour cause d'absence de rang inférieur dans la hiérarchie (Bilcik et Keeling, 2000). On montre que la totalité du groupe doit être étudiée car on ne peut considérer des animaux comme représentatifs de l'effectif total (Mitlohoner *et al.*, 2001)

Enfin, Saito *et al.* (2005) indiquent que **l'isolement** d'un poulet provoque un stress, notamment s'il a été élevé dans un groupe.

### 3. Les modulateurs

---

Plus le stimulus du facteur d'agression est fort, plus la réponse est forte. Les volailles réagissent à des stress par l'accumulation de leurs effets. Le plus souvent les effets de plusieurs facteurs ne se compensent pas, mais s'ajoutent. L'**intensité** du stimulus a une influence sur l'intensité de la réponse et donc sur l'intensité à laquelle est perçue

l'agression. Il faut également prendre en compte le **nombre de facteurs** mis en jeu (McKee et Harrison, 1995).

Une agression courte, quelle qu'en soit l'intensité, induit un stress profond et rapide, mais qui décroît rapidement après la disparition de l'agent stressant. Une agression pendant une longue **durée**, ou qui revient fréquemment, entraîne la mise en place d'un état de stress chronique qui subsiste lorsque le facteur déclenchant a disparu (McKee et Harrison, 1995).

La peur de la **nouveauté**, ou néophobie, largement étudiée chez les animaux de compagnie, a aussi été observée chez le poulet domestique. Les travaux de Freire *et al.* (2006) montrent par exemple que des poussins introduits dans un environnement physique inconnu émettent des vocalises montrant leur peur. Néanmoins, un stimulus qui aurait été stressant par sa nouveauté devient nul ou moins influent s'il se répète. Le poulet s'habitue par exemple à la présence de l'éleveur (Cransberg *et al.*, 2000) ou à un bruit tel que celui provoqué par la chaîne d'alimentation (Gross, 1990).

Quel que soit le type de stress nous pouvons établir une notion de **seuil** qui correspond à un « point de non retour » au-delà duquel il devient impossible d'observer une réadaptation. On parlera de **stress chronique**, qui peut être une accumulation de **stress aigus**. On peut parler de paliers franchis, sans possibilité de faire machine arrière.

## **4. Conséquences et méthodes de mesure**

---

### **4.1. Performances zootechniques**

Des procédures de référence existent pour tester la qualité de viande, dont les paramètres déterminants sont : le stress, la génétique et le pH de la viande (Debut *et al.*, 2003). Des modèles mathématiques existent et permettent de savoir si la courbe de croissance des poussins (selon différents critères d'environnement, de souche ou d'alimentation) est différente de la courbe idéale (Zuidhof, 2005). Ceci permet d'évaluer l'impact éventuel d'un stress. Le stress a un effet négatif sur le gain de poids des poulets de chair (Post *et al.*, 2003). La chaleur, une infection du type coccidiose a un impact sur la **prise de poids** par les animaux plus marqué que l'ablation du bec. En revanche, si le poids vif est influencé par une majorité d'agents stressants, le poids à 42 jours (âge d'abattage pour les souches à viande *Standard*) ne semble pas touché par un stress dû à un quelconque programme lumineux (Buys *et al.*, 1998).

Les facteurs de stress ont un effet cumulatif sur la prise de poids s'ils sont présents en même temps dans un élevage : la consommation d'aliment et l'**efficacité alimentaire** diminuent proportionnellement au nombre de facteurs (McKee et Harrison, 1995). Une prise de poids régulière des animaux couplée à l'étude de leur consommation alimentaire peut être un indicateur du stress subi par les poulets (Post *et al.*, 2003b). Quel que soit ce dernier, on ne constate quasiment jamais de croissance compensatrice chez le poulet une fois le stress subi (Siegel, 1995). Enfin, lorsque des poussins sont perturbés par un environnement olfactif inhabituel, on constate que leur gain de poids est affecté (Porter *et al.*, 2002).

La qualité du produit final, jugée notamment par la qualité des **filets** (poids et teneur en eau), est influencée par une forte densité (Berry *et al.*, 2005). Les travaux de Petracci *et al.* (2004) mettent en évidence la relation entre le **poids** à l'abattage et différents critères de qualité de la viande. Ces travaux montrent également une corrélation positive entre un pH haut et le rendement de cuisson. Devenue un enjeu majeur de l'industrie agro alimentaire,

la qualité de la viande fait l'objet de cahiers des charges rigoureux de la part des industriels (Wilkins *et al.*, 2003). Ainsi la **couleur**, le **pH**, les **pertes à la cuisson** ou la quantité de **graisse** sont pris en compte (Mehaffay, 2006). Les viandes pâles et pisseuses (PSE pour *Pale, Soft and Exudative*) décrites dans d'autres productions existent aussi chez la volaille (Tankson *et al.*, 2001). Il existe une relation entre la couleur, le pH et la capacité à la rétention d'eau de la viande (Woelfel *et al.*, 2002). Mallia *et al.* (1998) indiquent qu'il existe aussi des viandes foncées, dures et sèches (DFD pour *Dark, Firm and Dry*) en production de volailles de chair.

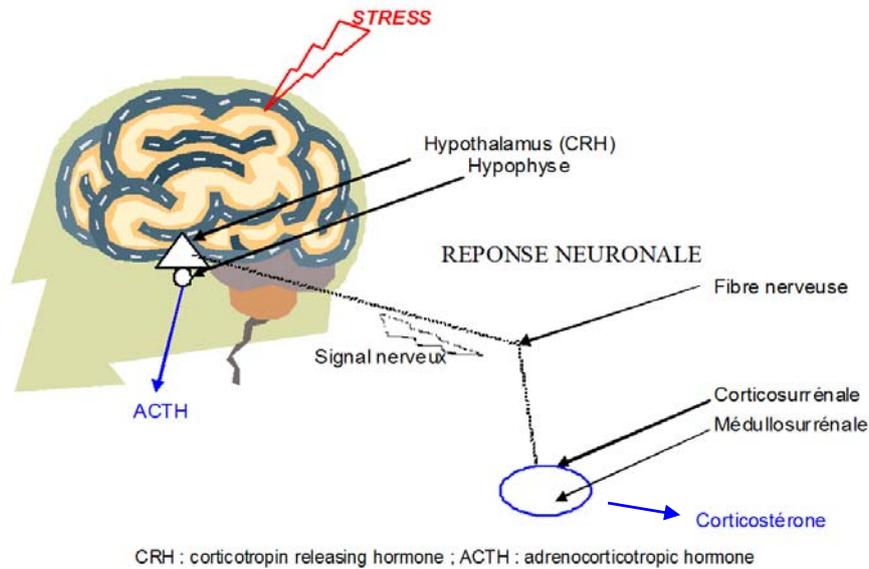
## **4.2. Physiologie**

La réaction aux diverses perturbations fait intervenir des médiateurs chimiques tels que l'adrénaline, les corticoïdes et d'autres hormones. Les réponses immunitaires sont sensibles aux facteurs d'agression et le stress peut modifier le comportement des individus qui en sont affectés (Merlot *et al.*, 2004). Les **interleukines** (IL) agissent par exemple sur le comportement. Wang *et al.* (2003) montrent que l'IL1 modifie la température corporelle, le sommeil, l'appétit et le comportement exploratoire. On montre que l'**immunité est bouleversée** en situation de stress (Zulkifli *et al.*, 2002), et Husband (1993) constate la sécrétion de GH (*Growth Hormon* ou hormone de croissance), qui stimule l'immunité.

Face à une situation de stress, l'organisme réagit en essayant de maintenir son homéostasie. Pour cela, l'individu peut prendre la fuite ou bien lutter contre la situation et les effets délétères du stress : c'est ce que Cannon (1927) définit comme le *fight-or-flight response*. Il s'agit d'un système de réponse rapide qui met en jeu une cascade d'événements humoraux, mais aussi neuronaux. Une situation de stress correspond à un stimulus qui est alors perçu au niveau du système nerveux central. La réponse à ce stimulus est l'activation de l'axe corticotrope (hypothalamus, hypophyse et glandes surrénales, comme montré sur l'illustration 12). Dès 1936, Selye observe que des animaux stressés présentent une hypertrophie de la glande surrénale. Lors de ce processus en cascade, qui est une réponse précoce, l'information est intégrée au niveau du cortex cérébral qui envoie des signaux nerveux à l'hypothalamus (illustration 12). On constate alors la libération de corticolibérine par celui-ci, ce qui stimule la production d'ACTH par l'hypophyse, et plus particulièrement par l'hypophyse antérieure (Hazard et Guéméné, 2005). Au niveau des glandes surrénales, situées au-dessus des reins, il existe deux types de décharge hormonale sous l'effet de l'ACTH : les glucocorticoïdes par le cortex et les catécholamines par la médulla (Maule et Vanderkooi, 1999). En parallèle, la corticolibérine stimule des noyaux de l'hypothalamus à partir desquels sont envoyés des signaux, en passant par l'hypophyse. Ces signaux empruntent des nerfs qui conduisent directement les informations aux glandes surrénales. Cette stimulation active très précocement la production de catécholamines. Ces dernières, en particulier l'adrénaline, permettent à l'individu de faire face rapidement à une situation menaçante. En effet, les ressources sont ainsi rapidement mobilisées. L'action de ces hormones, précoce, est prolongée, puis amplifiée par d'autres hormones, notamment la **corticostérone** chez les volailles (Ewing *et al.*, 1999). Il y a ainsi une véritable complémentarité entre le cortex et la médulla des glandes surrénales chez un individu en état de stress. L'activation de l'axe corticotrope est variable selon le stimulus et l'intensité de la production des glandes surrénales est fonction de l'intensité et de la durée du facteur stress. Le taux de corticostérone dans le sang peut être mesuré en utilisant une technique d'extraction par l'alcool (Gross et Siegel, 1983) ou par un test ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) d'après la méthode de De Jong *et al.* (2002).

### Illustration 12 : stress et système nerveux

Activation du système nerveux central chez un individu confronté à un stress (d'après Ewing, 1999).



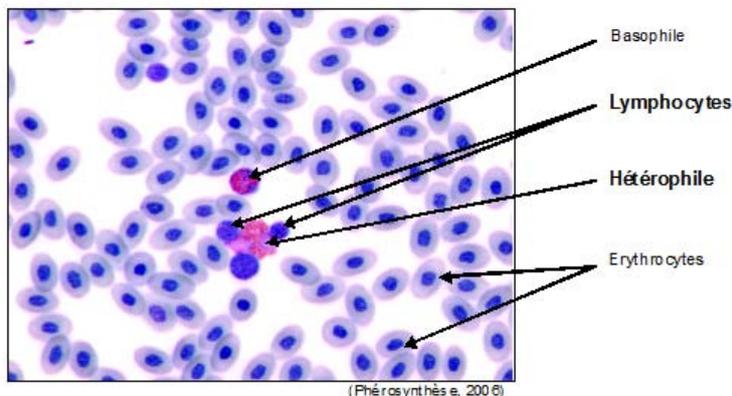
La réponse de l'axe hypothalamo-hypophysaire au stress est considérée comme délétère puisque des taux élevés de corticostérone, en **chronique**, ont des effets qui altèrent parfois gravement la morphologie et la physiologie des individus. Plusieurs études ont également mis en évidence qu'une corticostéronémie élevée empêche la mise en place d'une réponse spécifique envers un antigène : la production d'**anticorps apparaît inhibée** (par exemple Post *et al.*, 2003b). Beuing et Vonder (1986) proposent la mesure du taux plasmatique de corticostérone (CS) comme une façon d'évaluer l'état de stress aigu chez les volailles, concluant qu'un taux élevé est un bon indicateur de « stress aigu » chez ces dernières. On note par exemple que des poulets montrant un taux de corticostérone élevé dans le sang ont une consommation alimentaire supérieure et un gain de poids inférieur comparativement à des congénères ayant un taux inférieur (El-Iethy *et al.*, 2001). De Jong *et al.* (2002) montrent que la réponse du taux de corticostérone à un stress brutal est plus importante lorsque l'animal est en condition de stress chronique. A la suite d'administration de fortes doses de corticostérone, le taux reste élevé pendant une longue période (Post *et al.*, 2003a).

L'immunité non spécifique correspond à un ensemble de moyens de défense non spécifiques à un germe donné, ce sont les défenses de surface (peau, muqueuses). Les cellules mises en jeu dans ce processus sont les monocytes, les macrophages, les polynucléaires (neutrophiles, basophiles et acidophiles), les cellules *natural-killers* et les thrombocytes. Ces derniers possèdent une activité phagocytaire plus importante que les macrophages (Villate, 2001). D'après Maule et Vanderkooi (1999), les glucocorticoïdes inhibent la production des cellules immunitaires, ainsi que leur différenciation. Elles entraînent aussi la destruction des leucocytes par un phénomène de cytolysse et redistribuent les cellules à d'autres organes lymphoïdes. Tous ces phénomènes entraînent une altération du système immunitaire, avec finalement une diminution du taux plasmatique de globules blancs. La production des hétérophiles est particulièrement touchée. Ce sont les équivalents des polynucléaires neutrophiles des mammifères et ils possèdent une importante activité de phagocytose (Villate, 2001). Les leucocytes sont en circulation dans le système sanguin et réagissent de manière différente aux agresseurs : phagocytose, production d'anti-corps (Mathieu et Thibodeau, 1995). Lorsque les poulets sont nourris avec un aliment complété de corticostérone (simulation de stress), le nombre de lymphocytes diminue alors que celui de granulocytes hétérophiles augmente (Gross et

Siegel, 1983). Ces auteurs montrent que la mesure du nombre de ces deux types de leucocytes est un indicateur de l'état de stress des poulets. Ils concluent qu'il est préférable d'effectuer un rapport entre ces deux nombres plutôt que de les analyser individuellement. Le **ratio hétérophiles/lymphocytes** (HLR) permet de prendre en compte les variations interindividuelles. Gross (1990) montre que HLR augmente 18 heures après le phénomène stressant et revient à la normale 30 heures après. Le calcul de HLR permet de mesurer un stress chronique (Gross et Siegel, 1983). Divers facteurs font varier HLR : les altérations du système immunitaire (Silim et Rekik, 1992), la souche de poulet (Campo *et al.*, 2001), l'âge et le sexe (Campo et Davila, 2002b). En revanche, HLR ne varie pas en fonction de la densité ni de la saison (Spinus *et al.*, 2003), de l'état de satiété des animaux (De Jong *et al.*, 2002) ou de la période (Campo et Davila, 2002a). Il existe deux techniques pour mesurer le ratio hétérophiles/lymphocytes ou HLR (décrites par Gross et Siegel, 1983 et par Post *et al.*, 2003a). Il est possible d'effectuer un comptage microscopique des lymphocytes et des hétérophiles à partir d'un frottis (illustration 13). La seconde technique est fondée sur le dénombrement automatique des différents types de globules blancs à partir d'un compteur automatique de cellules. Post *et al.* (2003a) ont montré que le comptage automatique des cellules afin de déterminer HLR est une méthode simple à mettre en place, rapide et reproductible sans variations entre les résultats. Dans le cadre d'études effectuées en élevage, donc sur un grand nombre d'individus, il apparaît plus rentable de faire des frottis sur place puis d'effectuer les dénombrements au microscope.

**Illustration 13 : le ratio hétérophiles/lymphocytes**

Exemple d'un frottis sanguin à partir duquel peut être calculé le Ratio Hétérophiles/Lymphocytes (HLR) : on dénombre les hétérophiles et lymphocytes sur 100 globules.



Les **Acute Phase Protein** (APP) représentent un groupe de protéines aux fonctions variées et qui sont synthétisées par le foie (Petersen *et al.*, 2003). Elles sont libérées dans la circulation sanguine après un stimulus induit par une infection bactérienne, une inflammation, une blessure ou l'exposition à une toxine. Leur fonction est de restaurer l'homéostasie d'un tissu endommagé. Ce sont des enzymes, des inhibiteurs de protéases, des transporteurs de protéines, des agents coagulants ou encore des modulateurs de la réponse immunitaire (Chamanza *et al.*, 1999). On montre que leur synthèse est accélérée en présence des cytokines inflammatoires IL1 et IL6 et que les variations du taux sanguin de ces protéines sont un indicateur fiable et non spécifique d'une inflammation (Holt et Gast, 2002). Les APP ont été identifiées chez l'Homme, les ruminants et le porc et sont utilisées afin de détecter une infection, une maladie inflammatoire ou un cancer. Holt et Gast (2002) ont montré que, suite au stress de la mue, le suivi du taux sanguin des APP était un moyen fiable de suivre le niveau des infections et du degré de stress. Il existe peu

de références montrant que la mesure d'un stress est corrélée avec la production d'APP spécifiques chez le poulet.

Il semble fiable d'observer des paramètres plus classiques puisqu'un poulet en situation de stress montre des taux de **cholestérol** (CHOL), de **triglycérides** (TRYGLI) et une **glycémie** (GLU) plus élevés que des congénères non stressés (Puvadolpriod et Thaxton, 2000a). D'une manière générale, on constate une affection des différents métabolismes glucidique, lipidique et protéique en situation de stress. Celui du glucose semble particulièrement touché. Les hormones produites en cas de stress sont à l'origine des altérations du système neuro-végétatif. Le stress mobilise les réserves (glucidique, lipidique) de l'organisme. Il oriente leur métabolisme vers le catabolisme afin de maintenir un équilibre et de fournir des formes d'énergie facilement utilisables pour faire face à la situation de stress. Ainsi, la réponse neuro-végétative se fait par l'intermédiaire du système nerveux sympathique et dans une moindre mesure par l'axe hypothalamo-hypophysaire. L'activation du système nerveux sympathique se met rapidement en place, puis le relais est pris avec celle de l'axe hypothalamo-hypophysaire, en situation de stress chronique. Le stress stimule, par les fibres nerveuses, la médulla de la glande surrénale, entraînant une décharge d'adrénaline (illustration 12). Cette dernière augmente la production de glucose (Steffens *et al.*, 1999). Le stress augmente donc les besoins et la consommation de glucose, aboutissant à une stimulation de la néoglucogenèse. La corticostérone reste néanmoins indispensable à la mise en place d'une réponse face au stress : elle assure la mobilisation des réserves. En cas de non sécrétion, le poulet ne fera pas face à la situation d'inconfort et ne pourra survivre que dans un environnement protégé (Ewing *et al.*, 1999). En définitive, la sécrétion de corticostérone sous l'effet du stress est le phénomène principal qui permet au poulet de s'adapter pour maintenir son homéostasie (Tankson *et al.*, 2001).

L'**asymétrie** fluctuante des caractères morphologiques (une modification anormale du métabolisme) est aussi un indicateur de stress environnemental. Cette asymétrie se développerait au cours des premières semaines de vie et serait liée à un stress subi par l'animal concerné. Elle se caractérise par une distribution normale des fréquences représentant les différences du côté droit moins le côté gauche et ayant une moyenne de zéro (Campo *et al.*, 2000). En conditions sauvages, il a été montré qu'il existe une sélection naturelle vers les animaux symétriques (Moller *et al.*, 1995). Chez la volaille, les mesures portent sur la longueur des métatarses, des ailes, des plumes et des ergots chez les mâles, ainsi que sur la pigmentation de la peau (Campo *et al.*, 2000).

Le **rythme cardiaque** et la **température corporelle** peuvent être utilisés comme outils de mesure. Mais il est difficile de se fier à ces valeurs car elles dépendent de nombreux facteurs avant même d'être affectées par le stress. Elles peuvent servir en complément des indicateurs reconnus comme spécifiques pour mieux comprendre les changements physiologiques générés par un stress (De Jong *et al.*, 2002).

### **4.3. Incidences comportementales**

L'absence de la mère entraîne des comportements et postures équivoques chez le poussin. Roden et Wechsler (1997) montrent à ce titre que le comportement des poussins (accès à la mangeoire et postures, notamment) diffère selon la présence ou l'absence de la mère.

Le comportement des oiseaux vis-à-vis de l'éleveur est un indice de l'état de stress et de peur dans lequel se trouvent les animaux (Cransberg *et al.*, 2000). La réaction de l'oiseau à un prédateur, ou leurre de prédateur induit des réactions spécifiques : **immobilité**, **fuite**, **vocalise** et **regroupement** sont les principales. Hirsch et Bolles (1980) montrent que la

réaction au prédateur est innée et ne nécessite aucune sorte d'habituation. Ces réponses comportementales ne semblent pas nécessiter d'apprentissage. Un poulet en présence d'un **prédateur** fuit ou s'immobilise (selon les circonstances) non pas parce qu'il a peur de la mort mais car il s'agit d'une adaptation spontanée et instinctive (Hirsch et Bolles, 1980), perçue aussi comme un comportement déviant. Des éthogrammes exhaustifs existent de sorte que différents auteurs les décrivent, selon les critères relatifs aux oiseaux ou à l'environnement (par exemple Webster, 2000 ; Lay et Wilson, 2002 ; Luescher et Sheehan, 2005). Dans des conditions naturelles, la poule vit au sein d'un groupe qui passe la majeure partie de son temps dans les couverts afin d'échapper aux prédateurs. Ces derniers peuvent à la fois être volants, entraînant une réaction d'immobilisation, ou au sol, entraînant une réaction de fuite (Hirsch et Bolles, 1980). Des comportements (réaction ou évitement d'un prédateur, nidification...) se retrouvent ainsi chez les différents types d'oiseaux (Duncan et Fraser, 1997).

Campo *et al.* (2001) montrent que la perte de plumes dénote un mal-être chez les animaux concernés. Selon El-Lethey *et al.* (2001), un stress entraîne une augmentation de la **consommation alimentaire**, et des phénomènes de **picage**. Des types de picage aboutissent à du cannibalisme, qui pourrait être dû à une frustration et donc à un comportement de fouille au sol redirigé (Huber-Eicher et Wechsler, 1997). Notons que sous le terme de picage, on trouve différentes définitions, dont deux principales. D'abord le *feather pecking* ou arrachage de plumes : le picage est dirigé vers le corps et est répétitif. Ce mouvement est semblable à celui effectué pour se nourrir (Appleby *et al.*, 1992). Ensuite, les *aggressive pecks* qui résultent de combats : coups rapides portés à la tête de la victime (Bilcik, 2000). Des postures équivoques sont décrites dans le cas d'observations de picages en élevage par Molony et Kent (1997). Elles permettent de faire la différence entre les types de picages. Il existe donc différents types de picage. Il peut être synonyme de subordination hiérarchique, s'il s'effectue sur la tête (Gross et Siegel, 1983) ou consécutif d'un stress physiologique s'il n'est pas dirigé (Craig et Muir, 1996). L'augmentation de la consommation d'aliment y est également corrélée (Buitenhuis *et al.*, 2002).

Des lésions dues aux bagarres, à la coupe des becs ou à des malformations osseuses entraînent souffrance et inconfort. Celui-ci, comme celui dû à la maladie, la frustration ou la peur se mesure de différentes façons. L'apparition d'un prédateur entraîne par exemple une réaction de peur observée par une variation de la prise alimentaire (Hocking *et al.*, 1997). Dans des cas extrêmes, les poulets montrent des réactions de panique, ce qui entraîne parfois des morts par suffocation et étouffement (Duncan et Fraser, 1997). A propos de la souffrance, il est admis que la perception des sens est une composante du BEA, dont la principale notion reste la perception de la souffrance (ou du plaisir). Néanmoins, il n'existe pas de définition exacte de la souffrance chez la volaille (Dawkins *et al.*, 2004).

Des tests simples à réaliser en élevage, permettent d'avoir une première approche de l'état de stress des poulets en fonction par exemple de leurs réactions à un **bruit** ou un **visiteur** (Honaker et Ruszler, 2004) : les marques de griffures peuvent être prises en compte. En effet, une hypothèse veut que l'acte de piquer soit lié à une frustration due à l'absence de bain de poussière et/ou de litière (Bilcik, 2000). Changer le poulet de son environnement habituel (**changement de lieu** par exemple) induit un comportement particulier dû à un changement de stratégie de l'animal pour s'habituer (Bohus *et al.*, 1987). Un test particulier a été mis en place, avec comme origine, la démonstration par Gallup (1979) que l'immobilisation était un indicateur de peur chez la volaille. Il développe aussi l'idée que la peur est une des composantes du stress. Le principe est d'**immobiliser** l'animal sur le dos et mesurer le temps qu'il lui faut pour se redresser. Plus l'animal met de temps plus il est stressé. Cette technique est basée sur l'observation des animaux et elle

reste peu invasive. L'opérateur maintient l'animal dans cette position en exerçant une légère pression sur le bec et le cou de l'animal. Une fois la pression relâchée, si l'oiseau n'a pas réagi dans les 10 secondes, le chronomètre est déclenché et le temps mis par l'oiseau pour se redresser est pris en compte. Le score du test est le nombre de secondes pendant lesquelles l'animal est resté immobile à partir du déclenchement du chronomètre. Divers auteurs ont ensuite adapté le test initial de Gallup. Par exemple, dans le protocole de Campo *et al.* (2001), l'oiseau est maintenu immobile par l'opérateur pendant dix secondes puis ce dernier s'éloigne d'un mètre de l'animal tout en restant visible. Le test dure au maximum 10 minutes soit un score maximum de 600 (secondes). El-Lethey *et al.* (2000) préconisent une contention de 45 secondes, après quoi l'opérateur s'éloigne de l'animal discrètement en restant hors de sa vue. Le comportement de l'animal est enregistré par vidéo pour mesurer la durée du test. Le score limite est de 900 (secondes).

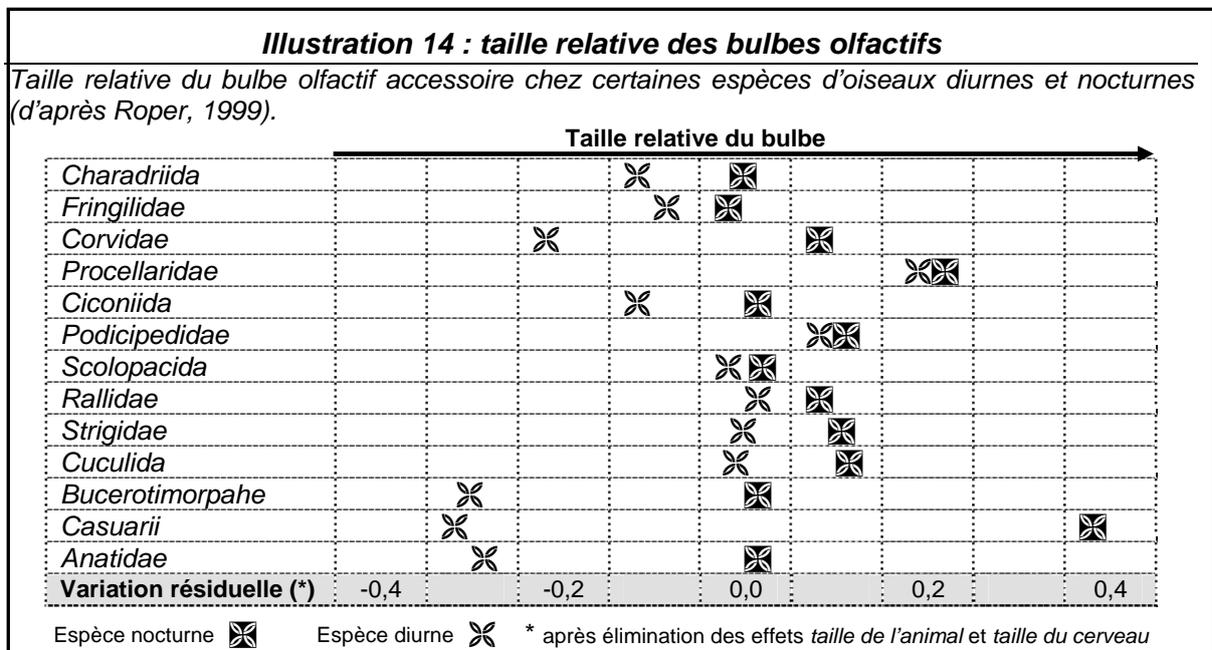
#### SYNTHESE PARTIELLE

Le stress est une réaction de l'organisme pour maintenir son homéostasie. Il est multifactoriel et peut être aigu ou chronique. Il existe des paliers unidirectionnels dans le stress. Les conséquences de ce dernier peuvent être mesurées par les performances, la physiologie et/ou le comportement.

# Chapitre III : l'olfaction et son rôle dans la communication chez les oiseaux

## 1. Mise en évidence de la perception des odeurs

Si la capacité à détecter les odeurs est évidente chez toutes les espèces d'oiseaux, y compris celles ayant des bulbes olfactifs restreints (Mason et Clark, 2000), la majorité des études prennent en compte des effectifs réduits ou une unique odeur, ce qui rend celles-ci peu concluantes. Le développement des bulbes olfactifs chez les espèces diurnes (illustration 14) montre que les oiseaux se sont adaptés en développant leur odorat pour pouvoir s'orienter la nuit (Roper, 1999). Selon Mason et Clark (2000), on peut considérer que les oiseaux peuvent détecter des substances olfactives à des **concentrations inférieures à 1%**. Enfin, le poulet domestique est également capable de détecter et de différencier des odeurs (Mabayo *et al.*, 1996).



Chez le poulet domestique, des travaux montrent que la détection des odeurs devient fonctionnelle en moyenne deux jours avant l'éclosion (Sneddon *et al.*, 1998). Durant cette période, le poussin montre des réponses comportementales et physiologiques caractéristiques s'il est mis en présence d'odeurs spécifiques (Tolhurst et Vince, 1976). En cas d'ablation du bulbe olfactif, Robinson *et al.* (1977) montrent que les poussins mangent plus sans que cette consommation n'influence la croissance pondérale. Porter *et al.* (2002) vont dans le même sens en montrant que des poulets anosmiques grandissent moins vite car leur comportement alimentaire est perturbé.

Le poulet possède une « **mémoire** » des odeurs. En effet, ce dernier rejette des aliments lui rappelant une expérience négative (Turro *et al.*, 1994). Une nouvelle odeur a également des conséquences négatives sur le comportement alimentaire des poulets (Rowe et Guilford, 1999). Des **odeurs familières engendrent des réactions positives** puisque des poussins mis en présence d'un tel stimulus sont rassurés (Jones et Roper, 1997).

## 2. Anatomie de l'organe récepteur

Mason et Clarke (1999), décrivent un système comparable entre les mammifères et les oiseaux. La différence majeure réside dans le fait que les oiseaux ne possèdent ni organe voméronasal, ni nerf terminal. Les investigations quant aux caractéristiques neurophysiologiques du système olfactif des oiseaux montrent que ce dernier est similaire à celui des mammifères, cela depuis les travaux de Tucker (1965). Différentes études menées sur la comparaison des anatomies olfactives montrent des ressemblances remarquables entre amphibiens, mammifères et oiseaux (Mason et Clarke, 1998). Ces mêmes auteurs indiquent d'évidentes similarités entre mammifères et oiseaux concernant l'histogénogénèse des organes olfactifs. Les mécanismes biochimiques sous-jacents induisant une réponse des nerfs olfactifs à une odeur sont également comparables entre les deux amniotes (Koch *et al.*, 1991). Il semble donc qu'un **type de molécule induise une réponse identique**, que ce soit chez les mammifères ou les oiseaux.

D'un point de vue macroscopique, la morphologie du système olfactif des oiseaux consiste en une paire de narines centrales et une série de chambres nasales dans la partie haute du bec (Roper, 1999). L'épithélium olfactif, les nerfs olfactifs et les bulbes olfactifs sont situés sur la partie antérieure du cerveau. Les connexions vers les structures cérébrales se font par l'intermédiaire de cellules sensorielles, qui envoient un message unique au cerveau. Par l'intermédiaire de nerfs jumeaux, les récepteurs de l'épithélium sont connectés avec les bulbes olfactifs. La projection de ces derniers se fait dans différentes parties du télencéphale et du diencéphale, dont le système limbique. Les premiers travaux (initiés par Edinger en 1908) voulaient que la taille des bulbes olfactifs (relativement à la taille du cerveau) soit un index de l'importance de l'olfaction chez l'espèce étudiée. Le ratio entre la plus grande longueur du diamètre du bulbe et l'hémisphère cérébral (ROBS ou Relative Olfactory Bulb Size) a ainsi été calculé pour 124 espèces, donnant des résultats allant de 0,37 à 0,03. La répartition des résultats montre une homogénéité selon les ordres. Par exemple le ROBS est bas chez les passerines et perroquets, alors qu'il a une valeur moyenne chez le poulet domestique. Plus l'animal étudié est récent à l'échelle de l'évolution, plus le ROBS est petit (illustration 15). Il en va de même pour les espèces diurnes (petit), comparativement aux espèces nocturnes (grand). Dans une monographie sur l'anatomie fonctionnelle du système olfactif des oiseaux, Bang (1971) montre les différences des organes nasaux entre oiseaux et autres homéothermes vertébrés. Une corrélation existe entre la taille des bulbes et l'implication apparente de l'olfaction dans le **comportement** (Mason et Clark, 2000).

### **Illustration 15 : rapport entre bulbe olfactif et hémisphère cérébral**

Moyennes des ratios, calculés à partir du rapport entre le diamètre du bulbe olfactif et la taille de l'hémisphère cérébral, chez différents oiseaux (d'après Mason et Clark, 2000).

Ordre	Ratio	Ordre	Ratio
<i>Anseriformes</i>	19,4 ±1,5	<i>Psittaciformes</i>	8,0±1,4
<i>Apodiiformes</i>	12,3±1,9	<i>Falconiformes</i>	17,4±2,6
<i>Apterygiformes</i>	34,0±0,0	<i>Charadriiformes</i>	16,4±0,9
<i>Caprimulgiformes</i>	23,3±0,7	<i>Galliformes</i>	14,2±1,4
<i>Ciconiiformes</i>	20,9±0,6	<i>Piciformes</i>	11,4±1,3
<i>Columbiformes</i>	20,0±1,4	<i>Passeriformes</i>	13,3±0,7
<i>Cuculiformes</i>	19,5±0,6	<i>Pelecaniformes</i>	12,1±1,6
<i>Gaviiformes</i>	20,0±0,0	<i>Coraciiformes</i>	14,5±1,6
<i>Gruiformes</i>	22,2±0,9	<i>Sphenisciformes</i>	17,0±0,0
<i>Procellariiformes</i>	29,1±1,4	<i>Strigiformes</i>	18,5±0,4

D'un point de vue microscopique, on peut différencier les neurones en deux groupes : les récepteurs et les neurones de second ordre. Ils sont reliés par un relais synaptique, situé dans des structures individualisées du bulbe olfactif : les glomérules olfactifs. D'après Chatelain (1992), les neurones, qui portent les chimiorécepteurs, sont situés dans l'épithélium qui tapisse la cavité des organes olfactifs. Les axones (prolongements) de tous les neurones isoréceptifs (expriment le même récepteur olfactif) convergent, dans le bulbe olfactif, vers un seul glomérule qui est connecté (synapse) à une seule cellule intégratrice : la cellule mitrale. L'épithélium constitue donc un capteur en réseau dont les neurones isoréceptifs concentrent leur information vers une seule synapse, augmentant ainsi la sensibilité et la spécificité de l'épithélium. Plusieurs millions de neurones récepteurs convergent vers quelques dizaines de milliers de neurones de second ordre (Sicard *et al.*, 1997). Les axones de ces cellules mitrales, au travers des glomérules, se prolongent ensuite vers les centres supérieurs, régions subcorticales et corticales du cerveau (Wysocki et Preti, 2004).

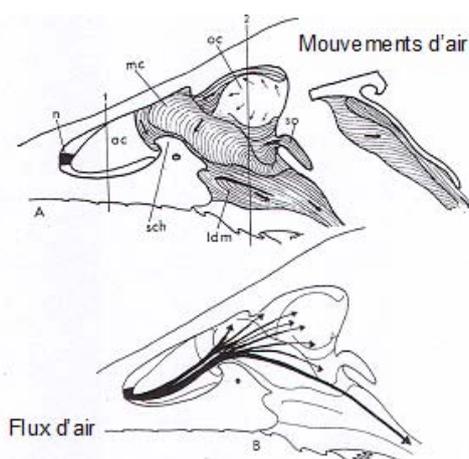
### 3. Physiologie de l'olfaction

A l'exception des kiwis (*Apteryx mantelli*), les oiseaux n'ont pas la capacité à insuffler de l'air dans le système olfactif, même si l'on peut considérer que cela se fait par le flot naturel de la respiration, voire du mouvement (Roper, 1999). Les stimuli olfactifs reposent donc probablement sur des mouvements d'air générés à l'extérieur de l'organisme ou sur les récepteurs du système respiratoire. L'air inspiré passe au travers des narines avant de parvenir aux premières et secondes chambres nasales dont la fonction est probablement de réchauffer, nettoyer et relever le degré d'humidité de l'air rentrant. La deuxième chambre s'ouvre sur les cavités buccales, ce qui permet le passage de l'air vers les poumons pour la respiration. L'air résiduel passe dans la troisième chambre nasale (caudale), liée à l'épithélium olfactif, attaché à un cartilage formant une invagination, ou tubercule (illustration 16).

#### Illustration 16 : trajet des odeurs chez l'oiseau

Schéma descriptif de la dynamique nasale de l'air chez l'oiseau à partir d'une coupe transversale de tête (d'après Bang, 1971).

a : conchae atriale  
 ac : conchae antérieure  
 ld : conduit lacrimonasal  
 ldm : conduit lacrimonasal buccal  
 mc : conchae maxillaire  
 n : narine  
 oc : conchae olfactives  
 s : sinus  
 sch : enflure  
 so : ostium du sinus



Mason et Clarke (2000) montrent que l'accès aux récepteurs olfactifs des molécules odorantes est dépendante de la diffusion au travers d'une membrane. Avant d'atteindre un récepteur, les molécules odorantes, le plus souvent liposolubles, doivent traverser un milieu aqueux créé par des glandes de la paroi nasale. Des protéines de transport appelées *Odorant Binding Protein* (ou OBP) se fixent aux molécules volatiles pour les véhiculer jusqu'au récepteur (Guiraudie *et al.*, 2003). Ces protéines, présentes dans le mucus tapissant toute la cavité nasale, permettent la traversée du mucus ainsi que la

présentation des molécules aux récepteurs (Johnston et Peng, 2000). Ces récepteurs membranaires, au niveau desquels s'effectue l'identification du stimulus, sont des glycoprotéines. Elles sont constituées de sept domaines transmembranaires. La première étape (identification) de l'intégration du message a lieu au niveau du neurorécepteur. Chaque cellule sensorielle envoie donc un code unique au cerveau. La discrimination entre les différents messages olfactifs intervient au niveau des récepteurs et non dans le cerveau. Les neurones bipolaires de la muqueuse olfactive portent les récepteurs des odeurs au niveau de la membrane de leurs dendrites, et sont sensibles aux stimuli chimiques. En se fixant au récepteur à l'extérieur de la cellule, la molécule odorante déclenche la transduction qui se fait à l'intérieur de la cellule. Il en résulte un « signal électrique » qui se propage le long de l'axone. Ces neurones récepteurs transmettent leur message aux neurones de second ordre. L'intégration du message se fait au niveau des régions subcorticales et corticales du cerveau (Wysocki et Preti, 2004).

#### 4. Les médiateurs de la communication chimique

---

Entreprises depuis les années 1960, les études comportementales chez les oiseaux permettent de répartir les médiateurs de la communication chimique en quatre catégories. D'abord, le pigeon voyageur (*Columba livia*) fut objet d'intérêt à cause de sa capacité à revenir vers son lieu d'origine (Wiltschko, 1996). Ensuite, la recherche d'aliments a notamment été étudiée chez le vautour (*Vultur aura*) (Nevitt *et al.*, 1995). Troisièmement, la réponse des oiseaux à des odeurs d'alarme pour signaler la présence de prédateurs est notée par Roper et Marples (1997). Enfin, des tests de préférences sont effectués en rapport avec l'odeur du nid (Clark et Smeraski, 1990).

Le sens olfactif chez les oiseaux provient de leur système olfactif propre, de la gustation et de leur capacité à posséder un « sens chimique commun ». Les médiateurs de ce dernier se nomment les **sémiochimiques**. Le terme général de sémi chimique est utilisé pour décrire une substance chimique émise par une plante, ou un animal, dans l'environnement et qui a valeur de signal entre les êtres vivants (Leroy, 1987). Selon Dicke et Sabelis (1988), les sémi chimiques sont classés en allélochimiques et phéromones. Les allélochimiques, interspécifiques, sont échangés entre des animaux ou des plantes qui appartiennent à des espèces différentes (Topal *et al.*, 2006). Les **phéromones**, intraspécifiques, permettent la communication entre individus de la même espèce (Meredith, 2001).

Le terme phéromone est employé pour la première fois par Karlson et Luescher (1959). Ces derniers définissent une phéromone comme une substance sécrétée par un individu et reçue par un second individu de la même espèce. Elle déclenche soit un comportement spécifique de ce dernier, soit un processus de développement spécifique. Le terme phéromone provient de la contraction de deux mots grecs : *pherein* (porter, transférer) et *horman* (exciter). Les travaux de Holy *et al.* (2000) vont dans le même sens, puisqu'ils démontrent que les phéromones induisent des comportements spécifiques. Les définitions et classifications les plus récentes se rejoignent sur l'idée d'une **réaction comportementale spécifique** (Schaal *et al.*, 2003 ; Kosha *et al.*, 2006). Plus détaillée, la définition de Witt et Hummel (2006) indique que le stimulus phéromonal induit, en plus d'une réponse comportementale, une **réponse endocrinienne** entre individus de la même espèce. Schaal *et al.* (2005) vont plus loin puisqu'ils définissent, à la même époque, une phéromone en conjuguant les conclusions des travaux de Beauchamps *et al.* (1976) et ceux de Johnston (2000), pour établir la définition la plus complète, toutefois restreinte aux mammifères. Ainsi la définition d'une phéromone répond à des critères opérationnels restrictifs.

- ⇒ Le composé est chimiquement simple
- ⇒ La réponse comportementale est univoque, morphologiquement invariante et de fonction évidente
- ⇒ La réponse comportementale est sélective
- ⇒ La réponse comportementale est caractéristique de l'espèce
- ⇒ Le lien stimulus / réponse ne dépend pas d'un apprentissage préalable

Différentes écoles existent pour définir une phéromone. Kiwokaya *et al.* (2005b) indiquent qu'une phéromone d'alarme chez le rat mis dans un nouvel environnement augmente l'anxiété et n'évoque pas de réponse comportementale univoque, contrairement à la définition voulue par Schaal *et al.* En tout état de cause, les études de génétique ne sont pas assez abouties pour déterminer les gènes impliqués dans la communication chimique (Mundi, 2006). Si aucune classification officielle des phéromones n'existe, il semble en revanche possible de les distinguer selon leur action ou l'espèce animale intéressée, comme initié par Mc Donald (1985). Ainsi, Pageat et Gaultier (2003) font un état des lieux de ces composés chez le chat et le chien, montrant l'existence de phéromones sexuelles, de marquage, de dominance ou d'apaisement. Dans un même registre, Mc Glone et Anderson (2002) indiquent qu'un **analogue de phéromone maternelle a des effets apaisants**, entraîne une réponse comportementale et une amélioration du gain de poids chez les porcelets en post sevrage. Ce même composé diminue le stress chez les truies adultes mises en situation de nouveauté (Koori *et al.*, 2005). Meredith (2001) sépare les *priming pheromones*, qui ont des incidences hormonales, et les *signaling pheromones*: responsables d'une réponse comportementale. Dans une distinction plus détaillée, Wysocki et Preti (2004) proposent les phéromones ayant un *primer effects* (effet sur le cycle menstruel de la femme), d'autres agissant comme *signaler* (permettant la reconnaissance du nouveau-né par sa mère), mais aussi des phéromones avec un *modulator effect* (action sur l'humeur). Ces termes sont repris en détails par Preti *et al.* (2003) qui décrivent les sécrétions de l'aisselle de l'homme. Ces auteurs montrent que les phéromones affectent la réponse endocrine (les *primer*) et le comportement (les *releaser*). Ces dernières apportent aussi de l'information (les *signaler*) et entraînent probablement des modifications de l'humeur (les *modulator*). Ces phéromones masculines humaines ont une influence sur le pic de LH de la femme, réduisent les tensions tout en augmentant la relaxation.

Dans le règne animal, l'absence de détection de phéromone constitue un stress, par exemple dans la capacité à se reproduire. Ainsi, un mâle adulte incapable de détecter des femelles en oestrus sera stressé (Martin-Platero *et al.*, 2006). On reporte l'existence de phéromones sexuelles spécifiques chez diverses espèces comme le serpent (Huang *et al.*, 2006). Des phéromones d'alarme ont été mises en évidence chez diverses espèces, comme le rat (Kiyokawa *et al.*, 2004), le saumon (Tierney *et al.*, 2006) ou encore chez certains insectes (Foster *et al.*, 2005). Si l'on considère que l'absence de la mère, ou d'une sécrétion permettant de savoir la mère présente, induit un stress pour les jeunes, alors les **phéromones maternelles** se présentent comme des composés qui permettent d'éviter un stress, comme montré par Schaal *et al.* (2003), Gaultier *et al.* (2005) ou Falewee *et al.* (2006), respectivement chez le lapin, le chien et le cheval. Une phéromone d'allaitement a été mise en évidence et guide les lapereaux vers la mamelle, provoquant le comportement de têtée (Schaal *et al.*, 2003).

Finalement, même s'il a été défini, le terme phéromone suscite nombre de controverses. Ces dernières se formulent en questions pour Beauchamps *et al.* (1976). Est-ce un bouquet de substances ou une substance unique ? Faut-il les associer avec d'autres stimuli ? L'action est-elle multi espèces ? Quelle est l'importance du contexte ? Doit-on attribuer une importance à l'influence de l'expérience ? En allant plus loin, la volatilité moléculaire revêt-elle d'une importance particulière (Baxi *et al.*, 2006) ? Lors d'une table

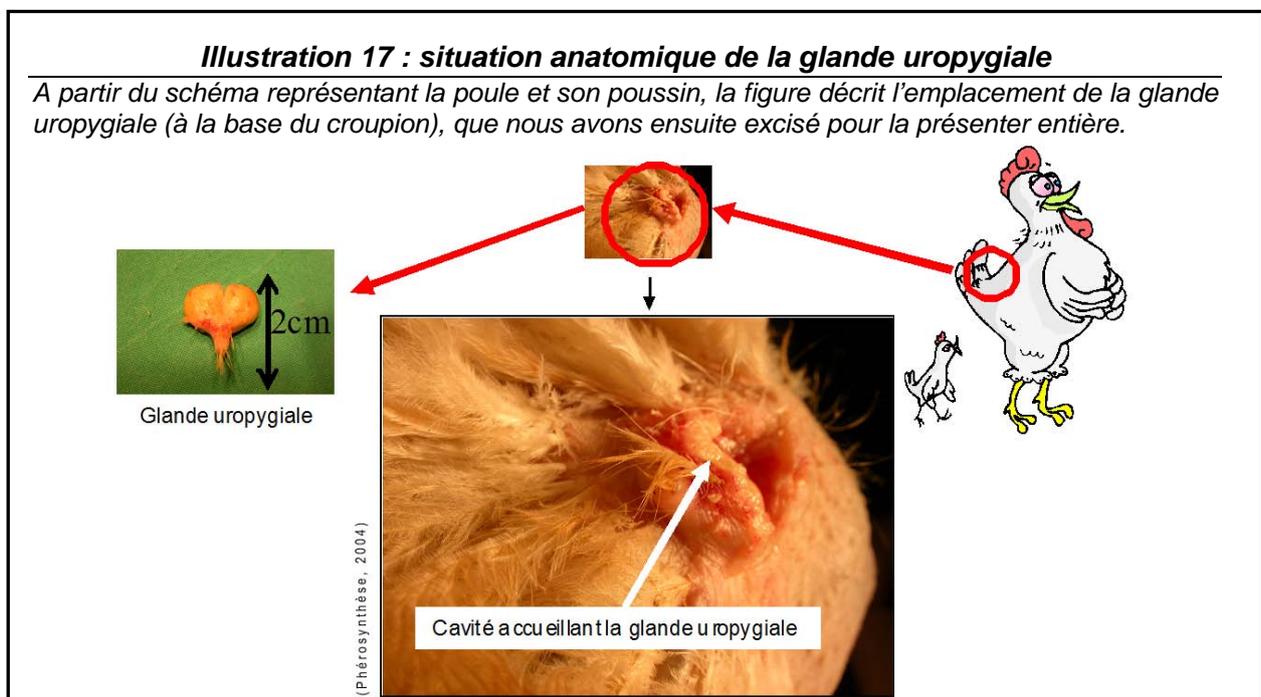
ronde entre spécialistes sur la question, sont ressortis les questionnements similaires ou connexes suivants (Pause, 2006) :

- ⇒ Quelle est la nature chimique des phéromones ?
- ⇒ Sont-elles perceptibles par le système olfactif ?
- ⇒ Sont-elles composées de peu ou d'une multitude de substances ?
- ⇒ La réponse comportementale est-elle caractéristique de l'espèce ?
- ⇒ Leur perception nécessite-t-elle la présence d'un organe spécifique ?
- ⇒ Quel type de réponse peut-on observer : comportementale et/ou physiologique ?
- ⇒ Leur perception nécessite-t-elle la présence d'un organe spécifique ?
- ⇒ Quelle est leur place dans l'évolution ?

Le principal obstacle au qualificatif de phéromone provient du fait que la majorité des conclusions résultent du travail étudiant une substance unique, ce qui est réfuté par Sam *et al.* (2001). L'effet peut être dépendant de la dose puisque l'organe récepteur (organe voméronasal ou VNO) possède un nombre important de récepteurs par neurone, avec un dimorphisme sexuel dans la réponse (Huang *et al.*, 2006). D'autres auteurs n'étudient qu'une espèce, comme Meredith (2001) pour l'Homme ou encore la latence de la réponse, comme Huang *et al.* (2006), qui proposent un temps de réponse de l'ordre de la seconde chez le serpent.

## 5. Les phéromones : production et perception

La **glande uropygiale** (nommée aussi *oil gland* ou *preen gland*) est l'organe de sécrétion des phéromones chez *Gallus gallus* (illustration 17). Historiquement, elle est observée dès le XIXe siècle par Morris, puis lors des expériences menées en 1953 par Elder.



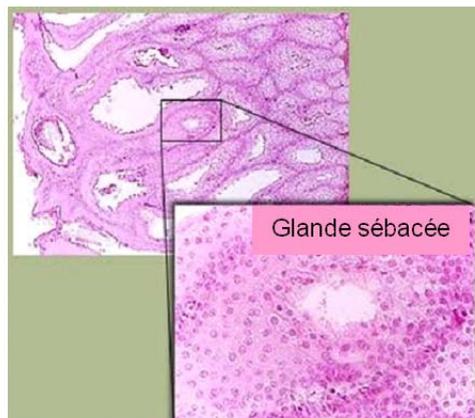
La glande uropygiale est irriguée par l'artère caudale qui, au niveau de la première vertèbre caudale se divise en deux branches et par la veine caudale qui se prolonge par la veine hypogastrique. Son innervation a une double origine : médullaire et sympathique. Les nerfs proviennent de l'espace entre la première et la deuxième vertèbre caudale. En

stimulant le nerf d'un lobe de la glande, Elder a mis en évidence la sécrétion du lobe en question. Parallèlement, la ligature de l'artère caudale arrête cette sécrétion. Les fibres sympathiques contrôlent l'ouverture et la fermeture du sphincter à l'extrémité du conduit. Toujours selon Elder, la *oil gland* sécrète en majeure partie des acides gras qui seront étalés sur le plumage. Les sécrétions permettent d'imperméabiliser les plumes tout en préservant leur structure physique. Sans ces sécrétions grasses, l'isolation contre la chaleur et l'aérodynamisme de l'animal sont amoindris, entraînant une diminution des chances de survie. L'auteur montre aussi que la glande est indispensable à la survie de l'animal en conditions naturelles, mais pas en élevage. En cas d'ablation de la glande uropygiale, on constate une dégradation du plumage, plus prononcée chez le poulet domestique que chez un oiseau sauvage.

Située à la base de la queue, la glande uropygiale est une glande holocrine tubulaire. En effet, son produit de sécrétion résulte des granules produites par l'épithélium des tubules et de fragments cellulaires (Lucas et Stettenheim, 1972). En plus de son caractère imperméabilisant, la substance produite inhibe le développement de champignons comme *Aspergillus sydowii* ou *Aspergillus tamarii*, et de microbes comme *Staphylococcus epidermidis*, qui sont dominants sur le plumage des volailles (Bandyopadhyay et Bhattacharyya, 1996, 1999). La glande uropygiale présente ainsi des similitudes avec les glandes sébacées des mammifères, réparties sur toute la surface du corps (illustration 18). La glande des oiseaux est unique, située sur le dos, au-dessus du muscle élévateur de la queue et à cheval sur les dernières vertèbres sacrales et les premières coccygiennes. Chez les gallinacés, cette glande est surmontée d'une petite touffe de plumes spécifiques en son extrémité, au niveau de la papille. C'est au niveau de cette dernière et vers l'extérieur que se déverse la sécrétion (Elder, 1953). Cependant, chez des individus, on constate un dédoublement complet de cette papille. De ce fait, il peut y en avoir de une à huit. Ceci est lié à la présence d'un gène autosomal récessif (Somes, 1991).

**Illustration 18 : histologie de la glande uropygiale et glandes sébacées**

Coupe histologique de la glande uropygiale de poule dont un agrandissement permet d'observer la similitude avec les glandes sébacées des mammifères.

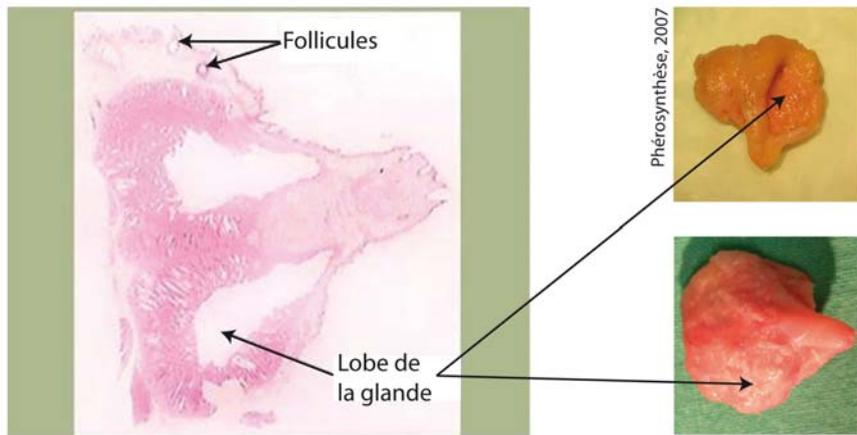


La glande uropygiale est entourée d'une capsule fibreuse qui contient des nerfs et des muscles lisses. Comme indiqué sur les illustrations 19 et 20, chaque lobe est distinct, sans communication. Ces derniers sont séparés par le septum interlobulaire et chacun est en regard avec l'extérieur par un simple conduit. En périphérie se trouvent un grand nombre de tubules qui, en allant vers la lumière, sont plus fins, s'anastomosent et forment un réseau de trabécules. La sécrétion, produite au niveau des tubules, passe dans les cavités secondaires ; celles-ci sont délimitées par les trabécules. La sécrétion est ensuite stockée

dans la cavité primaire avant d'être déversée à l'extérieur par le conduit papillaire (Lucas & Stettenheim, 1972). L'épithélium qui constitue la paroi des tubules est constitué de plusieurs couches de cellules. Ces dernières migrent de la périphérie vers la lumière. Au cours de leur migration, elles se différencient, augmentent de volume et élaborent progressivement le produit de sécrétion (Wagner et Boord, 1975). La paroi des tubules sécréteurs peut être subdivisée en trois zones, de la périphérie vers le centre. La zone I est constituée d'une fine couche de cellules basales, dont les noyaux sont pauvres en chromatine. Au sein de la zone II, les images de mitose sont nombreuses et les corps lipidiques intracellulaires augmentent en taille et en nombre. Enfin, dans la zone III, les cellules sont de grande taille et un grand nombre d'entre elles apparaissent dégénérées.

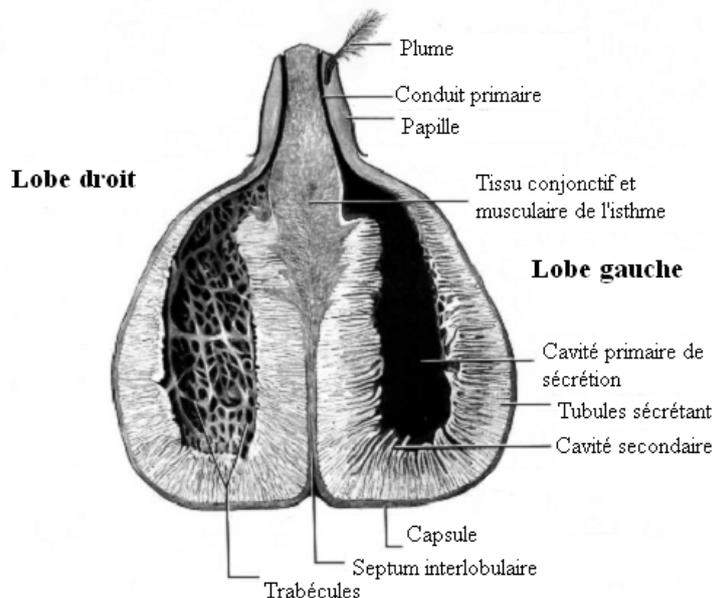
**Illustration 19 : histologie de la glande uropygiale, les lobes internes**

Coupe longitudinale de la glande uropygiale de poule permettant de visualiser l'emplacement des lobes à l'origine des sécrétions.



**Illustration 20 : histologie de la glande uropygiale, schéma de coupe**

Section longitudinale de la glande uropygiale chez *Gallus gallus* (d'après Lucas et Stettenheim, 1972). Cette figure permet d'avoir un agrandissement schématisé de la figure de l'illustration 19.



Selon les espèces et les périodes, les sécrétions de la glande uropygiale peuvent être plus ou moins odorantes (Martin-Platero *et al.*, 2006). Ainsi, la production de cette glande **varie selon l'état physiologique** de l'animal, en sécrétant diverses graisses et d'autres composés organiques (Martin-Platero *et al.*, 2006). Reneerkens *et al.* (2005) montrent que les variations de la composition des sécrétions de la glande uropygiale sont suffisamment remarquables pour qu'elles agissent comme une **clé de reconnaissance** de l'espèce et/ou de l'individu. Ainsi, ces auteurs notent des variations de production de la glande uropygiale chez des espèces nidicoles, leur permettant de protéger le nid, par exemple avec des sécrétions moins perçues par les prédateurs en période suitée. Selye, en 1943, a été le premier à suggérer que la sécrétion uropygiale était sous le contrôle des hormones sexuelles. En effet, c'est pendant la période de reproduction que la glande sécrète le plus. Il a par ailleurs injecté à des poulets Leghorn différentes hormones stéroïdiennes et a observé que la testostérone déprimait la glande, processus réversible après l'arrêt des injections. Parallèlement, un traitement à base d'oestradiol modifie la composition de la sécrétion : la production de monoesters à courte chaîne est remplacée par celle de monoesters à longue chaîne puis par la production de diesters. Les diesters sont produits au niveau des peroxyosomes des cellules constitutives de la glande. Le traitement à base d'oestradiol induit une prolifération des peroxyosomes et donc la production des diesters, phénomène également observé lors de la période de reproduction quand les femelles produisent naturellement des diesters. Cette induction hormonale n'affecte que les glandes sébacées.

Les **hormones surrénaliennes** sont impliquées dans la sécrétion de la glande uropygiale (Asnani et Ramachandran, 1993). En effet, un hypocorticisme entraîne une atrophie de la glande accompagnée d'une destruction des alvéoles par cytopycnose. En cas d'hypercorticisme, provoqué par des injections de corticostérone, on constate une hypertrophie glandulaire avec une augmentation du taux de renouvellement et de la croissance cellulaire au niveau des alvéoles. Une augmentation de la sécrétion lipidique est également mise en évidence (Bandyopadhyay *et al.*, 1990). Enfin, les stéroïdes sexuels semblent impliqués dans l'aspect qualitatif de la sécrétion de la glande, tandis que les stéroïdes surrénaliens seraient impliqués dans la régulation de son activité.

Ces observations permettent de conclure sur l'importance de cet organe en terme de protection physique et de croissance de l'oiseau. En revanche, s'il fut au départ difficile de dire sa capacité à larguer des odeurs, les travaux de Bohnet *et al.* (1991) indiquent que la glande uropygiale est l'unique lieu de sécrétion des substances exocrines chez l'oiseau, notamment de **phéromones**, avec une exception pour les *Struthioniformes*. Si les oiseaux sécrètent des phéromones, il apparaît logique qu'ils sont capables de les détecter.

## 6. La communication olfactive mère-jeune

---

Les travaux de Henning, dans les années 1980 sont les premiers à coupler les termes de « phéromone » et de « mère » dans une même étude (sur des mammifères). En définissant les facteurs d'attraction du jeune vers la mère, Henning (1980) montre que l'olfaction est une clé dans la recherche du nid par le jeune. Plus tard, Morrow-Tesch et McGlone (1990) montrent que des porcelets mis en présence de différentes odeurs ont une préférence pour l'odeur maternelle. Ces auteurs indiquent que le bon fonctionnement du système olfactif est à prendre en considération dans toute étude comportementale.

Des techniques modernes permettent d'observer l'activité cérébrale en des zones connues pour répondre à un stress. Cela permet de savoir si l'absence maternelle induit un état de stress (voir par exemple les travaux de Schwerin *et al.*, 2005). Les travaux effectués par Schaal *et al.* (2006) sur l'Homme montrent une corrélation entre l'évolution temporelle de

la masse corporelle du nouveau-né et la sécrétion des glandes de l'aréole du sein. Les auteurs émettent l'hypothèse d'un rôle communicatif protecteur des substances émises par ces glandes maternelles. Ces conclusions confortent des travaux plus anciens montrant chez l'enfant une stabilisation comportementale en présence de ce même type de sécrétions (Winberg et Porter, 1998).

Effectuées durant la même période que les travaux de Henning, des études montrent que le comportement d'une poule face à sa propre couvée ou à des poussins adoptés n'est différent que le premier jour (Richard-Yris *et al.*, 1983). Ceci semble indiquer qu'une **reconnaissance mutuelle** existe, et que si la poule est surprise le premier jour, les réactions innées d'adoption se mettent en place rapidement. La remarque semble valable dans les deux directions, les poussins n'ayant jamais vu leur « vraie » mère, ne pourront se satisfaire d'une mère « adoptante ». Même si l'on montre que des poussins peuvent s'identifier (empreinte) à des semblables, la période passée avec la mère reste rassurante (Collias, 2000). On montre que si la séparation d'avec la mère constitue un stress pour le poussin car elle est perturbante, le retour vers une odeur familiale le rassure et permet une meilleure croissance (Jones *et al.*, 2002). Chez les pétrels bleus (*Halobaena caerulea*), les poussins sont capables de retrouver leur nid, même dans le noir (Bonadonna *et al.*, 2004), alors que des poussins anosmiques ne reviennent pas vers leur nid (Porter *et al.*, 2002).

#### SYNTHESE PARTIELLE

Le poulet domestique est capable de distinguer des odeurs et de reconnaître une atmosphère maternelle. Les femelles mammifères sont capables de produire des sécrétions apaisantes pour leur progéniture. Les oiseaux sécrètent des phéromones, il semble donc logique qu'ils les détectent.

# **Partie II : objectifs de travail et résultats**

Objectifs de thèse

Les effets de MHUSA

Résultats expérimentaux

# Chapitre I : objectifs et moyens mis en oeuvre

## 1. Notre hypothèse de travail

Nous avons décrit l'absence de la mère comme un facteur propre à induire un stress chez le poulet. La connaissance de **composés maternels apaisants** décrits dans de nombreux travaux chez les mammifères (par exemple McGlone et Anderson, 2002 ; Pageat et Gaultier, 2003 ; Gaultier *et al.*, 2005 ; Falewee *et al.*, 2006) nous a naturellement conduit à vouloir tester une hypothèse similaire chez le poulet. Pour cela nous sommes appuyés sur les parallèles existants entre mammifères et oiseaux au niveau de la relation mère/jeune (illustration 21).

### **Illustration 21 : démonstration de l'importance de la présence maternelle pour le jeune**

*L'importance de la communication olfactive a été décrite chez les mammifères. Des études publiées permettent d'effectuer un parallèle entre mammifères et oiseaux.*

Caractérisation	Référence bibliographique	
	Mammifères	Oiseaux
En présence de la mère (ou de son odeur)		
Attrance du jeune vers sa mère	Morrow-Tesch et Mc Glone, 1990	Collias, 2000
Gain de croissance du jeune	Schaal <i>et al.</i> , 2006	Jones <i>et al.</i> , 2002
Le jeune est rassuré	Winberg et Porter, 1998	Collias, 2000
Changement de comportement	Morrow-Tesch et Mc Glone, 1990	Porter <i>et al.</i> , 2002
Stress en cas d'absence	Henning, 1980	Bonadonna <i>et al.</i> , 2005

Nous avons considéré que l'âge de sevrage chez *Gallus gallus* se situait à environ sept jours (Nicol, 2004). Les résultats des travaux de Richard-Yris *et al.* (1983) suggèrent que la poule suitée sécrète une production particulière, en relation avec les productions hormonales. Les premières analyses de ce type de sécrétions montrent des **analogies avec les sécrétions apaisantes** citées plus haut. Parce que ces dernières ont été classées parmi les phéromones, cela nous a amené dans un premier temps à parler de phéromone apaisante de la volaille, nommée AAPc pour Avian Appeasing Pheromone chicken. Ensuite nous avons nommé la composition moléculaire HOA (Hens' Odorant Analogue) pour permettre une meilleure compréhension et diffusion de l'information auprès de la communauté scientifique au regard de nos premiers résultats. Le terme **Mother Uropygial Hens' Secretion Analogue (MHUSA)** nous a ensuite paru plus précis, faisant état du lieu de sécrétion et ne qualifiant pas cette dernière d'odeur de phéromone, évitant les polémiques dues à la sémantique du terme. En définitive, AAPc, HOA et MHUSA sont des synonymes.

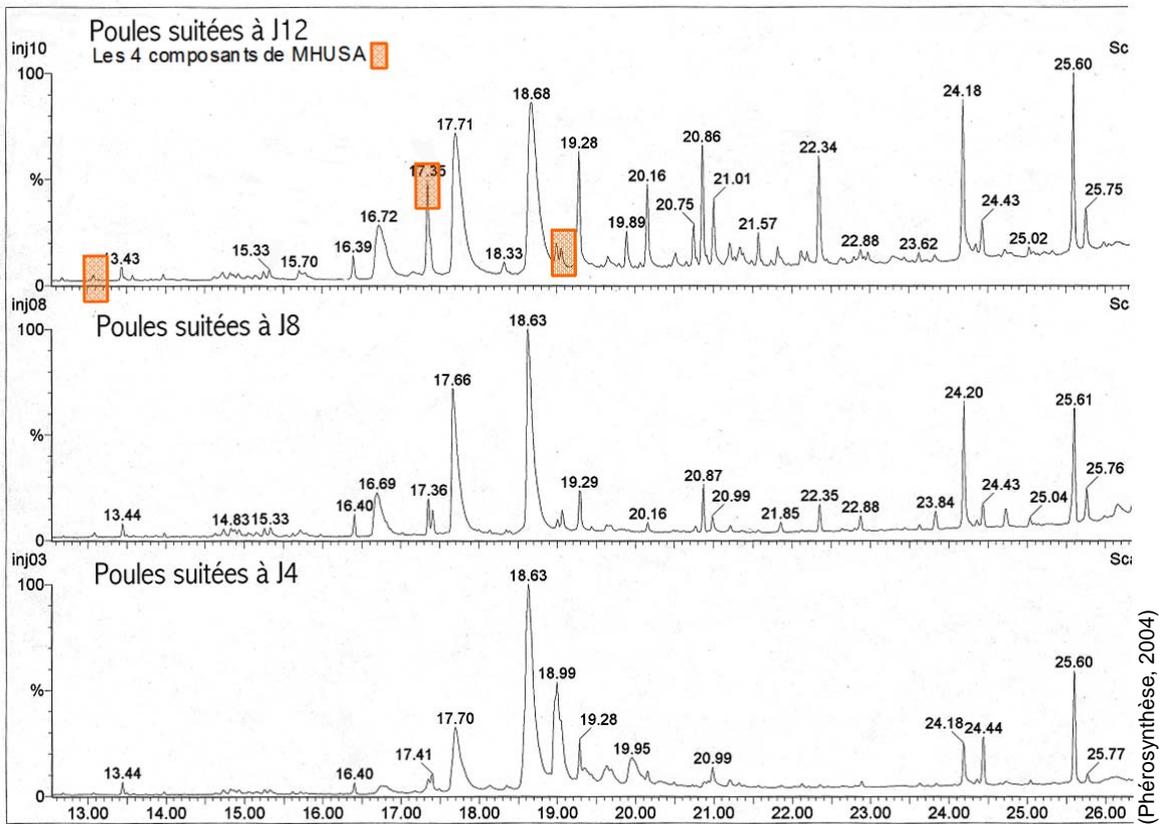
## 2. Description de MHUSA

Des prélèvements sont effectués en pressant la **glande uropygiale de poules suitées**. La cinétique de prélèvements s'effectue en quatre étapes à partir de l'éclosion du premier œuf de la poule (quatre moments de prélèvement). Ensuite un prélèvement est effectué quatre jours, puis huit jours et enfin douze jours post éclosion. Les échantillons sont recueillis avec une compresse en coton (non tissé), mis dans un solvant (Dichloro-Méthane) jusqu'à l'analyse. Les échantillons de poules de même état (nombre de jours par

rapport à l'éclosion) sont alors regroupés pour former un *pool*. Cet ensemble est analysé par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS, Perkin-Elmer, type Turbo Mass). La formulation de l'**analogue** de sécrétion s'effectue à partir du chromatogramme issu de cette analyse, en éliminant certains composants (illustration 22). En effet, dans le *pool* de sécrétions analysé, il est possible d'avoir des messages de nature différente, des composés qui ne font pas partie de ces messages, mais qui les accompagnent ; d'autres n'ont rien à voir (illustration 23).

**Illustration 22 : chromatogrammes à l'origine de la création de MHUSA**

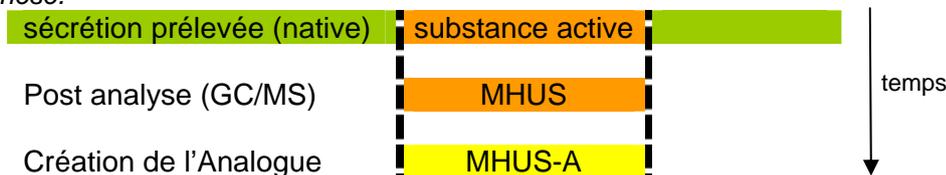
Le chromatogramme à la base de la création de MHUSA a été étudié à partir d'une chromatographie en phase gazeuse couplée à de la spectrométrie de masse (GC/MS), comparant des poules suitées et des poules non suitées. La sécrétion de la glande uropygiale des poules suitées se stabilise à J12, soit 12 jours après l'éclosion des œufs. Chaque carré orange indique les pics caractéristiques des quatre composants typiques des poules suitées.



L'illustration 23 reprend la logique de notre démarche : la poule suitée sécrète par l'intermédiaire de la glande uropygiale un sémiochimique, dont nous avons créé un analogue, qui permet une relation avec les poussins. L'analogue est incorporé à une matrice gel de type macromoléculaire (Nicols France, 59980 Berty) pour former un bloc (illustration 24) qui permettra une diffusion passive des composés, et dont le débit est positivement corrélé avec la température. Nous avons observé une perte moyenne de masse du bloc durant les quatre premières semaines de respectivement 49g, 42g, 35g et 21g pour une masse moyenne de départ de 150g et une température de 24°C. Sur les quatre semaines d'observation, qui représentent la durée de vie estimée du bloc, la perte moyenne quotidienne de masse est de 5g/j.

### Illustration 23 : étapes amenant à la création de MHUSA

Chronologie de la création de MHUSA à partir de la sécrétion native (MHUS ou Mother Hens' Uropygial Secretion). La sécrétion de la glande uropygiale est épurée et la substance active est déterminée comme indiqué sur l'illustration 22. De la sécrétion à MHUSA, le processus a été réalisé par Phérosynthèse.



Les composés de MHUSA, sous forme d'ester de méthyl (Fatty Acid Methyl Ester ou FAME), comportent de 13 à 19 carbones (C13 à C19) pour un poids moléculaire variant de 214g/mol à 296g/mol. Le point de solidification de MHUSA se situe en dessous de 20°C. Au-dessus de ce point se produit une tension superficielle de vapeur, ce qui permet la diffusion des composés puisqu'ils se situent en phase liquide. Partant de l'observation des conditions d'élevage industriel, nous considérons que la diffusion est efficace à une température ambiante d'élevage avicole (23°C à 33°C). MHUSA se compose de lorate de méthyl (C13), de palmitate de méthyl (C17), de linoléate de méthyl (C19) et d'oléate de méthyl (C19). MHUSA fait l'objet d'un brevet international, déposé avec la patente PCT/EP03/007144 (Pageat, 2002).

### 3. Objectifs et méthode générale

L'objectif du travail présenté est de déterminer l'impact de MHUSA (*Mother Hens' Uropygial Secretion Analogue*) sur le stress et les conséquences du stress, aigu ou chronique, chez le poulet de chair (*Gallus gallus*). Parce que nous avons défini les conséquences du stress comme facteur d'influence à trois niveaux (zootéchnie, physiologie et comportement), l'influence de MHUSA est observée chronologiquement dans ces trois domaines spécifiques. Nous effectuons des tests en élevages ou en conditions d'élevage afin de mesurer les effets de MHUSA sur des indicateurs **zootéchniques**. La réponse **physiologique** des poulets à des stress de contention et de nouveauté et les différences de **comportements** entre les deux traitements en réponse à des événements normés sont évaluées.

La méthode utilisée est une comparaison des conséquences sur l'animal de la diffusion de MHUSA à la diffusion, toutes choses égales par ailleurs, d'un placebo. Les études menées se consacrent à évaluer, créer ou copier un stress environnemental par opposition à un stress infectieux, alimentaire ou thermique. Ainsi les poulets utilisés ne sont pas soumis à des infections, un jeûne ou une température différente des standards de la production industrielle. Leur élevage a été fait en accord avec la réglementation européenne (type 95/29/CE).

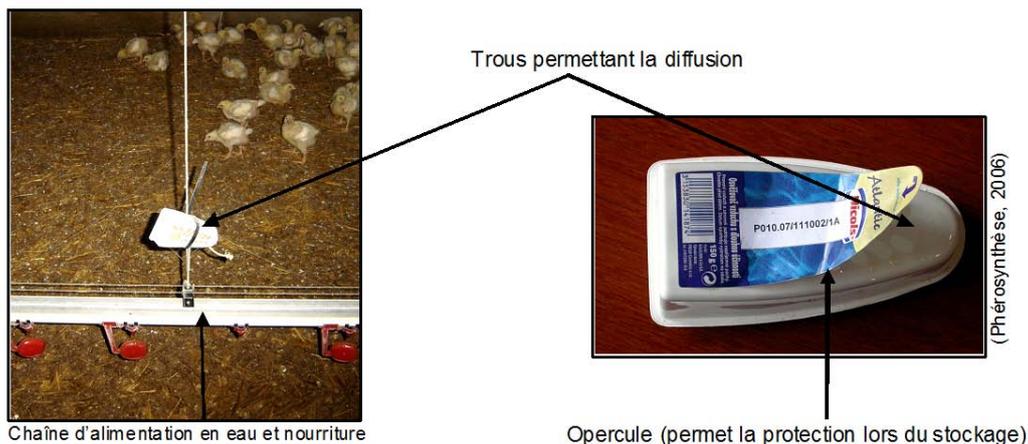
### 4. Moyens mis en oeuvre

Dans tous les essais effectués, nous avons respecté une **procédure en aveugle**. En effet, aucune personne impliquée dans les essais ne connaissait le traitement imposé aux poulets (MHUSA ou placebo). La levée de l'aveugle était effectuée par un chimiste attitré, responsable de l'attribution des traitements, nommés A et B. Les blocs MHUSA et placebo sont strictement identiques (illustration 24) et ne diffèrent que par leur contenu. La différence n'est pas non plus possible par l'odeur. Nous sommes partis du principe qu'une

sélection a entraîné la création de poulets qui peuvent aujourd'hui être considérés comme des clones pour justifier des tests statistiques et notamment du *crossing over*, même si cela n'est pas exact au sens propre du terme. En effet, le fait que les animaux soient abattus en fin de bande ne permet pas de tester l'impact de MHUSA et du placebo sur le même individu (principe du *crossing over*). Afin de pallier ce défaut et de faire face à la variabilité interindividuelle, nous avons choisi de pratiquer nos tests sur un maximum d'individus.

#### Illustration 24 : le bloc diffuseur de MHUSA

Le dispositif de diffusion (MHUSA ou placebo) est un bloc tel que représenté ci-dessous. Il est suspendu dans les élevages à raison d'un bloc diffuseur pour 50m<sup>2</sup>. Il mesure 15cm de hauteur pour une masse de 150g.



Dans une première phase d'analyse, nous avons voulu mesurer les effets de MHUSA en conditions d'**élevage industriel** pour des critères techniques, mais aussi parce que notre idée était de permettre l'utilisation de ce sémiochimique potentiel en élevage s'il possède les effets apaisants escomptés. Les effets de MHUSA sur la **croissance** des poulets (au travers de la mesure des poids vifs (PV) et des deux principaux paramètres sanguins du stress (utilisés en critères secondaires) : ratio hétérophiles/lymphocytes (**HLR**), et corticostérone (**CS**) sont testés dans tous les types de production. En effet, des essais sont effectués sur des poulets domestiques en production de type *Standard*, *Lourd* et *Label*. Des mesures de **qualité de viande** sont aussi effectuées. Les plans d'expérimentation sont à chaque fois similaires. Deux bâtiments identiques accueillent des poussins âgés d'un jour dans des conditions habituelles. La souche, le sexe ratio, les conditions générales d'élevage (température, hygrométrie, alimentation, litière) sont imposés et maîtrisés. Une fois la première bande terminée (animaux abattus), nous observons une période de vide sanitaire d'au minimum deux semaines. A la suite de cette période, les traitements sont inversés et une nouvelle bande est étudiée. Cette procédure de **réplication croisée** nous permet de gommer un éventuel effet bâtiment (mesuré). La connaissance de l'historique de l'élevage (performances, types de production...) permettant une comparaison des bâtiments sur les bandes précédentes peut aussi, mais dans une moindre mesure (c'est pourquoi nous ne l'avons fait qu'une seule fois), nous permettre de déceler un éventuel effet bâtiment. Le traitement débute avant l'arrivée des animaux dans le lieu de test.

Dans une seconde phase, nous avons programmé des essais en **station expérimentale** afin de pouvoir à la fois maîtriser les conditions et mesurer des critères à des fréquences plus rapprochées. Les essais en station ont pour but de tester l'effet de MHUSA sur des critères d'importance économique secondaire. Néanmoins leur incidence sur les

paramètres de production peut être réelle. C'est pourquoi nous avons, pour chaque essai comprenant une période de croissance, choisit de mesurer comme critères secondaires HLR, CS et PV. Tout comme pour les essais effectués en élevage, nous testons **MHUSA contre placebo**. Les essais en stations permettent d'effectuer des mesures en temps voulu, sur effectifs réduits et dans des conditions maîtrisées sans impact de l'effet bâtiment éventuel. Quatre essais sont effectués. Le premier est effectué en continuité avec les essais mesurant les performances zootechniques des poulets puisqu'il teste l'effet de MHUSA sur l'**indice de consommation** afin d'éventuellement mettre en relation des comportements et l'efficacité alimentaire, tout en continuant à mesurer des paramètres physiologiques. Le second a une portée uniquement physiologique et doit permettre de mesurer l'impact de MHUSA sur la production de **cytokines** et sur la **réponse immune** de poulets adultes. Des observations **comportementales** sont aussi effectuées et permettent d'observer la réaction des poulets face à des événements stressants, en fonction de leur âge et donc du traitement. Enfin, à la lecture des résultats des différents essais effectués, il a été décidé de travailler sur des poussins naïfs en les soumettant à un **test de choix**.

A partir de nos travaux et dans le but les valoriser, chaque essai est présenté sous la forme d'un article qui a pour but d'être **publié** dans une revue à comité de lecture. Les résultats intermédiaires ou *preliminary results*, présentés dans des congrès sous forme de conférence, n'apparaissent dans ce travail que sous une forme peu développée, en développant des idées pour argumenter les résultats trouvés par ailleurs. En revanche, les articles rédigés, publiés ou en passe de l'être, sont répertoriés et leurs résultats servent de corps à cette partie. Le chapitre II fait un bilan synthétisé des résultats (tous essais confondus) en les regroupant en trois catégories citées en titre de ce travail. Le chapitre III est une compilation des différentes publications.

#### SYNTHESE PARTIELLE

Une sécrétion maternelle de poule suitée montre des analogies avec des productions de femelles mammifères allaitantes. Nous voulons vérifier l'hypothèse selon laquelle un analogue de cette sécrétion de poule a des répercussions mesurables chez le poulet domestique.

## Chapitre II : les effets de MHUSA, bilan

### 1. Critères zootechniques

Dans les trois types de production (*Standard*, *Lourd* et *Label*) nous constatons des masses finales et intermédiaires plus importantes pour les poulets sous MHUSA. Les résultats (illustration 25) indiquent un effet de MHUSA sur la **croissance** du poulet de chair mesuré par la masse de l'animal. Nous avons également constaté (poulets *Label*) des poids de carcasses supérieurs chez les poulets sous MHUSA ( $p < 0,05$ ). Les essais effectués en station vont dans le même sens puisque les masses individuelles sont différentes en fin d'essai. En effet, que ce soit à 35 jours d'âge (essai sur l'indice de consommation) ou à 38 jours d'âge (essais sur le comportement), des poulets de type *Standard* sont plus lourds sous MHUSA ( $p < 0,01$  et  $p < 0,001$ , respectivement).

#### Illustration 25 : influence de MHUSA sur le poids d'abattage

Comparaison de la masse des animaux lors de l'abattage. Trois types de production sont étudiés. Les résultats permettent de comparer MHUSA vs placebo.

Production	Age d'abattage (j)	Poids d'abattage (g)		Statistique
		placebo	MHUSA	
Label <sup>1</sup>	80	2233±21	2298±22	$p < 0,05$
Lourd <sup>2</sup>	52 (M <sup>3</sup> )	2062±386	2221±411	$p < 0,001$
	40 (F <sup>3</sup> )	1098±210	1133±221	$p < 0,001$
Standard <sup>2,a</sup>	35 (M <sup>3</sup> )	1939±201	2034±257	$p < 0,001$
	35 (F <sup>3</sup> )	1676±180	1748±206	$p < 0,001$
Standard <sup>2,b</sup>	35	1129±294	1238±331	$p < 0,01$
Standard <sup>2,b</sup>	38	1232±321	1492±215	$p < 0,001$

<sup>1</sup>Poids Carcasses, <sup>2</sup>Poids Vifs, <sup>3</sup>On différencie M (mâles) et F (femelles) car leur âge d'abattage est différent.

<sup>a</sup>Standards : en élevage ; <sup>b</sup>Standards : en station.

Les filets issus des poulets sous MHUSA montrent un pH plus élevé à six jours *post mortem* ( $p < 0,05$ ). Mesurée sur les filets, la variation entre 24 heures et six jours *post mortem* du pH apparaît moins importante pour le groupe MHUSA ( $p < 0,05$ ). On n'observe aucune différence quant à la perte en eau entre 24 heures et six jours *post mortem*. La perte en eau est également comparable à la cuisson. Le poids des carcasses et des filets, plus lourds pour les poulets sous MHUSA ( $p < 0,05$ ), indique une **meilleure qualité** dans la mesure où l'on montre que la teneur en gras n'est pas différente selon le traitement. Les analyses de couleur de la viande (sans peau, à 24 heures et à 6 jours *post mortem*) permettant de juger de la tendance rouge (traces de sang) ou jaune (présence de gras) de la viande, de sa luminosité et de la saturation de sa teinte. Les résultats montrent que les viandes, avant cuisson, issues de poulets traités avec MHUSA, sont **moins jaunes** ( $p < 0,05$ ), et que leur degré de saturation à tendance à être moins prononcé ( $p = 0,06$ ). Après cuisson, les viandes issues de poulets traités ont aussi tendance à être **moins rouges** ( $p = 0,07$ ). Nous avons observé des corrélations (0,70 au minimum) qui permettent de différencier les poulets sous MHUSA des témoins (placebo). En effet, après le processus de cuisson, dans le groupe placebo, la luminosité des viandes est corrélée négativement avec le jaune alors que la corrélation est positive en luminosité et rouge pour le groupe MHUSA.

Nous n'avons pas constaté de différence de quantité d'aliment ingérée entre les deux groupes de traitement. Si le traitement MHUSA permet l'obtenir un **meilleur GMQ**

( $p < 0,01$ ), la mesure de l'indice de consommation indique, avant analyse de la qualité de viande, une **conversion alimentaire comparable** entre les deux traitements.

A propos de l'intégrité physique des poulets, nous avons noté plus de femelles que de mâles morts par étouffement, quel que soit le traitement ( $p < 0,05$ ). A leur départ (âgées de 40 jours), on constate une plus grande proportion de femelles issues du groupe témoin mortes durant le transport comparativement au groupe sous MHUSA ( $p < 0,05$ ). En revanche nous observons l'inverse pour les mâles (âgés de 52 jours) : plus de morts durant le transport dans le groupe MHUSA ( $p < 0,05$ ). Les animaux ayant reçu le traitement MHUSA présentent **moins de marques**, entraînant un déclassement de la viande, que ceux du groupe témoin, quel que soit le sexe ( $p < 0,001$ ).

## 2. Critères physiologiques

L'illustration 26 indique des résultats concordants tendant à montrer des valeurs de **HLR et de CS moins élevées** chez les animaux sous MHUSA. Les effets de MHUSA apparaissent moins marqués sur les poulets *Label*. En situation de stress extrême (isolation, contention, transport cumulés ; la comparaison des valeurs de HLR et de CS pour les deux traitements confondus et entre les deux traitements aux différents moments (toutes les 60 minutes) de prise de sang (notés T0, T1, T2 et T3, respectivement) indique une différence significative sauf pour T0, qui représente la valeur basale (illustrations 27, 28, 29 et 30). Ces résultats indiquent que les animaux sont en conditions stressantes puisque que l'on observe une élévation significative des paramètres de stress pour les deux traitements confondus (sans tenir compte de l'effet traitement).

### Illustration 26 : valeurs du Ratio Hétérophiles/Lymphocytes (HLR) et de corticostérone (CS) selon le sexe et le type de production (essais en élevage)

Comparaison de la valeur des marqueurs de stress avant la date d'abattage. Trois types de production sont étudiés. Les résultats permettent de comparer MHUSA vs placebo.

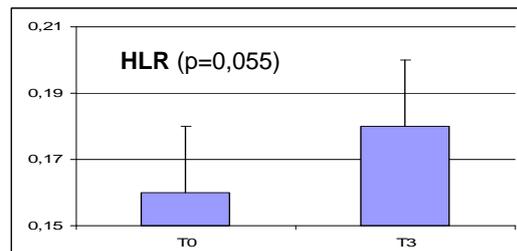
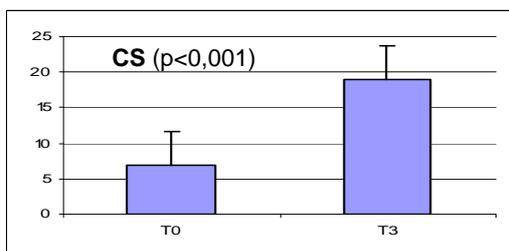
Souche	Age (j)	HLR		Test	CS (ng/ml)		Test
		placebo	MHUSA		placebo	MHUSA	
Label M <sup>1</sup>	80	0,32±0,03	0,40±0,05	NS <sup>4</sup>	16,4±0,5	13,4±0,9	NS ( $p < 0,05$ ) <sup>5</sup>
Label F	80	0,23±0,02	0,28±0,03	NS	9,9±0,8	8,6±1,0	NS
Lourd M	52	1,11±1,26	0,81±0,57	$p < 0,05$	3,4±2,2	2,6±1,4	$p < 0,05$
Lourd F	40	0,85±0,08	0,77±0,10	$p < 0,05$	2,4±0,5	2,3±0,7	$p < 0,05$
Stand <sup>2</sup> M	35	0,24±0,10	0,18±0,08	$p < 0,01$	6,2±6,1	7,1±5,1	NS
Stand <sup>2</sup> F	35	0,27±0,08	0,21±0,08	$p < 0,01$	7,2±5,5	2,6±3,7	$p < 0,001$
Stand <sup>3</sup> M	35	0,32±0,19	0,28±0,12	NS ( $p < 0,001$ ) <sup>5</sup>	6,2±6,1	4,4±11,8	$p < 0,01$
Stand <sup>3</sup> F	35	0,39±0,24	0,26±0,10	$p < 0,001$	10,6±13,9	10,5±5,6	$p < 0,001$

<sup>1</sup>M (mâles) et F (femelles) ; <sup>2</sup>Stand. : Standards en élevage ; <sup>3</sup>Stand. : Standards en station

<sup>4</sup>NS : Non Significatif ; <sup>5</sup>significatif si on regroupe M+F

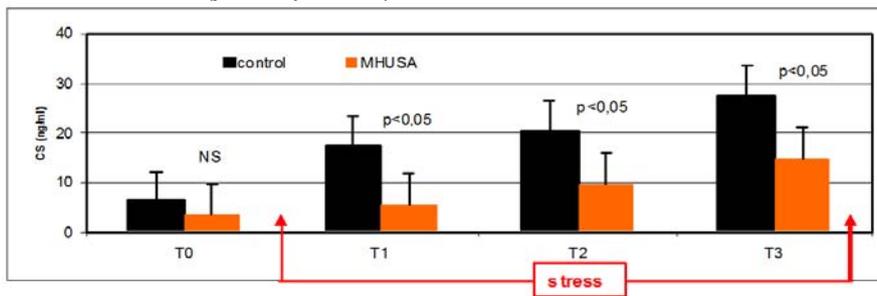
### Illustration 27 et 28 : marqueurs de stress lors d'un isolement en cage de verre

Corticostéronémie CS (ng/ml) et ratio hétérophiles/lymphocytes HLR de poulet ( $n=24$ ) isolé dans une cage en verre. T0 est avant l'isolement, T3 est 180mn après le début de l'isolement.



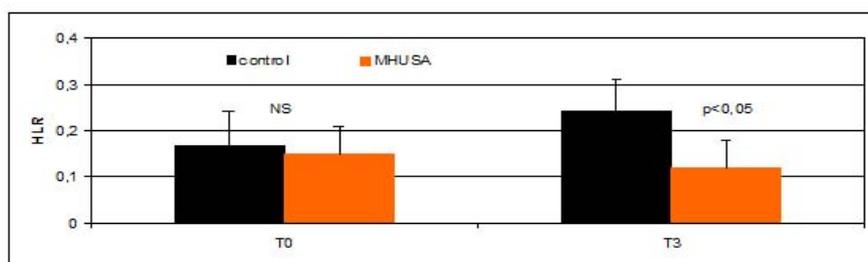
**Illustration 29 : influence de MHUSA sur le taux de corticostérone de poulets lors d'un isolement en cage de verre**

Corticostéronémie (CS) de poulet isolé ( $n=24$ ) dans une cage en verre durant 180 minutes selon qu'il soit ou non en présence de MHUSA. T0 est avant l'isolement, T3 en fin d'isolement. Les relevés sanguins sont effectués toutes les 60 minutes pour (T1, T2 et T3). Le traitement est actif à partir du début de l'isolement (juste après T0).



**Illustration 30 : influence de MHUSA le ratio hétérophiles/lymphocytes de poulets lors d'un isolement en cage de verre**

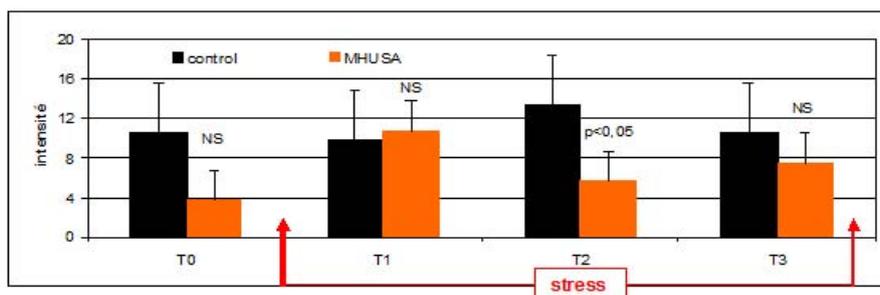
Ratio hétérophiles/lymphocytes HLR de poulet isolé dans une cage en verre durant 180 minutes selon qu'il soit ou non en présence de MHUSA. T0 est avant l'isolement, T3 en fin d'isolement. Le traitement est actif à partir du début de l'isolement (juste après T0).



Les poulets sous MHUSA montrent des taux circulants de  $IFN\gamma$  et de IL6 moins élevés respectivement à 120 minutes (T2) à 60 minutes (T1) post introduction dans la salle de test ( $p < 0,05$  pour les deux valeurs ; illustrations 31 et 32). En revanche on ne constate aucun effet sur la production de IL1- $\beta$ .

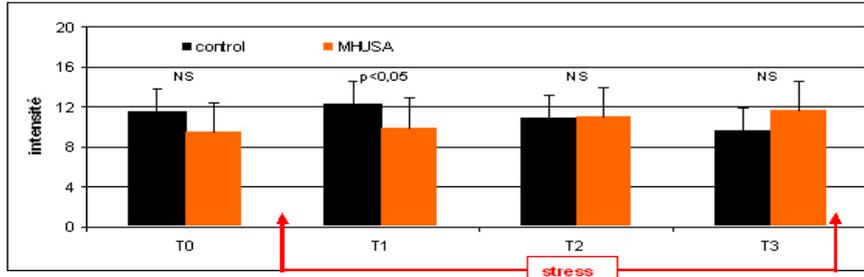
**Illustration 31 : influence de MHUSA sur la production de  $IFN\gamma$  lors d'un isolement de poulets en cage de verre**

Mesure par la technique du Western Blot des taux de  $IFN\gamma$  de poulet isolé ( $n=24$ ) dans une cage en verre durant 180 minutes selon qu'il soit ou non en présence de MHUSA. T0 est avant l'isolement, T3 en fin d'isolement. Les relevés sanguins sont effectués toutes les 60 minutes pour (T1, T2 et T3). Le traitement est actif à partir du début de l'isolement (juste après T0).



### Illustration 32: influence de MHUSA sur la production de IL6 lors d'un isolement de poulets en cage de verre

Mesure par la technique du Western Blot des taux de IL6 de poulet isolé ( $n=24$ ) dans une cage en verre durant 180 minutes selon qu'il soit ou non en présence de MHUSA. T0 est avant l'isolement, T3 en fin d'isolement. Les relevés sanguins sont effectués toutes les 60 minutes pour (T1, T2 et T3). Le traitement est actif à partir du début de l'isolement (juste après T0).

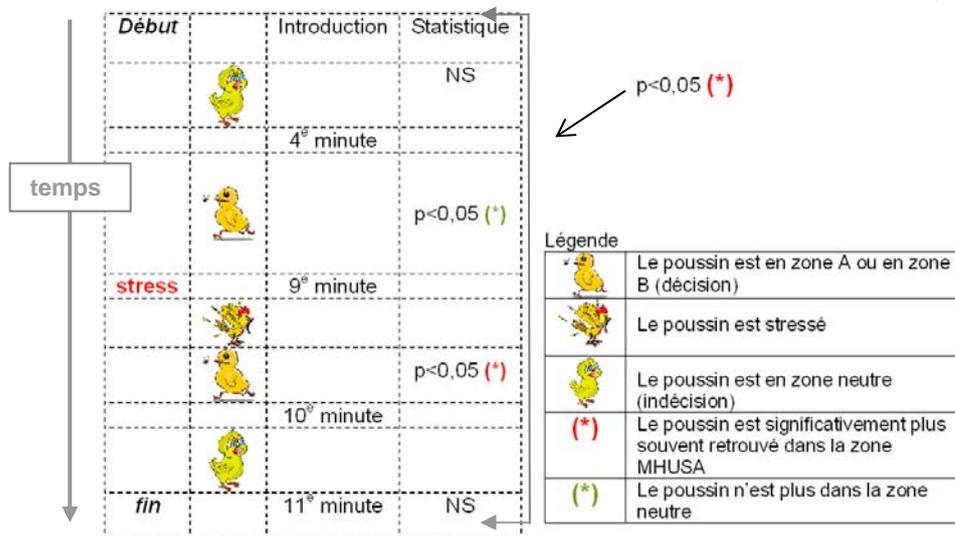


### 3. Critères comportementaux

Des poussins naïfs et isolés sont significativement plus **attirés par MHUSA** que par un placebo juste après un stress sonore et 60 secondes après ce dernier ( $p < 0,01$  pour les deux observations). On constate aussi que, soumis à un choix libre, ces poussins sont plus souvent retrouvés dans la zone MHUSA, comparativement à une zone neutre ou une zone placebo ( $p < 0,05$ ). A partir du début d'un test de choix (MHUSA vs neutre vs placebo) à la quatrième minute on constate qu'il y a plus de poussins dans la zone dite neutre comparativement aux deux autres zones (MHUSA et placebo) cumulées ( $p < 0,05$ ). Ceci représente le temps de latence pour que le poussin choisisse la zone dans laquelle il veut se situer, suite à son isolement. L'illustration 33 permet de récapituler les résultats obtenus lors du test de choix chez le poussin isolé.

### Illustration 33 : test de choix

Répartition spatiale d'un poussin isolé dans un tunnel entre une zone neutre, une zone de diffusion d'un placebo et une zone de diffusion de MHUSA à gradient décroissant depuis la source de diffusion. Une observation est effectuée toutes les 60 secondes durant 11 minutes ( $n=30$ ).



Dans le cadre de stress représenté par un visiteur ou un leurre de prédateur, il y a plus de poulets (adultes) en mouvement dans le groupe placebo ( $p < 0,05$ ) ; avant le stress, quel qu'il soit (illustration 34), Si l'on cumule les comparaisons MHUSA vs placebo après l'événement (illustration 35) : en cas d'apparition du visiteur, il y a plus de regroupements sous placebo. Si le prédateur intervient, il y a plus d'interactions ( $p < 0,05$ ), plus de mouvements ( $p < 0,001$ ) et plus de regroupements ( $p < 0,01$ ) sous placebo. En décomposant les événements (illustration 36), il y a plus d'animaux debout ( $p < 0,05$ ) et à la mangeoire ( $p < 0,05$ ) dans le groupe MHUSA après l'apparition du visiteur qu'avant. Entre avant et après le prédateur, on observe moins de regroupements ( $p < 0,05$ ) sous MHUSA. Sous placebo, il y a plus d'animaux en groupes ( $p < 0,05$ ) après l'apparition du visiteur qu'avant. Entre avant et après le prédateur (placebo), on observe plus d'animaux debout ( $p < 0,05$ ), plus d'interactions ( $p < 0,05$ ) et plus de mouvements ( $p < 0,05$ ). L'illustration 37 permet de récapituler les résultats obtenus avec l'apparition du visiteur et du prédateur dans des enclos de poulets adultes. Les pesées en fin d'essai montrent une différence significative en faveur du groupe MHUSA ( $1492 \pm 215g$  vs  $1232 \pm 321g$ ,  $p < 0,001$  ; illustration 25), que l'on peut mettre en parallèle avec un comportement moins perturbé sous MHUSA. L'étude globale des effets d'un leurre de prédateur permet de montrer que des poulets sous MHUSA effectuent **moins de comportements d'esquive** ( $p < 0,001$ ) et **moins d'interactions** ( $p < 0,05$ ) comparativement à des poulets sous placebo.

#### **Illustration 34: influence de MHUSA sur le comportement des poulets**

On observe les poulets **avant** tout évènement, ce qui traduit l'effet du traitement sur le comportement des poulets (aucune occurrence d'un évènement perturbateur)\*.

Traitements	Avant évènement
Placebo vs MHUSA	Mouvements : placebo > MHUSA

#### **Illustration 35 : influence de MHUSA sur le comportement des poulets face à un évènement potentiellement stressant**

On observe les poulets **après** les deux évènements potentiellement perturbateurs (présence d'un visiteur ou d'un prédateur)\*.

Evènement	Traitements	Après évènement
Visiteur	Placebo vs MHUSA	Groupes : placebo > MHUSA
Prédateur	Placebo vs MHUSA	Interactions : placebo > MHUSA Groupes : placebo > MHUSA Mouvements : placebo > MHUSA

#### **Illustration 36: visiteur vs prédateur et MHUSA vs placebo (comportement)**

A partir des données chiffrées des illustrations 34 et 35, On effectue ici un différentiel entre le nombre de poulets présentant un item comportemental particulier **avant** l'apparition de l'évènement potentiellement perturbateur et le nombre de poulets présentant le même item comportemental **après** l'apparition de ce même évènement\*.

Evènement	Traitements	Différentiel après vs avant
Visiteur	MHUSA	Debout : après > avant Mangent : après > avant
	Placebo	Groupes : après > avant
Prédateur	MHUSA	Groupes : après < avant
	Placebo	Interactions : après > avant Debout : après > avant Mouvements : après > avant

\*Seules sont indiquées les différences significatives ( $p < 0,05$ ) observées sur les 6 items debout, couché, mouvement, mange, interaction et groupe. Observations sur 240 poussins au premier jour d'expérimentation.

### Illustration 37 : stress et items comportementaux

Observations (\*) croisées mesurant l'effet de MHUSA en fonction de l'apparition d'évènements spécifiques stressants chez le poulet en croissance (voir illustration 36). A- On ne prends pas en compte l'évènement : seul l'effet du traitement est alors mesuré. B- L'effet du traitement est mesuré relativement à l'occurrence d'un évènement. C- Il s'agit du même résultat que B mais on effectue la différence (delta) entre avant et après l'occurrence de l'évènement sur le nombre d'individus effectuant un item comportemental.

A- Observations avant les évènements		
Evènement	absence	
Traitement	<b>MHUSA</b>	<b>Placebo</b>
Différences		

B- Observations après les évènements			
Visiteur		Prédateur	
<b>MHUSA</b>	<b>Placebo</b>	<b>MHUSA</b>	<b>Placebo</b>
			

C- Comparaison des observations avant vs après <sup>(1)</sup>				
Traitement	<b>MHUSA</b>		<b>Placebo</b>	
Evènement	Visiteur	Prédateur	Visiteur	Prédateur
Différences				

Légende : items comportementaux					
					
Groupe	Interaction	Allongé	Mange	Bouge	Debout

(\*) Sauf mention indiquée, les figurines indiquent la présence de résultats significatifs dans le sens d'une augmentation du nombre d'individus présentant l'item observé.

<sup>(1)</sup>AV vs AP : la figurine indique une augmentation post évènement.

<sup>(2)</sup>Groupe : diminution entre AV et AP.

### SYNTHESE PARTIELLE

Les résultats expérimentaux montrent une incidence de MHUSA sur des indicateurs de croissance, physiologiques et comportementaux. Les résultats sont concordants et montrent une diminution des indicateurs de stress sous MHUSA.

# Chapitre III : les effets de MHUSA, résultats expérimentaux

## 1. Essais en élevage n°1 : poulet *Lourd*

---

### 1.1. Type de communication et résumé

➤ Type de communication : ce travail a été accepté pour publication au *South African Journal of Animal Science* (accepté le 23 juillet 2008, publication prévue dans le Vol. 38 n°3, août 2008).

#### ➤ Résumé

Des paramètres de performance, physiologiques et comportementaux, de deux groupes de poulets domestiques sont comparés. Les poulets sont élevés dans des conditions d'élevages modernes dans deux bâtiments accueillant chacun 12000 animaux. Un des deux groupes de poulets permet de mesurer les effets de MHUSA (*Mother Hens' Uropygial Secretion Analogue*) qui est diffusé dans un des deux bâtiments, toutes choses égales par ailleurs (MHUSA vs control). MHUSA est une copie synthétique d'une sécrétion odorante maternelle permettant une réduction du stress chez le poulet.

A la fin de la période d'élevage, on montre que les animaux sous MHUSA possèdent des marqueurs de stress moins prononcés par rapport à leurs pendant sous placebo. Les poulets ayant reçu le traitement sont plus lourds (poids de carcasse en kg) que ceux du groupe placebo : 2,22 vs 2,06 pour les mâles ( $p < 0,0001$ ) et 1,13 vs 1,09 pour les femelles ( $p < 0,0001$ ). La proportion (%) d'animaux griffés est plus basse dans le groupe traité : 8 vs 22 pour les mâles ( $p < 0,001$ ) et 10 vs 19 pour les femelles ( $p < 0,001$ ). Les résultats apparaissent moins parlants pour les animaux morts par étouffement : plus de femelles étouffées dans le groupe placebo (6,36 vs 3,25,  $p < 0,001$ ) alors que c'est l'inverse pour les mâles (3,40 vs 2,64,  $p < 0,05$ ). Les poulets ayant reçu le traitement présentent en fin de croissance un HLR plus bas, quel que soit le sexe (0,81 vs 1,11,  $p < 0,01$  pour les mâles et 0,77 vs 0,85,  $p < 0,001$  pour les femelles). Enfin les taux de corticostérone (ng/ml) circulante sont plus élevés pour les mâles sous placebo (3,40 vs 3,64,  $p < 0,05$ ) alors qu'aucune différence significative n'est observée pour les femelles.

Il semble que des poulets traités avec MHUSA présentent une réponse moindre aux stress environnementaux. Néanmoins, les proportions de poulets morts par étouffement indiquent que le traitement ne semble pas agir sur les conséquences d'un stress physiologique. Il apparaît que MHUSA peut constituer un outil intéressant pour l'évaluation du bien-être des poulets de chair élevés en conditions industrielles. De plus, le sémiochimique MHUSA semble avoir un effet positif sur le bien-être de ces animaux.

**Mots clés** : poulet, bien-être, comportement, physiologie, sémiochimique

## **1.2. Texte original de la communication**

**Title: Broilers (*Gallus gallus*) are less stressed if they can smell a mother odorant**

**Authors: I. Madec<sup>1</sup>, J.F. Gabarrou<sup>2</sup>, D. Saffray<sup>1</sup>, and P. Pageat<sup>1</sup>.**

<sup>1</sup>Pherosynthese, Le Rieu Neuf, 84490 Saint Saturnin Les Apt, France

<sup>2</sup>EI Purpan – 75 voie du TOEC, BP 5761, 31076 Toulouse cedex 3, France

**ABSTRACT** Performance, physiological and behavioural parameters of two groups of domestic chickens were compared. Chickens were raised in classical industrial conditions in buildings allowing 12000 individuals. One group acted as a control, while the environment of the other was perfused with MHUSA (Mother Hens' Uropygial Secretion Analogue), a synthetic analogue of a mother-hen odorant secretion which has shown its potential in reducing stress-related reactions in chickens. At the end of the rearing period, the animals treated appeared less stressed, as determined by a range of behavioural and physiological parameters. Even if there was no treatment effect on live weights, carcasses of MHUSA treated animals were heavier and showed less scarring from fights. The influence of MHUSA is proven when it is removed from the atmosphere. Sex and age appeared to have an importance with regard to the action of MHUSA on the number of suffocated animals. There were no differences between the two groups in a variant of the tonic immobility test. Thus this semiochemical appears to have a positive effect on broiler welfare.

**Keywords:** Broilers, Welfare, Behaviour, Physiology, Semiochemical

## INTRODUCTION

A secretion from the uropygial gland of mother hens has been isolated on poultry (*Gallus gallus*) in natural conditions (mother with her chicks). This secretion shows a chemical pattern comparable to the appeasing pheromones discovered in mammals (pigs, horses, dogs...), which have an appeasing effect on their young (Pageat and Gaultier, 2003; Mc Glone and Anderson, 2002; Moltz and Leet, 1981). The native secretion, composed of fatty acids, is produced continuously from four days before hatching until separation occurs. A synthetic analogue called MHUSA (Mother Hen Uropygial Secretion Analogue; Pat. PCT/EP03/007144) has the same chemical composition as the native secretion. Therefore, MHUSA has the potential to reduce stress in domestic chickens, in farming conditions in particular (Madec et al, 2006, 2008). In poultry, behavioural parameters related to stress have been widely studied to assess welfare. These parameters are either in relation with natural conditions (Maria et al., 2004) or with pure behaviour (Roden and Wechsler, 1997). The majority of these results come from small scale studies. They allow the observer to take into account the large number of parameters but are very time consuming (Campo et al., 2000). It appeared to us that it would be of great interest to have criteria that characterize stress related behaviour in classical husbandries, but of an easy use, considering the large number of animals. It has been shown that correlations exist between behaviour in response to stress and physiological parameters such as the heterophil/lymphocyte ratio (HLR) (Puvaldolpried and Thaxton, 2000) or the corticosterone level (Post et al., 2003). Performance parameters are also related to stress: lower growth curves may be observed (Tankson et al., 2001) and the number of downgraded animals (i.e. suffocation or marks on the body) is higher (Buitenhuis et al., 2002). It appears that these parameters may be utilized to assess behaviour related to stress when a great number of animals is to be studied. The starting hypothesis is that MHUSA has an appeasing effect on chicks, and thus, that the impact of stress should be lower when using MHUSA. A trial has been built to first evaluate the impact of MHUSA on stress parameters related to behaviour, and second to evaluate its possible use as a tool for further studies.

## MATERIALS AND METHODS

Two adjoining broiler production buildings of 1200m<sup>2</sup> each were chosen because of the structure and constant production figures. A total of 24000 animals (2/3 males, 1/3 females, strain ROSS 308) were reared in each house. Animals were one day old upon arrival. Each building was separated into 2 sections: one for the males and one for the females. Females were slaughtered on day 40, males on day 52. From day 40 to day 52, males were raised using 100% of the building area. Food and water were provided ad libitum. The litter, composed of wood shavings, was fresh on day 0 and lasted for the entire batch. Buildings were of Louisiana type: no enrichment nor cages, temperature was controlled using gas heaters or outdoor temperature using automatic blinds. Light schedule was six hours of continuous dark and 18 hours of continuous light per 24 hours. Six hours before transport to slaughter, chickens stopped receiving food. Two different treatments were compared using a double blind procedure (all personnel involved in the trial were unaware of which groups received placebo or MHUSA until the analysis was complete). For the treatment, the atmosphere of the crates was saturated with either MHUSA or a placebo of MHUSA (which acts as control) as described by Madec et al. (2006, 2008). Treatment began on the day prior to the arrival of the chicks (D-1). Each building received a different treatment. We chose this experimental design in order to avoid any cross-contamination of the odour chemicals under test between adjoining buildings. The analogue of the hen's scent was incorporated in macromolecular gelatine blocks (Nicols S.A., 59980 Bertry, France) and was identical to the treatment tested in previous field trials (Madec et al., 2006 ; Madec et al., 2008). The gelatine matrix was composed of water (>90%), non ionic surfactant (4%) and a gelling gum (3%). Control and MHUSA blocks had

the same visual characteristics, but Control was only made of the matrix whereas MHUSA blocks included 2% of the active substance (MHUSA). On day 28, the blocks were replaced by new ones, using the same treatment. The treated building is called “MHUSA” and the other “control” (placebo). Because only a double wall separated the two adjoining buildings, they were considered as two identical houses inside a unique unit. The two studied houses were thus similar knowing the aim of our study: same building at the same season (same temperature, hygrometry and light). Moreover, animals were comparable because of their genetic makeup. Therefore the statistical unit considered was the chicken, not the building. Four groups of parameters were studied. The first group took into account the global performance and consisted of the Live Weight (LW) and the Carcass Weight (CW). The second group of parameters related to visual features of the slaughtered birds (percentage of downgraded animals). Animals are usually downgraded because of death by suffocation during transport or because they are scratched (i.e. marks on the body). On the day of departure for the slaughterhouse, two further tests of stress were carried out: a physiological assay and a behavioural test of fear (third group of parameters). These were carried out in the same order with both tests being conducted on the same birds in all cases, with 100 birds from each house (50 males and 50 females) being sampled. Each animal was captured, the behavioural test was performed, and then blood was collected. A behavioural test was adapted from the classic Tonic Immobility test (Gallup, 1977). Each animal was captured and placed on its back in a small hammock for a maximum of 60 seconds. Once the animal was on its back, it was restrained gently (placing one hand over its breast) for 10 seconds and then released but fixed by the experimenter’s gaze (from a distance of one meter, eye to eye contact was made). The time taken for the animal to stand up was recorded, with a censor applied after 60 seconds. At this stage, the bird was considered as ‘still’. A maximum of 60 seconds was chosen because it did not appear possible to stay in the houses while performing the test for 300 seconds (required by the original test from Gallup, 1977) for each studied animal. The physiological blood parameters consisted of HLR and corticosterone levels. The blood was collected via the wing vein and stored in EDTA tubes. HLR was estimated from blood film smears using May-Grunwald and Giemsa stains (Lucas and Jamroz, 1961). One hundred leucocytes (granular and non granular) were counted. Corticosterone levels were determined by Radio Immuno Assay method (De Jong et al, 2001). Behavioural observations and blood samples were performed at night (same conditions in each house). Statistical analysis was performed using the Statistica 5.0® software (Statsoft®). Data were analyzed by comparing means using Student t-test or Mann-Whitney U-test when appropriate. Results are considered significant if  $P < 0.05$ .

## RESULTS

Transport to the slaughterhouse took place on the same day for each building: on day 52 for males and on day 40 for females; both at night. Carcass weights (CW) of control animals were lighter compared with MHUSA treated animals ( $P < 0.001$ , table 1).

**Table 1** Mean ( $\pm$  s.d.) live and carcass weights (g)

	Males		Females	
	Control	MHUSA	Control	MHUSA
Live weight	2843 $\pm$ 501	3086 $\pm$ 752	1607 $\pm$ 326	1693 $\pm$ 338
Carcass weight	2062 <sup>a</sup> $\pm$ 389	2221 <sup>b</sup> $\pm$ 411	1098 <sup>c</sup> $\pm$ 210	1133 <sup>d</sup> $\pm$ 219

a, b, c, d Row means with different superscripts differ significantly at  $P < 0.05$

Final body live weight was lower, but not significantly, in the control group compared to MHUSA for both males and females. The percentage of scratched animals was lower in MHUSA (table 2): 8% vs. 22% and 10% vs. 19% for males and females, respectively ( $P < 0.001$ ). There were more suffocated females in the control group than in the MHUSA

group: 6.36% vs. 3.25% ( $P < 0.001$ ), whereas there were more suffocated males in the MHUSA group: 1.36% vs. 1.11% ( $P < 0.05$ ).

**Table 2** downgraded animals at the slaughter house (%)

	Males		Females	
	Control	MHUSA	MUSHA	Control
Suffocated (%)	1.11 <sup>a</sup> ±0.11	1.36 <sup>b</sup> ±0.12	3.25 <sup>c</sup> ±0.18	6.36 <sup>d</sup> ±0.24
Scratched (%)	22.00 <sup>a</sup> ±0.41	8.00 <sup>b</sup> ±0.27	10.00 <sup>c</sup> ±0.30	19.00 <sup>d</sup> ±0.39

<sup>a, b, c, d</sup> Row means with different superscripts differ significantly at  $P < 0.05$

Comparison of HLR between both groups showed a lower ratio for the MHUSA group ( $P < 0.01$ , table 3). The corticosterone blood level was higher in the control group ( $P < 0.05$ ) for males whereas we did not observe such a significant difference concerning females (table 3).

**Table 3** Heterophils/Lymphocytes ratio and corticosterone level (ng/ml)

	Males		Females	
	Control	MHUSA	Control	MHUSA
Heter./Lymph.	1.10 <sup>a</sup> ±1.26	0.81 <sup>a</sup> ±0.57	0.85 <sup>b</sup> ±0.08	0.77 <sup>c</sup> ±0.10
Corticosterone	3.40 <sup>a</sup> ±2.23	2.60 <sup>b</sup> ±1.37	2.35 <sup>c</sup> ±0.49	2.27 <sup>c</sup> ±0.70

<sup>a, b, c</sup> Row means with different superscripts differ significantly at  $P < 0.05$

The analysis of our behavioural test did not show any difference among groups. We observed comparable means of 39.6 seconds for males and 41.2 seconds for females before the first move.

## DISCUSSION

Our results demonstrate that, when housed in standardized industrial conditions, broilers under MHUSA showed a lower level of stress compared to the control group. Intensity of stress was assessed by measuring physiological and blood parameters. The growth, as a physiological parameter, was assessed through carcass weights. These differences between the two groups are in accordance with the results found in other experiments relative to the consequences of stress on performances (Zulfiki et al., 2002), in particular when using MHUSA (Madec et al., 2006; Madec et al., 2008). This may be due to a lower activity of the MHUSA treated group, which tends to consume less energy and then have a lower catabolism under stressors. This is in accordance with previous observations by Siegel (1995). Blood parameters confirmed the difference of stress between MHUSA and control. Birds from MHUSA group showed lower HLR and corticosterone level. Stressed poultrys having such physiological and haematological modifications tend to show feather pecking (Buitenhuis et al., 2002), which is consistent with our findings regarding corticosterone level and number of scratched animals in the control group. In poultry, several needs have been described and have to be satisfied to ensure the welfare of the birds. Access to water and dust baths, an appropriate density, a group size that allows individual recognition are necessary to the stabilization of hierarchical dominance and socialization to humans (Jones, 1987). If we compare this with the situation observed in the studied houses, several needs appear to be unsatisfied, creating stress-inducing surroundings. On the one hand, the density (20 birds/m<sup>2</sup>) was acceptable according to the current European legislation. On the other hand, there were no water or dust bathing facilities. Except for the provided compacted litter, birds had no access to a real dust bath as described by Vestergaard et al. (1999). Because we had no possibility of modifying the habits of the employees, the socialization to humans was difficult to assess and we cannot conclude on its involvement in possible stressing events. The crucial point seemed to be

the size of the group. As observed in industrial poultry farms, the large size of the group (12000 chickens in each house) does not allow an easy establishment of dominance (Barnard and Burck, 1979). It is almost impossible for the birds to recognize their flock-mates individually (Appleby et al., 1989). This situation is especially critical for male chickens. References about the behaviour of wild chickens show that intraspecific aggressiveness of male chicks begins to develop from the age of one week, becomes stronger as well as more frequent after three weeks and is systematically induced by proximity to other males (Kruijt, 1964). In domestic chickens, the aggressive reactions are delayed when there is habituation to the group (Evans, 1967). According to the technical management of our population, both habituation and hierarchical organization could not occur because of the size of the groups. This situation is responsible for inducing social stress within the studied population. Our results, which showed a difference among sexes in the rate of suffocated animals, can be analyzed as a consequence of a different social stress between males and females. During transportation, the chickens were kept in crates without MHUSA, and the density of individuals from the same sex was dramatically increased, constituting another cause of stress (Nidjam et al., 2004). Female chickens are used to living in packs and closeness does not induce aggressive reactions, nor stress (Evans, 1967). Meanwhile, the longer breeding period for males represents another source of stress as demonstrated by Jensen and Tates (1993). Females and males were transported without MHUSA, and the females who did not experience the social stress did not show any agitation, whereas the males, stressed by the proximity to possible competitors, did. This is assessed by the difference in the corticosterone level observed only in males (table 3), probably causing some of them to die from suffocation. This result raises the question of transporting male chickens with MHUSA to prevent aggressive reactions. The fights between chickens were evaluated by downgraded carcasses because of scratches. Results observed for both sexes highlight the efficacy of MHUSA in controlling stress and aggressiveness. If the fights between males are common, male chickens attack females too (Millman et al., 2000). These aggressions, enhanced by closeness, can be induced by different behaviours and especially by alarm stimulations (Hinde, 1975). If less stressed, as shown by blood and physiological parameters, birds are less likely to show alarm attitudes, they therefore fight less. We did not observe any difference between treatments regarding the behavioural test. According to data, this test is related to acute fear and evaluates the freezing reaction, which is a particular adaptive response and not a sign of chronic stress (Zulkifi et al., 2002). Induction of stress is indeed different from fear (Hughes and Black, 1974). This test may not be appropriate in evaluating differences between stressed and non-stressed chickens. Another explanation could be related to the way we have modified the original test. Because we were not allowed to stay inside the houses too long, we decided to limit our test to 60 seconds instead of the 300 seconds used in the test by Gallup. Our evaluation time is perhaps too short to observe any difference between the two groups. Our starting hypothesis of a reduction of stress using MHUSA is thus consistent with these results, but raises the question of the use of an olfactory stimulation in chickens. Birds have been shown to have functional, well developed, olfactory bulbs (Jones and Carmichael, 1999). Different studies have shown the existing chemical communication among birds (Kolattukudy et al., 1987; Bohnet et al., 1991). In chickens, the secretion of alarm pheromones has been hypothesized as a consequence of the increase of the diameter of the uropygial gland (Bandyopadhyay et al., 1990). Sexual pheromones have been described in ducks, geese (Nicolaidis, 1974, Bohnet et al., 1991) and in the Japanese quail (Abalain et al., 1984). The behavioural and biological effects of MHUSA are similar to the ones observed in mammals when using appeasing pheromones, which decrease aggressive and fear reactions and the cortisol blood level, improving growth (Mc Glone, 1984; Pageat & Gaultier, 2003; Kooni et al., 2005). Taking into account these results and the context of uropygial secretion of nursing hens, we could consider this secretion as a putative chicken

pheromone. This would have to be proven in further experiments, in particular regarding the specificity of this putative pheromone.

## CONCLUSION

This work shows that some parameters may be good indicators of stress behaviour. These parameters are easier to compute compared to a classical behaviour study such as scan sampling or focus sampling, in particular in industrial husbandries. The second main conclusion is that the studied MHUSA is effective in controlling stress in broilers living in intensive farming conditions.

## ACKNOWLEDGMENTS

Authors thank Pr D. Mills from Lincoln University UK and S. Prince, English teacher at El Purpan of Toulouse France, for their help in English proof checking.

## REFERENCES

- Abalain, J.H., Amet, Y., Daniel, J.Y. & Floch, H.H., 1984. Androgen regulation of secretions in the sebaceous-like uropygial gland of the male Japanese quail. *J. of Endocrinol.* 103, 147-153
- Appleby, M.C., Hughes, B.O. & Hogarth, G.S., 1989. Behaviour of laying hens in a deep litter house. *Br. Poult. Sc.* 30, 545-553.
- Bandyopadhyay, A., H. Ranjit, A.H., & Bhattacharyya, S.P., 1990. Adrenocortical influence on kinetics and lipid components of uropygial gland of immature chicks. *Indian J. of Exp. Biol.* 28: 915-919.
- Barnard, C.J. & Burck, T., 1979. Dominance hierarchies and the evolution of individual recognition. *J. of Theor. Bio.* 81, 65-73
- Bohnet, S., Rogers, L., Sasaki, G. & Kolattukudy, P.E., 1991. Estradiol induces proliferation of peroxisome-like microbodies and the production of 3-hydroxy fatty acid diesters, the female pheromones, in the uropygial glands of male and female mallards. *J. of Biol. Chem.* 266, 9795-9804
- Buitenhuis, A.J., Rodenburg, T.B., van Hierden, Y.M., Ask, B., Siwek, M., Cornelissen, S.J.B., Nieuwland, M.G.B, de Groot, P., Korte, S.M., Koene, P., Bovenhuis, H. & van der Poel, J.J., 2002. Feather pecking behaviour and stress response in laying hens: a QTL analysis. 7th WCGALP, Montpellier-France: 14.
- Campo, J.L., Garcia Gil, M., Munoz, I. & Alonso, M., 2000. Relationship between bilateral asymmetry and tonic immobility reaction or heterophil to lymphocyte ratio in five breeds of chickens. *Poult. Sc.* 79, 453-459.
- De Jong, I.C., van Voorst, A., Erkens, J.H., Ehlar, D.A. & Blokhuis, H.J., 2001. Determination of the circadian rhythm in plasma corticosterone and catecholamine concentrations in growing broilers breeders using intravenous cannulations. *Physiol. Behav.* 74, 299-304.
- Evans, R.M., 1967., Early aggressive responses in domestic chicks. *Anim. Behav.* 16, 24-28.
- Gallup, G.G. Jr, 1977., Tonic Immobility: the role of fear and predation. *The Psychol. Rec.* 1, 41-61.
- Hinde, R.A., 1975., *Le comportement animal*. Tome 2. Presses Universitaires de France, Paris: pp 626-627.
- Hughes, B.O. & Black, A.J., 1974., The effect of environmental factors on activity, selected behaviour patterns and fear of fowls in cages and pens.. *Br. Poult. Sci.* 15, 375-380.
- Jensen, P. & Bates, F.M., 1993. Who needs 'behavioural needs'? Motivational aspects of the needs of animals. *Applied An. Behav. Sc.* 37, 161-181.

- Jones, R.B. & Carmichael, N.L., 1999. Domestic chicks are attracted to a familiar odorant in a novel test situation: a brief report. *Applied An. Behav. Sc.* 61, 351-356.
- Jones, R.B. 1987., Social and environment aspects of fear in the domestic fowl. In: Zayan & Ducan (Ed.), *Cognitive aspects of social behaviour in the domestic fowl*. Elsevier. pp. 82-149.
- Kolattukudy, P.E., Bhonet, S. & Rogers, L., 1987. Diester of 3-H fatty acids produced by the uropygial glands of female mallards uniquely during the mating season. *J. of Lipid Res.* 28, 582-588.
- Kooni, M., Yonezawa, T., Kikusui, T., Stafford, K., Pageat, P., Mori, Y., 2005. Synthetic pig appeasing pheromone relieves agonistic stress in adult female pigs. In: Kusunose, K., Shusuke, S. Ed. *Proceedings of the 39th International Congress of the ISAE*, Kanagawa, Japan: ISAE Pub., 132.
- Kruijt, J. T., 1964. Ontogeny of social behaviour in Burmese red junglefowl (*Gallus gallus spadiceus* Bonnatere). *Behaviour Suppl.*, 12.
- Lucas, A.M. & Jamroz, C. 1961., *Atlas of avian hematology*. Agriculture Monograph 25, USDA, Washington DC.
- Madec, I., Gabarrou, J.F., Guillaumey, D., Bougrat, L. & Pageat, P. 2008. Are 35 days enough to observe a reduction of stress by using a hen's semiochemical analogue on chickens (*Gallus gallus domesticus*) housed under high density? *Poult. Sci.* 85, 2112-2116.
- Madec, I., Pageat, P., Bougrat, L., Saffray, D., Falewee, C., Gervasoni, M.A., Bollart, A. & Gabarrou, J.F. 2006. Influence of a semiochemical analogue on growing performances and meat quality of broilers. *Poult. Sci.* 87, 222-225.
- Maria, G.A., Escos, J. & Alados, C.L., 2004. Complexity of behavioural sequences and their relation to stress condition in chickens: a non invasive technique to evaluate animal welfare. *Applied An. Behav. Sc.* 86, 93-104.
- Millman, S.T., Duncan, I.H.J. & Widowski, T.M. 2000. Male broiler breeder fowl display high levels of aggression toward females. *Poult. Sc.* 79, 1233-1241.
- Mc Glone, J.J. & Anderson. D.L., 2002. Synthetic pheromone stimulates feeding behaviour and weight gain in weaned pigs. *J. Anim. Sci.* 80, 3179-3183.
- Mc Glone, J.J., 1984 Olfactory cues and pig agonistic behaviour: evidence for a submissive pheromone. *Physiol. And Behav.* 34, 195-198.
- Moltz, H. & Leet, M., 1981. The maternal pheromone of the rat: identity and functional significance. *Phys. Behav.* 26, 301-306.
- Nicolaides, N., 1974. Skin lipids; their biochemical uniqueness. *Science* 186, 19-26
- Nidjam, E., Arens, P., Lambooi, E., Decuypere, E. & Stegeman J.A., 2004. Factors influencing bruises and mortality of broilers during catching, transport and lairage. 2004. *Poult. Sc.* 83, 1610-1615.
- Pageat, P. & Gaultier, E. 2003., Current research in canine and feline pheromones *The Veterinary Clinics* 33, 187-211.
- Post, J., Rebel, M.J. & ter Huurne, A.A.H.M., 2003. Physiological effects of elevated plasma Corticosterone concentrations in broiler chickens. An alternative means by which to assess the physiological effects of stress. *Poult. Sc.* 82, 1313-1318.
- Puvaldolpried, S. & Thaxton, J.P., 2000. Model of physiological stress in chickens, response parameters. *Poult. Sc.* 79, 363-369.
- Roden, C. & Wechsler, B., 1997. A comparison of the behaviour of domestic chicks reared with or without a hen in enriched pens *Appl. Anim. Behav. Sci.* 55, 317-326.
- Siegel, H.S., 1995. Stress, strains and resistance.. *Br. Poult. Sc.* 36, 003-22.
- Tankson, J.D., Vizzier Thaxton, Y., Thaxton, J.P., May, J.D. & Cameron, A., 2001. Stress and nutritional quality of broilers. *Poult. Sc.* 80, 1384-1389.
- Vestergaard, K.S., Damm, B.I., Abbott, U.K. & Blidsoe, M., 1999. Regulation of dustbathing in feathered and featherless domestic chicks: the Lorenzian model revisited. *Anim. Behav.* 58, 1017-1025.

Zulkifli, I., Gilbert, J., Liew, P.K. & Ginsos, J., 2002. The effects of regular visual contact with human beings on fear, stress, antibody and growth responses in broiler chickens *Appl. Anim. Behav. Sci.* 79, 103-112.

## **2. Essai en élevage n°2 : poulet *Standard***

---

### **2.1. Type de communication et résumé**

➤ Type de communication : ce travail a fait l'objet d'un article dans *Poultry Science* (Poult. Sc. 87, 222-225) - 2008

#### ➤ Résumé

L'effet d'un traitement à base d'analogue de sécrétion de glande uropygiale maternelle de poules suitées est testé en élevage de poulets de chair.

Pour cela deux bâtiments identiques sont utilisés pour conduire un essai en double aveugle contre placebo. Chaque bâtiment reçoit un traitement différent : MHUSA ou un placebo. MHUSA (Mother Hens' Uropygial Secretion Analogue), l'analogue de sécrétion maternelle, est supposé induire une diminution des effets délétères du stress. Ainsi, le bâtiment 1 reçoit le placebo et parallèlement le bâtiment 2 reçoit MHUSA. Après une période de blanc (ou vide sanitaire) d'une durée de deux semaines, incluant le nettoyage des bâtiments, une réplication est effectuée. Ainsi, les poulets du bâtiment 1 reçoivent alors le traitement MHUSA et ceux du bâtiment 2 le placebo. Pour chacune des réplications, les bandes de poussins sont conduites strictement en parallèle, c'est-à-dire que chaque bâtiment reçoit un lot de poussins âgés d'un jour à la même date. En fin de bande, le départ des poulets pour l'abattoir est également effectué le même jour pour les deux bâtiments. Un bâtiment dispose d'une superficie de 400m<sup>2</sup> lui permettant d'accueillir 8400 poulets élevés au sol. Les animaux testés sont issus d'une souche commune de poulets de chair de type Standard (ROSS PM3) prévue pour un abattage entre 35 et 42 jours. La conduite d'élevage est conforme aux recommandations techniques divulguées par le fournisseur de poussins : alimentation, eau, éclairage...

Le propos de cet essai est de tester l'effet de MHUSA sur les performances de croissance, au travers des poids vifs, et les indicateurs sanguins de stress HLR (ratio hétérophiles/lymphocytes) et CS (corticotérorone). Pour cela la diffusion du traitement commence le jour avant l'arrivage des poussins et se termine au moment du départ à l'abattoir.

Les résultats montrent que les poulets sous MHUSA sont plus lourds que ceux sous placebo, que ce soit à la pesée intermédiaire à 17 jours ( $p < 0,001$ ) ou finale à 35 jours ( $p < 0,001$ ). A la fin de la période de traitement, on note à la fois un HLR plus faible ( $p < 0,001$ ) et un taux de CS plus faible ( $p < 0,05$ ) pour les poulets ayant reçu le traitement MHUSA. Ces résultats montrent que les poulets élevés dans une atmosphère saturée par MHUSA ont des indicateurs de stress plus bas que leurs pendant sous placebo.

Une diffusion constante de MHUSA dans les bâtiments d'élevage de poulets de chair semble être une option intéressante pour une amélioration du bien-être des animaux, mais aussi en terme de productivité.

**Mots clés** : poulet de chair, densité, croissance, stress, sémiocimique

## **2.2. Texte original de la communication**

**Title: Are 35 days enough to observe a reduction of stress by using a hen's semiochemical analogue on chickens (*Gallus gallus domesticus*) housed under high density?**

Authors: I. Madec<sup>1</sup>, J.F. Gabarrou<sup>2</sup>, D. Guillaumey<sup>2</sup>, L. Bougrat<sup>1</sup>, and P. Pageat<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Pherosynthese, Le Rieu Neuf, 84490 Saint Saturnin Les Apt, France

<sup>2</sup>EI Purpan – 75 voie du TOEC, BP 5761, 31076 Toulouse cedex 3, France

**ABSTRACT** Two similar 400m<sup>2</sup> buildings, each housing 8400 broilers of a commonly used industrial strain, were used to test the effectiveness of the semiochemical treatment known as MHUSA (Mother Hen Uropygial Secretion Analogue). The birds in one building were exposed to MHUSA continuously during a 35-day growing period while those in the other building received a placebo. The experiment was then repeated using precisely the same conditions but with the building treatment reversed in order to control for any building effect. The purpose of the trial was to evaluate the effect of MHUSA on growing performances (live weights) and stress indicators observed from blood samples: heterophil/lymphocyte ratio and corticosterone level. Data analysis (analysis of variance) showed that MHUSA treated broilers had a higher mean growth rate, as shown by increased live weights at both D17 and D35 ( $P \leq 0.001$  and  $P \leq 0.001$ , respectively). After the 35 day growing period, we observed both lower heterophil/lymphocyte ratio ( $P \leq 0.001$ ) and lower corticosterone level ( $P \leq 0.05$ ) for birds treated with MHUSA compared to placebo, further indicating that the birds were less stressed. We conclude that constant diffusion of MHUSA in buildings used to house broilers might enhance the bird's welfare and growth by reducing stress.

**Keywords:** Broilers, Stocking density, Growth, Stress, Semiochemical

## INTRODUCTION

Broiler chickens, which are used for meat, are typically housed for 35 days at a stocking density of 20 or more birds/m<sup>2</sup>. Pettit-Rilez and Estevez (2001) have shown that stocking densities of more than 15 birds/m<sup>2</sup> are stressful for broilers. At the end of the growing period, birds' average live weight is around 2000g (Petracci *et al.*, 2004), meaning that the stocking density is often more than 40kg/m<sup>2</sup>. Martrenchar, *et al.* (1997) observed that at densities exceeding 43kg/m<sup>2</sup>, there were detrimental effects, including increased fighting. Added to this, most broilers are raised in buildings without outdoor access or opportunities for dust bathing. Large groups size (Barnard and Burck, 1979), which makes the establishment of a dominance hierarchy impossible, and a lack of dust bathing (Vestergaard *et al.*, 1999) tend to lead to aggressiveness (Cornetto *et al.*, 2001). The effects of injury and stress are of concern both to producers and processing plants as they represent a source of significant economic loss. For example, stress has been shown to lower growth curves (Tankson *et al.*, 2001), increase the number of downgraded broilers and can even lead to increased mortality rate (Buitenhuis *et al.*, 2002). Heterophil/lymphocyte ratio (**HLR**) (Puvaldolpried and Thaxton, 2000), corticosterone (**CS**) level and weight gain (Post *et al.*, 2003) are of importance to evaluate both the stress of the birds and the economical efficiency of the production method. A study by Madec, *et al.*, (2006) has shown that the semiochemical analogue MHUSA reduces stress in broilers housed for 80 days at a stocking density of 11 birds/m<sup>2</sup>. The purpose of the current study is to assess the effect of MHUSA on stress and performance parameters during a shorter period housing at a higher stocking density.

## MATERIAL AND METHODS

### ***Animals and breeding conditions***

Birds were one day old when they arrived (noted D0). The population was equally split between males and females. The strain used (ROSS PM3) is a commonly studied meat producing bird with a high standardised growth rate, which is usually slaughtered at between 35 and 42 days of age. The same number of birds (8400) was kept under artificial light (18:24 pattern) in each of two similar 400m<sup>2</sup> buildings without outdoor access. Birds had free access to food and fresh water. Fresh wheat straw litter was installed the day previous the arrival of the chicks and left unchanged throughout the rearing period. Building temperature was controlled by windows and gas heaters. Since we denoted as batch a group of chicks born on the same day and housed from their arrival until slaughter, a batch is composed of 16800 broilers (8400 individuals per building).

### ***Treatment***

In order to construct the Mother Hen Uropygial Secretion Analogue (MHUSA), samples of the natural secretions were obtained from hens by squeezing their uropygial glands once a day for 14 days after the hatching of their chicks. When the pattern was analysed we observed a stabilization of the uropygial secretion from 12 days post hatching. Thus, samples from 12 days post hatching were analysed using Gas Chromatography - Mass Spectrometry (GC/MS, Perkin-Elmer, Turbo Mass). A synthetic analogue was then created (MHUSA, Pat. PCT/EP03/007144). This consisted of a synthetic reconstruction of a fraction of the natural secretion, composed of 12 to 18 carbon length Fatty Acid Methyl Esters (FAME). The treatment was incorporated into a commercially available gelatine matrix block (Nicols S.A., 59980 Bertry, France) weighing 150g and composed of water (135g), non-ionic surfactant (7g) and a gelling gum (5g), plus either 3g of water (placebo) or 3g of MHUSA. The gelatine matrix block (placebo or MHUSA) was held in specially manufactured perforated plastic container suspended 120cm above the ground, out of reach of the birds. The components of MHUSA are heavier than air and this delivery

arrangement allowed the treatment to diffuse into the air around the birds. Finally, treatment was blinded since it was impossible to tell the difference between MHUSA and placebo matrixes (their odour and appearance were identical), and the persons involved in the trial were unaware of which group was given which treatment.

### **Experimental design**

Two buildings and two batches were used in the study (buildings denoted A and B). To avoid cross-contamination between the two treatment groups, treatments were used in separate buildings. For the first batch, birds in building A acted as control (i.e. received placebo blocks) and birds in building B received the semiochemical (i.e. MHUSA blocks). After this first experiment the birds were removed, the buildings were completely emptied and thoroughly cleaned. There was a 14-day washout before introducing the next batch of chicks. The whole experiment was then repeated precisely as before, but with the building treatments reversed in order to control against building effect. 8 “treatment” blocks were installed in each building on the day before the arrival of the chicks (one block per 50m<sup>2</sup>). These blocks were replaced with fresh ones every 15 days meaning that 24 blocks were used per building and per batch.

### **Studied indicators**

At both 16 (D17) and 36 days of age (D35, two days prior slaughter), live weight (**LW**) was measured (Bird Weighing System-1050, Weltech Int., Cambridgeshire, UK) for 400 individuals (100 males and 100 females from each treatment group). A further 50 males and 50 females were taken at random from each building for wing-vein blood sampling for CS and HLR measurement. HLR was estimated from blood film smears using May-Grunwald and Giemsa stain (Lucas and Jamroz, 1961). A 3ml portion of each sample was kept in dry tubes at +4°C before centrifugation (3000rpm, 10min) to collect serum. This was then conserved at -18°C for CS analysis by Radio Immuno Assay method by a specialized laboratory (LDH, ENV Nantes, La Chantrerie, 44300 Nantes, France). These samples were analyzed following a procedure described by De Jong *et al.* (2001).

### **Statistical analysis**

Pooled data were examined by 2-ways analysis of variance using Statistica 5.0 software (Statsoft). Comparisons were made between placebo and MHUSA treatments after replication. Data analysis was then performed for LW (at D35), HLR, and CS. For LW at D17, data were analysed using the same software but by a Student t-test, since sexual dimorphism is not sufficiently well developed to tell the difference between male and female birds at that age (Mignon-Grasteau *et al.*, 1999). For each indicator, we looked for both treatment and sex effect as well as for interaction sex\*treatment. Significance was accepted for values of  $p \leq 0.05$ .

## **RESULTS**

As presented in table 1, broilers who received treatment with MHUSA were heavier at both weighing time points ( $P \leq 0.001$  and  $P \leq 0.001$  at D17 and D35, respectively). At D35, we observed a sex effect as males were significantly heavier compared to females ( $P \leq 0.001$ ). Results for physiological indicators are shown in table 2. We observed a treatment effect on both HLR and CS, with the means of both indicators being significantly lower in the MHUSA treatment group ( $P \leq 0.001$  and  $P \leq 0.05$  for HLR and CS, respectively). There was a significant sex effect on HLR (females > males;  $P \leq 0.05$ ) and a close to significant sex effect on CS (males > females;  $P = 0.07$ ). The only sex\*treatment interaction found was for CS ( $P \leq 0.01$ ).

## **DISCUSSION**

According to our results, MHUSA treatment reduces the impact of stress. Birds reared in an environment continuously perfused with MHUSA showed significantly better mean growth rate, as assessed from LW values. It is known that stress leads to lower LW compared to unstressed or less-stressed chickens (Siegel, 1995). In other species, maternal secretions have been shown to have a positive effect on growth rate of their young. For example, McGlone and Anderson (2002), showed that exposure to a synthetic analogue of a secretion from the teats of lactating sows improved the weight gain of piglets. These findings are comparable to the effects of MHUSA on the growth rate and live weight of broilers in the present study. Additionally, in the study by McGlone and Anderson (2002), the treated piglets engaged in significantly less agonistic behaviour, compared to placebo, indicating a lower level of stress. Numerous references show a positive correlation between stress and LW in poultry (for example Campo *et al.*, 2005 ; Puvadolpriod and Thaxton, 2000 or Beuving *et al.*, 1988). Our findings appear to be in accordance with the literature, in particular with those of McGlone and Anderson (2002). Our results, showing that the impact of stress on broilers is reduced under MHUSA treatment, are also broadly in accordance with findings by Madec, *et al.*, (2006) on slow growing broilers. However, our results showed lower HLR in the MHUSA group, as opposed to results by Madec, *et al.*, (2006), in which no difference in HLR was observed between treatments. In that study, broilers were reared for a longer period (80 days) housed in lower density housing (11 heads/m<sup>2</sup>), with outdoor access. Thus, according to Campo *et al.* (2005), the HLR results for the present study may be linked to chronic stress experienced by the broilers due to higher stocking density than was seen in the study by Madec *et al.* (2006). In the same way that HLR and LW are known to be strongly linked (Puvadolpriod and Thaxton, 2000), there is also a correlation between CS and LW. For example, in case of a CS induced stress, chickens showed lower LW (Beuving *et al.*, 1988). In the present study we observed lower CS level and higher LW in the MHUSA group than in the placebo group. Time taken to carry out sampling can have a significant effect on measured CS, since CS rises 30min after a stress event (Yoa *et al.*, 2004). This did not influence our findings because each bird was blood sampled in less than 2 minutes. It appears that typical industrial housing conditions for broiler chickens less than optimal since we found that it was possible to reduce stress for these birds and that this reduction in stress had significant effects on growth rate. In poultry, access to water and dust baths, appropriate stocking density and group size are needed in order to stabilise dominance (Zuidhof, 2005 ; Jones and Faure, 1981). In the flock studied in the present investigation, these needs were not met. This creates environmental stress (Zuidhof, 2005) as well as social stress (Vestergaard *et al.*, 1999), which may explain the observed treatment effect on HLR and CS levels. The observed sex effect for these physiological indicators is similar to that found by Madec *et al.* (2006). Results from other studies indicate that a sex effect on weight should be anticipated (Woelfel *et al.*, 2002). Our results show that MHUSA increases growth and decreases stress. This suggests that chicks, and growing birds, possess olfactory systems that are able to detect and respond to MHUSA in the air, without actual contact with it. This mechanism is the same as would be expected in a natural response to uropygial secretions. Porter *et al.* (2002) have shown that chicks do have olfactory abilities, which supports the idea that they may be able to detect MHUSA. Nevertheless, this has not yet been ascertained. It would be interesting to know more about the precise effects of MHUSA, such its ability to attract chicks. In their study, McGlone and Anderson (2002) stated that olfactory signals can modulate adaptation to the environment in ways that may improve performance and welfare. Thus, using MHUSA may not only improve poultry welfare in poultry but also produce economic benefits. This is a strong argument for the use of MHUSA as a routine part of poultry husbandry.

## REFERENCES

Barnard, C.J., and T. Burck. 1979. Dominance hierarchies and the evolution of individual recognition. *J. of Theor. Bio.* 81: 65-73.

Beuving G., R.B. Jones, and H.J. Blokhuis. 1988. Adrenocortical and heterophil/lymphocyte response to challenge in hens showing short or long tonic immobility reactions. *Br. Poult. Sc.* 30: 175-184.

Buitenhuis, A.J., T.B. Rodenburg, Y.M. van Hierden, B. Ask, M. Siwek S.J.B. Cornelissen, M.G.B Nieuwland, P. de Groot, S.M. Korte, P. Koene, H. Bovenhuis, and J.J. van der Poel. 2002. Feather pecking behavior and stress response in laying hens: a QTL analysis. 7th WCGALP, Montpellier-France: 14-06.

Campo, J.L., M.G. Gil, S.G. Davila, and I. Munoz. 2005. Influence of perches and footpath dermatitis on tonic immobility and heterophil to lymphocyte ratio of chickens. *Poult. Sci.* 84: 1004-1009.

Cornetto, T., I. Estevez, and L.W. Douglass. 2001. Using artificial cover to reduce aggression and disturbances in domestic fowl. *Appl. Anim. Behav. Sc.* 75: 325-336.

Cranberg, P.H., P.H. Hemsworth, and G.J. Coleman. 2000. Human factors affecting the behaviour and productivity of commercial broiler chicken. *Br. Poult. Sc.* 41, 272-279.

De Jong, I.C., A. van Voorst, J.H. Erkens, D.A. Ehhardt, and H.J. Blokhuis. 2001. Determination of the circadian rhythm in plasma corticosterone and catecholamine concentrations in growing broilers breeders using intravenous cannulations. *Physiol. Behav.* 74: 299-304.

Jones, R.B., and J.M. Faure. 1981. Sex and strain comparisons of tonic immobility (righting time) in the domestic fowl and the effects of various methods of induction. *Behav. Processes* 6: 47-55

Lucas, A.M., and C. Jamroz. 1961. Atlas of avian hematology. Agriculture Monograph 25, USDA, Washington DC.

Madec, I., P. Pageat, L. Bougrat, D. Saffray, C. Lafont, C. Falewee, M.A. Gervasoni, A. Bollart, and J. F. Gabarrou. 2006. Influence of a Semiochemical Analogue on Growing Performances and Meat Quality of Broilers. *Poult. Sc.* 85: 2112-2117.

Martrenchar, A., J.P. Morisse, D. Huonnic, and J.P. Cotte. 1997. Influence of stocking density on some behavioural, physiological and productivity traits of broilers. *Vet. Res.* 28: 473-480.

McGlone, J.J., and D.L. Anderson. 2002. Synthetic maternal pheromone stimulates feeding behaviour and weight gain in weaned pigs. *J. Anim. Sc.* 80, 3179-3183.

Mignon-Grasteau, S., C. Beaumont, E. Le Bihan-Duval, J.P. Poivey, H. De Rochambeau, and F.H. Ricard. 1999. Genetic parameters of growth curve parameters in male and female chickens. *Br. Poult. Sc.* 40: 44-51.

Petracci, M., M. Betti, M. Bianchi, and C. Cavani. 2004. Color variation and characterization of broiler breast meat during processing in Italy. *Poult. Sci.* 83: 2086-2092.

Pettit-Rilez, R., and I. Estevez. 2001. Effects of density on perching behaviour of broiler chickens. *Appl. Anim. Behav. Sc.* 71: 127-140.

Post, J., M.J. Rebel, and A.A.H.M. ter Huurne. 2003. Physiological effects of elevated plasma corticosterone concentrations in broiler chickens. An alternative means by which to assess the physiological effects of stress. *Poult. Sci.* 82 : 1313-1318.

Puvadolpird, S., and J.P Thaxton. 2000. Model of physiological stress in chickens, response indicators. *Poult. Sci.* 79: 363-369.

Siegel, H.S. 1995. Stress, strains and resistance. *Br. Poult. Sci.* 36: 003-22.

Tankson, J.D., Y. Vizzier-Thaxton, J.P. Thaxton, J.D. May, and J.A. Cameron, 2001. Stress and nutritional quality of broilers. *Poult. Sci.* 80:1384-1389.

Vestergaard, K.S., B.I. Damm, U.K. Abbott, and M. Blidsoe. 1999. Regulation of dustbathing in feathered and featherless domestic chicks: the Lorenzian model revisited. *Anim. Behav.* 58: 1017-1025.

Woelfel, R.L., C.M. Owens, E.M. Hirschler, and A.R. Sams. 2002. The incidence and characterization of pale, soft and exudative chicken meat in a commercial plant. *Poult. Sci.* 81: 579-584.

Yoa, M., N.J. Wesphalt, and R.J. Denver. 2004. Distribution and acute stressor induced activation of the corticotrophin releasing hormone neurones in the central nervous system of *xenopus laevis*. *J. of Endocrinol.* 16: 880-893.

Zuidhof, M.J. 2005. Mathematical characterization of broiler carcass yield dynamics. *Poult. Sc.* 84: 1108-1122.

**TABLE 1.** Live weight depending on birds' age.

	MHUSA				Significance (P)		
	Placebo	Females	Males	Females	Treatment	Sex	Treatment*sex
d17 <sup>1</sup>		505.1±73.1		524.6±62.8	***	NC	NC
d35 <sup>2</sup>		1939.5±201.1	1676.5±179.6	2034.5±256.6	1747.8±205.8	***	NS

<sup>1</sup>d17: Pooled (males + females) live weights at 17 days (g). <sup>2</sup>d35: Live weights at 35 days (g). Means are indicated ± Standard Error. \*\*\*P<0.001, NC: not calculated; NS: non significant.

**TABLE 2.** Heterophil/Lymphocyte Ratio and Corticosterone level from blood samples at day 35.

	MHUSA				Significance (P)		
	Placebo	Females	Males	Females	Treatment	Sex	Treatment*sex
HLR <sup>1</sup>	0.214±0.110	0.270±0.008	0.181±0.081	0.213±0.085	***	*	NS
CS <sup>2</sup>	6.23±6.01	7.22±5.49	7.04±5.09	2.63±3.68	*	P=0.07	**

<sup>1</sup>HLR: Heterophil/Lymphocyte Ratio; <sup>2</sup>CS: Corticosterone (ng/ml). Means are indicated ± Standard Error. \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001, NS: non significant.

### 3. Essai en élevage n°3 : poulet *Label*

---

#### 3.1. Type de communication et résumé

➤ Type de communication : ce travail a fait l'objet d'un article dans *Poultry Science* (Poult. Sc. 85, 2112-2116) - 2006

##### ➤ Résumé

Les conséquences du stress en élevage du poulet de chair sont telles que de nombreux critères en sont affectés. Au travers du picage, ou d'une mortalité accrue, la qualité du produit est diminuée. Un analogue synthétique d'une sécrétion de la glande uropygiale de poules suitees est créé et nommé MHUSA (Mother Hen Uropygial Secretion Analogue).

Dans l'élevage test, un bâtiment dispose d'une superficie de 400m<sup>2</sup>. Ainsi, 4400 poulets sont élevés au sol (soit 11/m<sup>2</sup>) par bâtiment et par bande. Les animaux testés sont issus d'une souche de poulets de chair de type *Label* (SASSO T56N) prévue pour un abattage à 80 jours. La diffusion du traitement commence le jour avant l'arrivage des poussins et se termine au moment du départ à l'abattoir. MHUSA est diffusée de manière constante et permanente à l'aide de bloc diffuseurs. Deux bâtiments identiques sont utilisés pour conduire cet essai en double aveugle contre placebo. Chaque bâtiment reçoit un traitement différent : MHUSA ou un placebo. Ainsi, le bâtiment 1 reçoit le placebo et parallèlement le bâtiment 2 reçoit MHUSA. Après une période de blanc (elle correspond au vide sanitaire) d'une durée de deux semaines, incluant le nettoyage des bâtiments, une réplication est effectuée. Les poulets du bâtiment 1 reçoivent alors le traitement MHUSA et ceux du bâtiment 2 le placebo. Pour chacune des répliques, les bandes de poussins sont conduites strictement en parallèle : même jour d'arrivée des poussins et même jour d'abattage. Enfin, la conduite d'élevage est conforme aux recommandations techniques du fournisseur de poussins : alimentation, eau, éclairage...

Le propos de cet essai est de tester l'effet de MHUSA sur les performances de croissance, au travers des poids vifs, et les indicateurs sanguins de stress HLR (ratio hétérophiles/lymphocytes) et CS (corticotérostérone). La croissance des animaux est évaluée au travers de pesées à des moments clés. Les paramètres de stress sont mesurés la veille du départ des animaux à l'abattoir. Des indicateurs de qualité sont aussi pris secondairement en compte, après l'abattage.

Lors de pesées, effectuées à 21, 63 et 80 jours, les poids vifs des poulets sous MHUSA sont plus élevés par rapport au placebo ( $p < 0,01$ ,  $p < 0,01$  et  $p < 0,05$  respectivement). Le poids des filets est aussi plus élevé pour les poulets sous MHUSA ( $p < 0,05$ ), avec une forte corrélation entre le poids des filets et le poids des carcasses ( $R^2 = 0,83$ ). Aucune corrélation n'existe entre les mesures de gras abdominal et le poids des carcasses, ou entre les poids de filets et les mesures de gras abdominal (pour lequel on ne constate pas d'effet traitement). En revanche, la mesure de CS indique un effet traitement (MHUSA < placebo,  $p < 0,05$ ), alors que HLR est comparable entre les traitements. La perte de masse des filets entre 24 heures et 6 jours après l'abattage est comparable entre les traitements. Après cuisson, les échantillons issus de poulets sous MHUSA présentent une viande moins jaune, comparativement au placebo ( $p < 0,05$ ).

Ces résultats indiquent que MHUSA a une influence sur la croissance des poulets de chair. Les poids de filets sont également influencés par le traitement. Ces différences semblent provenir d'une meilleure résistance au stress, comme l'indiquent les mesures de CS. Une exposition permanente de poulets de type *Label* durant 80 jours semble améliorer la croissance des poulets sans conséquences négatives sur la qualité de la viande.

**Mots clés** : poulets, stress, sémiologique, croissance, qualité

### **3.2. Texte original de la communication**

#### **Title: Influence of a Semiochemical Analogue on Growing Performances and Meat Quality of Broilers**

Authors: I. Madec<sup>1</sup>, P. Pageat<sup>1</sup>, L. Bougrat<sup>1</sup>, D. Saffray<sup>1</sup>, C. Lafont<sup>1</sup>, C. Falewee<sup>1</sup>, M.A. Gervasoni<sup>2</sup>, A. Bollard<sup>3</sup>, and J.F. Gabarrou<sup>4</sup>.

<sup>1</sup>Pherosynthese, Le Rieu Neuf, 84490 Saint Saturnin Les Apt, France

<sup>2</sup>ENV Lyon, Marcy l'Etoile, 69000 Lyon, France.

<sup>3</sup>ENV Nantes, LDH - Nantes, Nantes, France.

<sup>4</sup>EI Purpan – 75 voie du TOEC, BP 5761, 31076 Toulouse cedex 3, France

**ABSTRACT** Stress in broilers may have severe consequences on the final product quality. A synthetic analogue of uropygial secretion of mother hens was isolated from poultry. This Mother Hen Uropygial Secretion Analogue (MHUSA) was tested in farm conditions on broilers during twelve weeks. The purpose of this trial was to estimate the influence of MHUSA on growing performances, meat characteristics after processing and on stress indicators of broilers. After the 80 day-period, animals under treatment were heavier at three different weighing ages ( $p \leq 0.01$ ,  $p \leq 0.01$  and  $p \leq 0.05$ ; at 21, 63 and 80 days of age, respectively) and had higher filets weight. A strong correlation between filet weight and carcass weight was found ( $R^2=0.83$ ). No correlation between abdominal fat and carcass weight or between abdominal fat and filet weight was observed. There was no significant difference between treatments concerning abdominal fat. Corticosterone level was higher for animals under placebo treatment ( $p \leq 0.05$ ). No statistical difference was observed for mixed sexes concerning filet weight lost from 24 hours to D6 post mortem. After cooking procedure, samples from the MHUSA group were less yellow compared to control ( $p \leq 0.05$ ). Our conclusion is that the tested semiochemical MHUSA has an influence on live weights, filet weights and corticosterone levels in Label broilers grown to 80 days of age. Constant exposure to the MHUSA enhances growth without decreasing meat quality.

**Key words:** Broiler, Stress, Semiochemical, Growth, Quality

## INTRODUCTION

Meat quality is a major issue in the process industry, mainly because consumers are demanding. Now processing plants need to determine their own meat quality values such as color, cook loss or fat content. Described in other productions, Pale, Soft and Exudative (**PSE**) meat has seldom been related in poultry. These meats show low water-holding capacity, bad textural properties and reduced protein extractability (Tankson *et al.*, 2001). A relationship does exist between color, pH and water-holding capacity (Woelfel *et al.*, 2002; Fletcher, 1999). For example, pigs with PSE meat lose 5% more water during cooking compared to a standardized normal meat (Tankson *et al.*, 2001). Mallia *et al.* (1998) also reported dark firm and dry (**DFD**) carcasses in broilers. It has been shown that stress in poultry has severe consequences on the final product quality: pH, pigmentation, water-holding or fat percentage (Fletcher, 1999). Stress related indicators are known to be heterophil:lymphocyte ratio (**HLR**) (Puvaldolpried and Thaxton, 2000) and the corticosterone level (Post *et al.*, 2003). A secretion from the uropygial gland of mother hens was isolated from poultry (*Gallus gallus*) under natural conditions. This secretion shows a chemical pattern comparable to the calming pheromones discovered in mammals (pigs, horses, dogs...), that have a calming effect on their youngs (Pageat and Gaultier, 2003; Mc Glone and Anderson, 2002; Moltz and Leet, 1981). The native secretion, composed of fatty acids, is produced continuously from four days before hatching until separation occurs. A synthetic analogue (Mother Hen Uropygial Secretion Analogue or MHUSA; Pat. PCT/EP03/007144) has the same composition as the native substance. Therefore, MHUSA has a potential to reduce stress in domestic chicken, in particular in farming conditions (Madec *et al.*, 2005). The purpose of this trial was to estimate the influence of MHUSA on growing performances and meat characteristics of broilers after processing.

## MATERIALS AND METHODS

### **Animals**

A total of 17600 broilers (strain SASSO T56N) were implied in the study. Animals were housed in two similar 400 square meters separate buildings (4400 birds in each building). Animals had free access to water and food. Soil was covered with wood shaving. Animals stayed 12 weeks on the farm and they had free access to outdoor from the age of 4 weeks until slaughter.

### **Experimental design**

Animals in the building A received a placebo treatment whereas animals in the building B received the semiochemical (MHUSA). After 12 months a replication occurred, meaning that animals in the building B received the placebo treatment whereas animals in the building A received the MHUSA treatment. Both batches were studied using exactly the same design. The treatment (placebo or MHUSA) was included in a manufactured slow releasing shape weighing 150g. Each block contained 2% of the semiochemical and released (passive diffusion) it during 4 weeks. Block were hanged 150cm above the ground, out of animals' reach. A total amount of 24 blocks (3 replacements x 8 blocs) were used per building. The placebo product consisted of blocks of the same aspect as the MHUSA ones, containing just the matrix. The treatment started on the day previous the arrival of chickens (noted D0).

### **Observed indicators**

Body live weights were computed for 300 individuals per building. Each animal was chosen at random. For each batch, animals were weighed on days D21, D63 and D80 (one day prior to slaughter). On D80, blood samples were performed on 220 individuals. The blood was collected via the wing vein and conserved in EDTA tubes. The

physiological blood indicators consisted of HLR and corticosterone levels. HLR was estimated from blood film smears using May-Grunwald and Giemsa stains (Lucas and Jamroz, 1961). Corticosterone level was determined by Radio Immuno Assay method (De Jong *et al.*, 2001). Carcasses were dissected 24 hours post mortem. For all the following measurements, 160 chickens were used (80 for each treatment). Dead weights, pectoralis major weights (both right and left) were measured as well as abdominal fat weight. After evisceration, body parts subject to measurements were excised, using the same procedure for all animals, performed by the same technician. All measurements were performed inside a refrigerated room (+2°C). Each animal was chosen at random before operating measurements. Measurements were performed in the same order, following a method described by Fletcher *et al.* (2000). After excision and weighing, muscle pH was recorded using a pH meter (Model CG 843, Schott). The electrode was inserted into the anterior area of the ventral part of pectoralis major at 100 mm depth. Each pectoralis major was then stored at +4°C in appropriate polyethylene bags for further pH measurements. Color was measured on the posterior area of the ventral side using a colorimetre (Model CR-10, Minolta). Color values are in agreement with CIELAB system using L\* (lightness), a\* (redness) and b\* (yellowness) compared with a standardised color reference (white). At 6 days post mortem, each pectoralis major was removed from its bag and wiped for additional measures. At this stage, weight, pH and color were recorded. For meat surface color measurements, selected areas were free from obvious defects (bruises, haemorrhages, other damages...) that might have affected uniform color reading. A 35g sample from the left anterior side of the left pectoralis major was then analyzed for weight, pH and color before and after cooking. The cooking procedure consisted of placing each sample in a microwave for 60 seconds at 850 watt power. Samples were then kept at room temperature (22°C) for 90 minutes to cool down before measurements. Results were considered for males, females and mixed sexes, except for weighing because there was not enough sexual dimorphism at the age of the first weighing.

### **Statistical analysis**

Pooled data were examined by analysis of variance using SysStat version 10 Software. Comparisons were made between placebo and MHUSA treatments after replication. We looked for the treatment and sex effect for each indicator. Significant was expressed as at least  $p \leq 0.05$ .

## **RESULTS**

A sex effect (males>females;  $P \leq 0.001$ ) and a treatment effect (MHUSA>placebo;  $P \leq 0.05$ ) were observed on carcass weights (table 1). Results dealing with filet variables at both 24 hours and 6 days post mortem are presented in table 2. Filet weights were higher for the MHUSA group for both measurements ( $P \leq 0.05$ ). Filet weights were also higher for males concerning both measurements ( $P \leq 0.001$ ). We observed a sex effect ( $P \leq 0.01$ ) and a significant interaction sex\*treatment for pH at 24 hours post mortem ( $P \leq 0.01$ ). Filets from chickens under MHUSA had higher pH at 6 days post mortem compared to placebo ( $P \leq 0.05$ ). At this stage, females had higher b\* value compared to males ( $P \leq 0.001$ ). Color and pH values are presented in table 3. Sex effect appeared to be significant on pre-cooked sample pH (pH males>pH females;  $P \leq 0.05$ ). Before the cooking procedure, a treatment effect was observed on yellowness (Placebo>MHUSA;  $P \leq 0.05$ ). Observed before and after the cooking procedure, sex effect was also significant on the yellowness (females>males;  $P \leq 0.05$  and  $P \leq 0.01$ , before and after procedure, respectively). Physiological indicators differed according to sex, as shown in table 4. The Corticosterone level showed a remarkable sex effect (males>females;  $P \leq 0.01$ ), as well as HLR (males>females;  $P \leq 0.001$ ). Corticosterone levels were lower for the MHUSA group for both males and females ( $P \leq 0.05$ ), whereas we observed no difference on HLR. As shown

in table 5, animals under semiochemical treatment (MHUSA) were heavier at all weighing ages ( $P \leq 0.01$ ;  $P \leq 0.05$  and  $P \leq 0.05$  at D21, D63 and D80, respectively). We found a strong correlation between file weights and carcass weights ( $R^2=0.83$ ), but no correlation either between abdominal fat and carcass weights nor between abdominal fat and file weights. There was no significant difference between treatments concerning abdominal fat. No statistical difference was observed for mixed sexes for file weight loss from 24 hours to D6 post mortem concerning treatment. After cooking procedure, lost water was comparable between the two observed groups (16.1% and 16.7%). Filets from MHUSA group showed lower pH variations from 24 hours to 6 days post mortem ( $P \leq 0.05$ ).

## DISCUSSION

According to our observations, no chronic stress happened during the trial, which is in accordance with the absence of a significant difference on HLR (Campo *et al.*, 2005). Fletcher *et al.* (2000) and Fletcher (1999) showed that the stress prior to slaughter may have many consequences on meat quality: decrease of the shear value by increasing water-holding capacity, lower  $L^*$  value and higher  $a^*$  value. Our results tend to show that the semiochemical has no impact on the stressors at the slaughter place since we observed no differences between the two treatments concerning indicators discussed by cited authors. On the one hand, according to a review by Barbut *et al.* (2005) on 40-day-old broilers, studied characteristics would classify studied meat for pH and cooking loss as PSE-like meat and as Normal for  $L^*$  value 24 hours post mortem. On the other hand, results by Petracci *et al.* (2004) would classify studied meat as Dark regarding  $L^*$  value and cook loss, but as Pale for pH. As no difference has been observed between both groups on cited meat indicators, we can only conclude that studied samples were in average ranges. Differences observed among sexes in yellowness could be due to a higher fat percentage of females compared to males (Boorman and Wilson, 1977). The observed sex effect on weight measurements seems logical regarding gender influence (Woelfel *et al.*, 2002). Fletcher (1999) showed that acute stressors such as struggle and fight lead to a decrease of the glycogen supply. This argument, related to the observed corticosterone level difference could explain the lower pH variation (from 24 hours to 6 days post mortem) of meat in animals under MHUSA. Davison *et al.* (1982), showed that in the case of corticosterone induced stress, animals had lower live weights, but found no differences on the fat content and food intake. In our results, we observed the same tendency: lower corticosterone levels and higher live weights in the MHUSA group, hypothetically less stressed, and no significant difference on abdominal fat. We observed a correlation between carcass weight and file weight but no correlation between fat and carcass weight, thus we can argue that animals under MHUSA were not heavier because of a higher fat content. Indeed, abdominal fat is known to be correlated with body fat content (Alleman *et al.*, 1999). Siegel (1995) showed that stress leads to lower live weights compared to chickens that are not or less stressed, which is in accordance with our findings. Thus, we could hypothesize that classical housing conditions are not optimal because of stressing conditions since a reduction of stress leads to a better growth, as shown by our body weights measurements under treatments. This study showed that the tested semiochemical has an influence on live weight, on file weight and corticosterone level in Label broilers grown within 12 weeks. Constant exposure to the MHUSA enhances growth without decreasing meat quality.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the breeder, employees from the slaughter place, the “Syndicat des volailles de l’Ain” and all employees.

## REFERENCES

- Alleman, F., A. Bordas, J.P. Caffin, S. Daval, C. Diot, M. Douaire, J.M. Fraslin, S. Lagarrigue, and B. Leclercq. 1999. L'engraissement chez le poulet: aspects métaboliques et génétiques. *INRA Prod. Anim.* 12 (4): 257-264.
- Barbut, S., L. Zhang, and M. Marcone. 2005. Effects of pale, normal, and dark breast meat on microstructure, extractable proteins and cooking of marinated fillets. *Poult. Sci.* 84: 797-802.
- Boorman, K., and B. Wilson. 1977. Growth and poultry meat production. *Br. Poult. Publications.*
- Campo, J.L., M.G. Gil, S.G. Davila, and I. Munoz. 2005. Influence of perches and footpath dermatitis on tonic immobility and heterophil to lymphocyte ratio of chickens. *Poult. Sci.* 84: 1004-1009.
- Davison, T.F., J. Rea, and J.G. Rowell. 1982. Effects of dietary Corticosterone on the growth and metabolism of immature *Gallus domesticus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 50: 463-468.
- De Jong, I.C., A. van Voorst, J.H. Erkens, D.A. Ehlarth, and H.J. Blokhuis. 2001. Determination of the circadian rhythm in plasma corticosterone and catecholamine concentrations in growing broilers breeders using intravenous cannulations. *Physiol. Behav.* 74: 299-304.
- Fletcher, D.L., 1999. Broilers breast meat color variation, pH, and texture. *Poult. Sci.* 78: 1323-1329.
- Fletcher, D.L., M. Qiao, and D.P. Smith. 2000. The relationship of raw broilers breast meat color and pH to cooked meat color and pH. *Poult. Sci.* 79:784-788.
- Lucas, A.M., and C. Jamroz. 1961. *Atlas of avian hematology.* Agriculture Monograph 25, USDA, Washington DC.
- Madec, I., D. Saffray, J.F. Gabarrou, C. Lafont, L. Bougrat, J. Gigante, and P. Pageat. 2005. Comparison of the behaviour of three groups of chickens during their growth. Page 78 in the Proceedings of the 5<sup>th</sup> IBVM, Minneapolis USA.
- Mallia, J.G., S. Barbut, J.P. Vaillancourt, S.W. Martin, and S.A. McEwen, 1998. A dark, firm dry-like condition in breast meat of chicken condemned for ascites, valgus-varus deformity, and emaciation. *Poult. Sci.* 77:61.
- Mc Glone, J.J., and D.L. Anderson. 2002. Synthetic pheromone stimulates feeding behaviour and weight gain in weaned pigs. *J. Anim. Sci.* 80: 3179-3183.
- Moltz, H., and M. Leet. 1981. The maternal pheromone of the rat: identity and functional significance. *Phys. Behav.* 26: 301-306.
- Pageat, P., and E. Gaultier. 2003. Current research in canine and feline pheromones. *Vet. Clinics:* 33, 187-211.
- Petracci, M., M. Betti, M. Bianchi, and C. Cavani. 2004. Color variation and characterization of broiler breast meat during processing in Italy. *Poult. Sci.* 83: 2086-2092.
- Post, J., M.J. Rebel, and A.A.H.M. ter Huurne. 2003. Physiological effects of elevated plasma corticosterone concentrations in broiler chickens. An alternative means by which to assess the physiological effects of stress. *Poult. Sci.* 82 : 1313-1318.
- Puvaldolpried, S., and J.P Thaxton. 2000. Model of physiological stress in chickens, response indicators. *Poult. Sci.* 79 : 363-369.
- Siegel, H.S. 1995. Stress, strains and resistance. *Br. Poult. Sci.* 36: 003-22.
- Tankson, J.D., Y. Vizzier-Thaxton, J.P. Thaxton, J.D. May, and J.A. Cameron, 2001. Stress and nutritional quality of broilers. *Poult. Sci.* 80:1384-1389.
- Woelfel, R.L., C.M. Owens, E.M. Hirschler, and A.R. Sams. 2002. The incidence and characterization of pale, soft and exudative chicken meat in a commercial plant. *Poult. Sci.* 81: 579-584.

**TABLE 1.** Carcass weight and abdominal fat weight at 24 hours post mortem.

	Placebo		MHUSA		Significance (P)		
	Males	Females	Males	Females	Treatment	Sex	SD
CW <sup>1</sup>	2126.3±36.8	1646.4±28.1	2221.0±29.9	1682.5±32.1	*	***	195.0
Ab. Fat <sup>2</sup>	40.11±2.67	42.87±3.20	43.35±3.07	44.23±2.51	NS	NS	17.6

<sup>1</sup>CW: Carcass Weight (g); <sup>2</sup>Ab. Fat: Abdominal Fat Weight (g); SD: Standard Deviation. Means are indicated ± Standard Error. \*P≤0.05, \*\*P≤0.01, \*\*\*P≤0.001, NS: non significant

**TABLE 2.** Filet weight, filet pH and color indicators observed at 24 hours and 6 days post mortem.

	Placebo		MHUSA		Significance (P)		
	Males	Females	Males	Females	Treatment	Sex	SD
FWh24 <sup>1</sup>	255.5±4.0	217.3±4.1	265.3±4.4	229.1±4.8	*	***	25.7
FWD6 <sup>1</sup>	242.7±4.0	203.4±4.2	238.4±4.2	218.1±4.2	*	***	25.2
FpHh24 <sup>2</sup>	5.96±0.02	5.89±0.01	5.87±0.02	5.88±0.02	NS	**	0.1
FpHd6 <sup>2</sup>	5.78±0.02	5.84±0.02	5.87±0.02	5.83±0.02	*	NS	0.1
L* <sup>h24</sup> <sup>3</sup>	-	-	-	-	NS	NS	8.7
L*d6 <sup>4</sup>	48.20±1.48	47.91±1.44	48.03±1.44	47.16±1.44	NS	NS	7.8
a* <sup>h24</sup> <sup>3</sup>	47.82±1.30	47.46±1.29	47.81±1.20	47.02±1.22	NS	NS	1.7
a*d6 <sup>4</sup>	1.42±0.31	1.37±0.25	1.22±0.28	1.55±0.25	NS	NS	1.3
b* <sup>h24</sup> <sup>3</sup>	0.21±0.19	0.42±1.19	0.54±0.23	0.23±1.34	NS	NS	2.6
b*d6 <sup>4</sup>	6.18±0.48	6.56±0.36	5.28±0.46	6.58±0.36	NS	NS	1.5
	3.83±0.26	4.65±0.26	3.33±0.22	4.41±0.23	NS	***	1.5

<sup>1</sup>FW: Filet Weight (g) 24 hours post mortem and 6 days post mortem; <sup>2</sup>FpH: Filet pH (g) 24 hours post mortem and 6 days post mortem; <sup>3</sup>L\*, <sup>3</sup>a\*, <sup>3</sup>b\*: color measurement 24 hours post mortem; <sup>4</sup>L\*, <sup>4</sup>a\*, <sup>4</sup>b\*: color measurement 6 days post mortem; SD: Standard Deviation. Means are indicated ± Standard Error. \*P≤0.05, \*\*P≤0.01, \*\*\*P≤0.001, NS: non significant

**TABLE 3.** pH and color indicators pre-cooking and post-cooking procedure (35g sample).

	Placebo		MHUSA		Significance (P)			
	Males	Females	Males	Females	Treatment	Sex	Treatment x sex	SD
Pre-cooking								
pH	5.87±0.02	5.86±0.02	5.88±0.01	5.83±0.01	NS	*	NS	0.1
L*	-48.46±1.04	-47.93±1.15	-47.77±1.04	-47.77±1.19	NS	NS	NS	6.8
a*	0.58±0.15	0.53±0.18	0.49±2.05	0.23±1.20	NS	NS	NS	1.1
b*	5.64±0.50	6.33±0.32	4.82±0.23	5.76±0.22	*	*	NS	2.1
Post-cooking								
pH	6.18±0.02	6.15±0.02	6.15±0.02	6.14±0.01	NS	NS	NS	0.1
L*	-48.85±5.07	-48.23±4.90	-47.76±5.02	-49.11±5.10	NS	NS	NS	31.3
a*	2.71±0.31	2.94±0.32	3.39±0.31	2.88±0.29	NS	NS	NS	1.9
b*	15.33±0.34	17.15±0.30	15.91±0.34	16.41±0.37	NS	**	NS	2.1

L\*, a\*, b\*: color measurement; SD: Standard Deviation. Means are indicated ± Standard Error. \*P≤0.05, \*\*P≤0.01, \*\*\*P≤0.001, NS: non significant.

**TABLE 4.** Heterophil:Lymphocyte Ratio and Corticosterone level from blood samples at day 80.

	Placebo		MHUSA		Significance (P)			
	Males	Females	Males	Females	Treatment	Sex	Treatment x sex	SD
HLR <sup>1</sup>	0.324±0.026	0.231±0.022	0.402±0.047	0.276±0.03	NS	**	NS	0.21
CS <sup>2</sup>	16.42±0.46	9.91±0.81	13.39±0.89	8.55±1.00	*	***	NS	6.9

<sup>1</sup>HLR: Heterophil:Lymphocyte Ratio; <sup>2</sup>CS: Corticosterone (ng/ml); SD: Standard Deviation. Means are indicated ± Standard Error. \*P≤0.05, \*\*P≤0.01, \*\*\*P≤0.001, NS: non significant.

**TABLE 5.** Live weight depending on animal age.

	Placebo	MHUSA	Significance (P)	SD
d21 <sup>1</sup>	276.7±6.1	294.3±3.2	**	0.1
d63 <sup>2</sup>	1722.5±23.2	1801.3±19.5	*	0.3
d80 <sup>3</sup>	2233.4±21.5	2298.6±22.1	*	0.4

<sup>1</sup>d21: Live weight at 21 days (g). <sup>2</sup>d63: Live weight at 63 days (g). <sup>3</sup>d80: Live weight at 80 days (g); SD: Standard Deviation. Means are indicated ± Standard Error. \*P≤0.05, \*\*P≤0.01, \*\*\*P≤0.001, NS: non significant

## 4. Essai en élevage n°4 : qualité de la viande

---

### 4.1. Type de communication et résumé

➤ Type de communication : ce travail a fait l'objet d'un article dans *Animal* (Animal 2:4, 631-635) - 2008

#### ➤ Résumé

Des sécrétions de glandes uropygiales ont été obtenues à partir de différentes poules durant la période où celles-ci élevaient leurs poussins. L'analyse de l'ensemble de ces sécrétions a permis la création d'un analogue synthétique d'une substance émise par la poule en situation maternelle. Cet analogue a été nommé MHUSA pour *Mother Hen Uropygial Secretion Analogue*. En conditions d'élevages industrielles, un essai en double aveugle contre placebo a été mené sur des poulets de souche SASSO T56N, élevés pour être abattus après 81 jours d'élevage, afin de tester l'influence de MHUSA sur la qualité de viande des poulets, à l'abattoir. Deux bâtiments identiques ont été utilisés pour l'essai, avec une réplication pour s'affranchir d'un éventuel effet bâtiment. Durant la première phase les poulets du bâtiment 1 reçoivent alors le traitement MHUSA et ceux du bâtiment 2 le placebo. Après une période correspondante au vide sanitaire (deux semaines), incluant le nettoyage des bâtiments, une réplication est donc effectuée. Ainsi, les poulets du bâtiment 1 reçoivent alors le traitement placebo et ceux du bâtiment 2 le MHUSA. Pour chacune des réplifications, les bandes de poussins sont conduites strictement en parallèle, c'est-à-dire que chaque bâtiment reçoit un lot de poussins âgés d'un jour à la même date. En fin de bande, le départ des poulets pour l'abattoir est également effectué le même jour pour les deux bâtiments. Un bâtiment dispose d'une superficie de 400m<sup>2</sup> lui permettant d'accueillir 4400 poulets élevés au sol. La conduite d'élevage est conforme aux recommandations techniques données par le fournisseur de poussins concernant l'alimentation, l'eau ou encore l'éclairage.

L'âge des poulets le jour des mesures est de 80 jours. A l'abattoir, des mesures qualitatives ont été effectuées sur 80 poulets, 24 heures après l'abattage. Nous avons mesuré les masses de carcasse, de gras abdominal et celle des filets. La couleur, le pH ainsi que le rendement carcasse ont aussi été mesurés comme indicateurs de qualité. Ces mesures ont été répétées à six jours *post mortem*, ainsi qu'après cuisson, selon une procédure calibrée.

Les résultats montrent que les poulets ayant été élevé sous MHUSA présentent des masses de carcasse supérieures à celle du groupe placebo ( $p < 0,05$ ). Le gras abdominal, le pH, la perte en eau et la couleur de la viande ne montrent pas de différence significative entre les traitements, que ce soit à 24h ou à six jours *post mortem*, et que ce soit avant ou après cuisson. La seule différence observée concerne la viande des poulets élevés sous MHUSA, qui apparaît moins jaune par rapport à celle issue des poulets du groupe placebo.

Les résultats obtenus amènent à la conclusion qu'une exposition permanente à MHUSA de poulets de chair durant les 80 jours de leur élevage permet une amélioration de la croissance tout en ne faisant pas varier les indices de qualité de viande. L'interprétation de ces constats permet d'émettre l'hypothèse que les poulets sous MHUSA présentent une viande plus maigre et donc une meilleure rentabilité d'élevage et d'abattage, comparativement à leurs pendants sans traitement.

**Mots clés** : poulets, croissance, qualité de viande, glande uropygiale

## **4.2. Texte original de la communication**

### **Title: Influence of a preen gland secretion on growth and meat quality of heavy broilers**

Authors: I. Madec<sup>1</sup>, P. Pageat<sup>1</sup>, L. Bougrat<sup>1</sup>, C. Lecuelle-Lafont<sup>1</sup>, D. Saffray<sup>1</sup>, C. Falewee<sup>1</sup>, A. Bollart<sup>2</sup>, P. Chabrol<sup>3</sup>, and J.F. Gabarrou<sup>4</sup>.

<sup>1</sup>Pherosynthese, Le Rieu Neuf, 84490 Saint Saturnin Les Apt, France

<sup>2</sup>ENV Lyon, Marcy l'Etoile, 69000 Lyon, France.

<sup>3</sup>Cabinet Clair Matin, 01000 Bourg en Bresse, France

<sup>4</sup>EI Purpan – 75 voie du TOEC, BP 5761, 31076 Toulouse cedex 3, France

**ABSTRACT** Preen gland secretions were obtained from several hens that were rearing their chicks and the content of these secretions was analysed. From these results a synthetic analogue of the secretions was created (given the title Mother Hen Uropygial Secretion Analogue, or MHUSA in this study). According to a blinded, controlled experimental design, heavy broilers (strain SASSO T56N) were reared from one day of age in an environment treated with either MHUSA or control. At 80 days the birds were slaughtered. Post-mortem carcass weight, abdominal fat and fillet weights were then measured. Colour, pH and yield were also measured as indicators of meat quality. Broilers exposed to MHUSA had both higher carcass weights and higher fillet weights compared to control treated birds ( $P < 0.05$ ). Abdominal fat, pH, water loss and colorimetry results were similar between the treatment groups at all time points (24 hours and 6 days post-mortem), and also after a cooking procedure. The meat from the MHUSA birds was less yellow compared to control. It is concluded that constant exposure to MHUSA from rearing until slaughter improves growth rate in broilers without significantly affecting meat quality.

**Keywords:** broilers, growth, meat quality, preen gland

## INTRODUCTION

Meat quality is a major issue both for the process meat industry and for consumers. Pale, Soft and Exudative (PSE) meat, which is seen in pig meat production, has seldom been analysed in poultry meat, apart from turkey (Alvarado and Sams, 2002). So called PSE meats show low water-holding capacity, bad textural properties and reduced protein extractability (Tankson *et al.*, 2001). A relationship also exists between colour, pH and water-holding capacity (Woefel *et al.*, 2002; Campo *et al.*, 2005). PSE meat from pigs loses more water during cooking compared with normal meat (Tankson *et al.*, 2001). In a study on boneless and skinless fillets from broilers, Barbut *et al.* (2005) also reported Dark, Firm and Dry (DFD) meat. In poultry, stress has severe consequences for the quality of the final product, with effects on pH, pigmentation, water-holding or fat percentage (Fletcher, 1999; Tankson *et al.*, 2001; Campo *et al.*, 2005). In poultry, secretions from the preen (or uropygial) gland have a role in physiology and behaviour as their composition is affected by age and season, as well as by whether or not a bird has been feather pecked (Sandilands *et al.*, 2004). It is also known that hens raising their chicks produce specific hormonal secretions from this gland (Richard-Yris *et al.*, 1983; Bohnet *et al.*, 1991). Their lack may be related to the level of stress observed in broiler husbandries, as observed by Madec *et al.* (2005) and by Madec *et al.* (2006). In order to test the effect on the quality of broilers' production, the secretion from the uropygial gland of hens was isolated under natural mothering conditions. A synthetic analogue was prepared according to the analysis of the secretion. The purpose of the present study was to investigate the effect of this synthetic analogue on several meat quality indicators in heavy broilers, along with carcass performances.

## MATERIAL AND METHODS

### ***Animals and breeding conditions***

The experiment took place in two similar buildings, both with a stocking density of 11 birds per squared meter (i.e. approximately 25kg/m<sup>2</sup> when birds are due for slaughter). A heavy broiler strain (Sasso T56N) was used, and a total of 4400 chicks were kept in each building from 1 day of age, and then slaughtered at day 80. The floor in the buildings was composed of soil covered with wood shavings and birds had free access to fresh water and food (Table 1). From 4 weeks of age until slaughter, the birds also had day-time free-range access outside the buildings through trapdoors operated by the stockperson. In the buildings, all the broilers shared floor and air space. Health status of the birds was examined upon arrival (D0) and then on a weekly basis until completion of the study. Ethical aspects of the experiment were in accordance with European Convention 95/29/CE.

### ***Treatment***

In order to construct the Mother Hen Uropygial Secretion Analogue (MHUSA), samples of the natural secretions were obtained from hens by squeezing their preen glands once a day for 14 days after hatching of their chicks. When the pattern was analysed we observed a stabilization of the uropygial secretion from 12 days post hatching. Thus, samples from 12 days post hatching were analysed using Gas Chromatography - Mass Spectrometry (GC/MS, Perkin-Elmer, Turbo Mass). A synthetic analogue was then created (Mother Hen Uropygial Secretion Analogue or MHUSA, Pat. PCT/EP03/007144). This consisted of a synthetic reconstruction of a fraction of the natural secretion, composed of 12 to 18 carbon length Fatty Acid Methyl Esters (FAME). The treatment was incorporated into a commercially available gelatin matrix block (Nicols S.A., 59980 Bertry, France) weighing 150g and composed of water (135g), non-ionic surfactant (7g) and a gelling gum (5g), plus either 3g of water (control) or 3g of MHUSA. The gelatin matrix block (control or MHUSA)

was held in specially manufactured perforated plastic container suspended 120cm above the ground, out of reach of the birds. The components of MHUSA are heavier than air and this delivery arrangement allowed the treatment to diffuse into the air around the birds. Treatment was blinded since it was impossible to tell the difference between MHUSA and control matrixes (their odour and appearance were identical), and the persons involved in the trial were unaware of which group was given which treatment. Treatment was installed in each building on the day before the arrival of the chicks. One block was used for every 50m<sup>2</sup> of floorspace, and the blocks were replaced every 4 weeks, giving a total of 24 blocks used during the 80-day trial. After this first experiment the buildings were cleaned and prepared for a new batch of chicks. The whole experiment was then repeated precisely as before, but with the building treatments reversed in order to control against building effect.

### **Data collection**

For all measurements, a randomly selected group of 40 males and 40 females were used per building treatment, meaning that a total of 160 samples were analysed (80 per treatment). At 24 hours post-mortem, eviscerated carcass weight (CW) was measured (Bird Weighing System-1050, Weltech Int., Cambridgeshire, UK) before excision of body parts subject to measurements. Then both pectoralis major (Fillet Weight or FW) and abdominal fat were weighed. All measurements were performed inside a refrigerated room at constant temperature (+2°C), using the same procedure for all animals, in the same order and by a certified technician, following a method described by Fletcher *et al.* (2000). After excision and weighing, muscle pH was recorded using a pH meter (CG 843, Schott, USA). The electrode was inserted into the anterior area of the ventral part of right pectoralis major to a depth of 100 mm. After each pH measurement, the electrode was rinsed with distilled water and dried with soft tissue paper. Each pectoralis major was then stored at +4°C in polyethylene bags for further weight, pH and colour measurements. Colour measurements were taken from the posterior area of the ventral side of these samples. CIE (International Commission on Illumination) Lab colour coordinates ( $L^*$  = lightness,  $a^*$  = degree of redness,  $b^*$  = degree of yellowness) were measured using a colorimeter (CR-10, Minolta France S.A.). The  $a^*$  and  $b^*$  coordinates were subsequently used to calculate the hue ( $H^* = \tan^{-1} b^*/a^*$ , angle that the metric chroma line makes with the  $a^*$  axis) and saturation (or chroma  $C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{-1}$ ). The colour of the samples was compared with a standardised white ceramic ( $L^* = 94.3$ ,  $a^* = -2.86$  and  $b^* = 1.92$ ). At 6 days post-mortem, excess liquid was drained from the bag containing each pectoralis major muscle, before recording the weight, pH and colour of the tissue. For meat surface colour measurements, readings were taken from selected areas that were free from obvious defects (bruises or haemorrhages) that might have affected the uniformity of the colour reading. A 35g sample from the left anterior side of the left pectoralis major was then analysed for weight, pH and colour variations between before and after cooking. The cooking procedure consisted of placing each 35g sample in a microwave oven for 60 seconds at 850 Watts power, after which it was allowed to cool at room temperature (22°C) for 90 minutes before measurements were taken. Together with sample weight loss during cooking, fillet weight loss, relative to CW, was recorded at both 24 hours and 6 days post-mortem. Finally, because we wanted to be imitate industrial conditions, in which meat quality is not differentiated on the basis of sex, we choose to pooled male and female results.

### **Statistical treatment of results**

Data were analysed using Statistica version 5 Software. Means were compared using the Student's t-test. The relationship between different variables was determined using Pearson's correlation coefficient, to look for differences among treatments. Results are expressed as Mean ± Standard Mean Error. Significant results were considered if  $P < 0.05$ .

Differences between the two replications of the experiment were investigated as treatment effect.

## RESULTS

CW at 24 hours post-mortem, FW at 24 hours and at 6 days post-mortem were all significantly higher ( $P < 0.05$ ), for broilers within the MHUSA treatment group (Table 2), while abdominal fat did not show a significant difference between the groups. There was no significant effect on yield (Table 3) or fillet pH (Table 4). Colorimetry results (Table 5) showed that meat from birds that received treatment with MHUSA had a significantly lower degree of yellowness ( $b^*$ ,  $P < 0.05$ ) and almost significantly lower colour saturation ( $C^*$ ,  $P = 0.06$ ) at 6 days after slaughter, as well as reduced redness after cooking ( $a^*$ ,  $P = 0.07$ ). The correlation coefficients between colour values are presented in Table 6 (for control) and Table 7 (for MHUSA). For both treatment types, we observed strong positive correlations (0.70 or higher) between lightness before and after the cooking procedure (CP) and between lightness before CP and redness before CP. In the control group, lightness after CP was also highly negatively correlated with yellowness after CP while it is positively correlated with redness before CP in the MHUSA group.

## DISCUSSION

In the present experiment, we found that treatment with MHUSA had a positive effect on measured weight, with birds having higher CW and FW. The general performance of birds in the present study was in accordance with results obtained for the same broiler type by Berri *et al.* (2005), except for abdominal fat weight, which was lower in our study. Computed yields are similar to those reported by Kannan *et al.* (1997a) for cooking loss, and by Lin *et al.* (2006) for both abdominal fat and fillet. Cooking losses in the present study differed from the results of Lin *et al.* and those of other authors (such as Bianchi *et al.*, 2005; Barbut *et al.*, 2005 or Mehaffey *et al.*, 2006). This is probably due to differences in the cooking procedure, which was performed using either a conventional oven or a warm water bath by those cited authors. In the study by Lin *et al.* (2006), stress mimicked by the administration of corticosterone produced a significant decrease in fillet yield and an increase in abdominal fat percentage. As stated earlier, apart from a lack of significant differences for abdominal fat values (fat weight and fat yield), we have the same tendency in our results. Normally stress is expected to increase body fat content (Siegel, 1995), but our results are supported by a study in laying hens, which showed that a stress-like physiological state induced by ACTH injection did not affect body fat content. Our results showed that broilers from both treatment and control groups had comparable fillet yield and fat percentage, but that both CW and FW were significantly higher in case of MHUSA treatment group. Zerehdaran *et al.* (2005) have shown that abdominal fat and carcass weight are strongly correlated and that live weight is correlated with both carcass weight and abdominal fat. Moreover, Mehaffey *et al.* (2006), have shown that overall meat quality is not correlated with fillet yield. We can thus hypothesize that continuous exposure to MHUSA during the growing period of broilers significantly reduces the percentage of body fat. Moreover, our results show that MHUSA treatment has no effect on fillet water loss or cook loss, which indicates that this form of treatment has no effect on meat quality with regard to water content. Barbut *et al.* (2005) studied meat quality in various strains of broilers that had a similar range of body weight to those in the present study. According to their results, meat samples from birds in our study would have been categorised as PSE with respect to pH value. However, the pH values for the meat in the present study are in accordance with those from a study, by El Rammouz *et al.* (2004), which investigated the comparative impact of different rearing conditions (no stress, handling and heat stress) in slow-growing broilers. In the cited study meat pH varied from 5.79 to 5.89. When comparing textural differences among broiler breast meat ranging from PSE to DFD in

their fresh forms, Zhang and Barbut (2005) showed that PSE meat had significantly lower pH and water holding capacity values compared to normal meat. During cooking, PSE meat lost significantly more liquid than normal meat, and PSE meat proteins were generally more severely affected. PSE meat also had significantly higher lightness value. From our results, MHUSA treatment had no effect on meat pH value, compared to the control group, and none of the other results indicated that the meat should be categorised as PSE. Knowing that the overall quality of the meat depends upon several indicators and taking into account results from other studies, none of the meat produced in the present study should be considered to be PSE, but as Normal. Considering colour measurements, we observed that meat from the control-group birds was more yellow compared to that from the MHUSA group. This could be explained by a higher percentage of meat surface fat or by some other change of fillet colour, for example due to stress related denaturing of muscle proteins, although this was not measured in our study. Comparing colour values between broilers stressed by shackling and control birds, Kannan *et al.* (1997b) did not find a difference in lightness or redness, but they did find a difference in yellowness, saturation and hue angle, which were all three higher in the stressed birds. These results are similar to ours for both saturation and yellowness, but not for hue angle. As a general comment on colour values, it appears difficult to make accurate comparisons due to the difference in white reference used in other studies. Nevertheless, it is possible to compare correlations between colour values, as done in a previous study of broiler meat obtained from a commercial plant (Qiao *et al.*, 2002). The authors observed the same general relationship between raw fillet, cooked fillet and colour, as we did. The main difference concerned  $a^*$  values, which were negatively correlated with  $L^*$  values before CP in the study by Qiao *et al.* (2002), as this was the opposite of our findings, for both MHUSA and control. Nevertheless, our results for colour values seem to be strong enough to argue in favour of a lack of difference between treatment groups. Our results also show that MHUSA increases meat quantity without any significant effect on meat quality. This might suggest that chicks, and growing birds, possess olfactory systems that are able to detect and respond to MHUSA in the air, without actual contact with it. This mechanism is the same as what would be expected in a natural response to uropygial secretions. Porter *et al.* (2002) have shown that chicks develop olfactory abilities, which supports the idea that they may be able to detect MHUSA. Nevertheless, this has not yet been ascertained. It would be interesting to know more about the precise effects of MHUSA, such as its effect on stress or anxiety, or its ability to attract chicks. This will be of great interest in further studies. What we can say is that MHUSA has a positive effect on growth rate similar to that has been observed in piglets exposed to teat secretions from lactating sows (McGlone and Anderson, 2002). The findings from that study are comparable to ours since we observed that MHUSA has an influence on CW and FW. Since constant exposure to MHUSA appears to enhance meat yield, use of this treatment during routine husbandry or during stressful situations such as transportation (to be investigated) could be of great interest.

## REFERENCES

- Alvarado CZ and Sams AR 2002. The role of carcass chilling rate in the development of pale, exudative turkey pectoralis. *Poultry Science* 81, 1365-1370.
- Barbut S., Zhang L. and Marcone M. 2005. Effects of pale, normal, and dark breast meat on microstructure, extractable proteins and cooking of marinated fillets. *Poultry Science* 84, 797-802.
- Berri C, Le Bihan-Duval E, Baeza E, Chartrin P, Piggirard N, Jehl N, Quentin M, Picard M and Duclos MJ 2005. Further processing characteristics of breast and leg meat from fast, medium and slow growing commercial chickens. *Animal Research* 54, 123-134.
- Bianchi M, Fletcher DL and Smith DP 2005. Physical and functional properties of intact and ground pale broiler breast meat. *Poult Science* 84, 803-808.

Bohnet, S, Rogers L, Sasaki G and Kolattukudy PE 1991. Estradiol induces proliferation of peroxisome-like microbodies and the production of 3-hydroxy fatty acid diesters, the female pheromones, in the uropygial glands of male and female mallards. *Journal of Biology and Chemistry* 266, 9795-9804.

Campo JL, Gil MG, Davila SG and Munoz I 2005. Influence of perches and footpath dermatitis on tonic immobility and heterophil to lymphocyte ratio of chickens. *Poultry Science* 84, 1004-1009.

El Rammouz R, Berri C, Le Bihan-Duval E, Babile R and Fernandez X 2004. Breed differences in the biochemical determinism of ultimate pH in breast muscles of broiler chickens-a key role of AMP deaminase. *Poultry Science* 83, 1445-1451.

Fletcher DL 1999. Broilers breast meat colour variation, pH, and texture. *Poultry Science* 78, 1323-1329.

Fletcher DL, Qiao M and Smith DP 2000. The relationship of raw broilers breast meat colour and pH to cooked meat colour and pH. *Poultry Science* 79, 784-788.

Kannan G, Heath JL, Wabeck CJ, Souza MC, Howe JC and Mench JA 1997a. Effects of crating and transport on stress and meat quality characteristics in broilers. *Poultry Science* 76, 523-529.

Kannan G, Heath JL, Wabeck CJ and Mench JA 1997b. Shackling of broilers: effects on stress responses and breast meat quality. *British Poultry Science* 38, 323-332.

Lin H, Sui SJ, Jiao HC, Buyse J and Decuyper E 2006. Impaired development of broiler chickens by stress mimicked by corticosterone exposure. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 143, 400-405.

Madec I, Pageat P, Bougrat L, Saffray D, Falewee C, Gervasoni MA, Bollart A and Gabarrou JF 2006. Influence of a Semiochemical Analogue on Growing Performances and Meat Quality of Broilers. *Poultry Science* 85: 2112-2117.

Madec I, Saffray D, Gabarrou J.F, Lafont C, Bougrat L, Gigante J and Pageat P 2005. Comparison of the behaviour of three groups of chickens during their growth. *Proceedings of the 5<sup>th</sup> International Behavioral and Veterinary Medicine*, 78-81.

Mehaffey JM, Pradhan SP, Meullenet JF, Emmert JL, McKee SR and Owens CM 2006. Meat quality evaluation of minimally aged broiler breast fillets from five commercial genetic strains. *Poultry Science* 85, 902-908.

McGlone JJ and Anderson DL 2002. Synthetic maternal pheromone stimulates feeding behaviour and weight gain in weaned pigs. *Journal of Animal Science* 80, 3179-3183.

Porter H, Picard M, Arnould C and Tallet C 2002. Chemosensory deficits are associated with reduced weight gain in newly hatched chicks. *Animal Research* 51, 337-345.

Puvadolpird S and Thaxton JP 2000. Model of physiological stress in chickens, response parameters. *Poultry Science* 79, 363-369.

Qiao M, Fletcher DL, Northcutt JK and Smith DP 2002. The relationship between raw broiler breast meat color and composition. *Poultry Science* 81, 422-427.

Richard-Yris, MA, Garner DH and Le boucher G 1983. Induction of maternal behaviour and some hormonal and physiological correlates in the domestic hen. *Hormones and Behavior*, 17, 345-355.

Sandilands V, Powell K, Keeling L and Savory CJ 2004. Preen gland function in layer fowls: factors affecting preen oil fatty acid composition. *British Poultry Science* 45, 109-115.

Siegel HS 1995. Stress, strains and resistance. *British Poultry Science* 36, 003-22.

Tankson JD, Vizzier-Thaxton Y, Thaxton JP, May JD and Cameron JA 2001. Stress and nutritional quality of broilers. *Poultry Science* 80, 1384-1389.

Woelfel RL, Owens CM, Hirschler EM and Sams A 2002. The incidence and characterization of pale, soft and exudative chicken meat in a commercial plant. *Poultry Science* 81, 579-584.

Zhang L and Barbut S 2005. Rheological characteristics of fresh and frozen PSE, normal and DFD chicken breast meat. *British Poultry Science* 46, 87-693.

Zerehdaran S, Vereijken ALJ, van Arendonk A and van der Waaij EH 2005. Effects of age and housing system on genetic parameters for broiler carcass traits. *Poultry Science* 84, 833-838.

**Table 1** Composition of the diet, depending on birds' age. Values are per 100g diet.

Composition (%)	Bird's age		
	0-28 days	29-77 days	78 days-slaughter
Metabolisable energy (Kcal)	294	303	310
Protein	20.00	19.50	16.50
Lysine	1.12	0.90	0.75
Methionine	0.47	0.36	0.34
Sulphur amino acids	0.84	0.68	0.67
Tryptophan	0.20	0.18	0.17
Threonine	0.67	0.55	0.52
Calcium	1.00	0.90	0.90
Potassium	0.67	0.66	0.64

**Table 2** Treatment effect on mean weights (g) of carcass, abdominal fat and fillet at different times post slaughter

	Control	MHUSA	Significance (P)
CW <sup>1</sup> h24 <sup>2</sup>	1874±312	1959±331	*
Abd fat <sup>3</sup> h24	41.5±2.08	43.8±1.98	NS
FW <sup>4</sup> h24	235.9±3.62	247.2±3.87	*
FW d6 <sup>5</sup>	220.0±4.67	233.7±3.43	*

<sup>1</sup>CW: Carcass Weight; <sup>2</sup>h24: 24 hours post-mortem; <sup>3</sup>Abd fat: Abdominal fat. <sup>4</sup>FW: Fillet Weight; <sup>5</sup>d6: 6 days post-mortem. Means are indicated ± Standard Mean Error. \*P<0.05; NS: Not Significant.

**Table 3** Treatment effect on means of fillet and abdominal fat relative to CW, fillet weight loss from 24 hours to 6 days post-mortem and sample weight loss during cooking.

	Control	MHUSA	Significance (P)
Fillet:Carcass	12.6±0.13	12.5±0.27	NS
Abd fat:Carcass	2.2±0.12	2.3±0.10	NS
Fillet h24 <sup>1</sup> :Fillet d6 <sup>2</sup>	5.9±0.32	5.8±0.21	NS
Sample bcp <sup>3</sup> :Sample acp <sup>4</sup>	16.7±0.7	16.1±0.40	NS

<sup>1</sup>h24: 24 hours post-mortem; <sup>2</sup>d6: 6 days post-mortem; <sup>3</sup>bcp: before cooking procedure; <sup>4</sup>acp: after cooking procedure. Means are indicated ± Standard Mean Error. NS: Non Significant.

**Table 4** Treatment effect on means of fillet pH

	Control	MHUSA	Significance (P)
Fillet h24 <sup>1</sup>	5.9±0.01	5.9±0.01	NS
Fillet d6 <sup>2</sup>	5.7±0.08	5.8±0.06	NS

<sup>1</sup>Fillet h24: pH of the fillet 24 hours post-mortem. <sup>2</sup>Fillet d6: pH of the fillet 6 days post mortem. Means are indicated ± Standard Mean Error. NS: Non Significant.

**Table 5** Treatment effect on mean colour measurements at 24 hours and 6 days post-mortem, and after the cooking procedure

	Control	MHUSA	Significance (P)
L* h24 <sup>1</sup>	45.9±1.21	46.2±0.96	NS
a* h24 <sup>1</sup>	-1.0±0.28	-1.2±0.25	NS
b* h24 <sup>1</sup>	8.1±0.32	7.8±0.32	NS
H* h24 <sup>1</sup>	1.4±0.02	1.4±0.03	NS
C* h24 <sup>1</sup>	8.2±0.30	8.0±0.31	NS
L* d6 <sup>2</sup>	46.2±0.87	46.8±0.89	NS
a* d6 <sup>2</sup>	-2.3±0.13	-2.4±0.15	NS
b* d6 <sup>2</sup>	7.9±0.32	7.1±0.19	*
H* d6 <sup>2</sup>	-1.3±0.02	-1.3±0.02	NS
C* d6 <sup>2</sup>	8.3±3.36	7.5±4.18	P=0.06
L* acp <sup>3</sup>	44.4±4.13	46.0±4.10	NS
a* acp <sup>3</sup>	-0.3±0.24	0.3±0.24	P=0.07
b* acp <sup>3</sup>	17.9±0.26	17.9±0.26	NS
H* acp <sup>3</sup>	-0.3±0.19	0.1±0.20	NS
C* acp <sup>3</sup>	18.0±0.27	18.0±0.26	NS

<sup>1</sup>L\*, <sup>1</sup>a\*, <sup>1</sup>b\*, <sup>1</sup>H\*, <sup>1</sup>C\*: colour measurements on fillets 24 hours post-mortem; <sup>2</sup>L\*, <sup>2</sup>a\*, <sup>2</sup>b\*, <sup>2</sup>H\*, <sup>2</sup>C\*: colour measurements on fillet samples 6 days post-mortem; <sup>3</sup>L\*, <sup>3</sup>a\*, <sup>3</sup>b\*, <sup>3</sup>H\*, <sup>3</sup>C\*: colour measurements on fillet samples after the cooking procedure. L\* = lightness; a\* = degree of redness; b\* = degree of yellowness; H\* = Hue =  $\tan^{-1} b^*/a^*$ ; C\* = saturation =  $(a^{*2} + b^{*2})^{-1/2}$ . Means are indicated  $\pm$  Standard Mean Error. \*P<0.05; NS: Non Significant.

**Table 6** Pearson's correlation coefficients and probabilities for lightness, redness, yellowness, hue and saturation of the 35g fillet samples before and after the cooking procedure – Control group

	acp <sup>2</sup> b*	acp a*	acp L*	bcp b*	bcp a*
bcp <sup>1</sup> L*	-0.0444 <sup>3</sup>	0.6578	0.9325	-0.6553	0.7030
	0.7386 <sup>4</sup>	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
bcp a*	-0.0479	0.5459	0.6539	-0.3400	
	0.7085	0.0001	0.0001	0.0084	
bcp b*	0.2615	-0.5434	-0.7320		
	0.0454	0.0001	0.0001		
acp L*	-0.1527	0.6752			
	0.2483	0.0001			
acp a*	0.2982				
	0.0218				

<sup>1</sup>bcp: before cooking procedure; <sup>2</sup>acp: after cooking procedure. L\* = lightness; a\* = degree of redness; b\* = degree of yellowness; H\* = Hue =  $\tan^{-1} b^*/a^*$ ; C\* = saturation =  $(a^{*2} + b^{*2})^{-1/2}$ . <sup>3</sup>Pearson's correlation coefficient; <sup>4</sup>Probability.

**Table 7** Pearson's correlation coefficients and probabilities for pH, lightness, redness, yellowness, hue and saturation of the fillet 35g samples before and after the cooking procedure – MHUSA group

	acp <sup>2</sup> b*	acp a*	acp L*	bcp b*	bcp a*
bcp <sup>1</sup> L*	-0.2901 <sup>3</sup>	0.5137	0.9460	-0.4784	0.7744
	0.0272 <sup>4</sup>	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
bcp a*	-0.2731	0.5487	0.8150	-0.3809	
	0.0381	0.0001	0.0001	0.0032	
bcp b*	0.3370	-0.0334	-0.4863		
	0.0097	0.0103	0.0001		
acp L*	-0.2903	0.5089			
	0.0271	0.0001			
acp a*	0.0913				
	0.4952				

<sup>1</sup>bcp: before cooking procedure; <sup>2</sup>acp: after cooking procedure. L\* = lightness; a\* = degree of redness; b\* = degree of yellowness; H\* = Hue =  $\tan^{-1} b^*/a^*$ ; C\* = saturation =  $(a^{*2} + b^{*2})^{-1/2}$ . <sup>3</sup>Pearson's correlation coefficient; <sup>4</sup>Probability.

## **5. Essai en station n°1 : mesure de l'indice de consommation**

---

### **5.1. Type de communication et résumé**

➤ Type de communication : ce travail a été accepté pour publication dans *Poultry Science* après révisions (proposé le 29 septembre 2007, version révisée proposée le 21 mars 2008)

#### ➤ Résumé

L'expérimentation décrite part de deux constats de base. D'abord, les conséquences du stress chez la volaille peuvent être évaluées en étudiant un large éventail de paramètres. Ensuite, il a été démontré que le sémiochimique MHUSA (Mother Hen Uropygial Secretion Analogue) permettait de réduire les conséquences délétères du stress en conditions d'élevage, chez le poulet de chair.

Une des conséquences du stress est la diminution de la rentabilité alimentaire. Cette dernière, qui consiste en l'utilisation optimale de l'aliment pour le transformer en viande et en paramètre de croissance, est évaluée au travers de l'Indice de Consommation (ou IC). L'essai présenté a alors pour but de tester l'effet de MHUSA sur des poulets de chair, de la naissance à l'abattage, sur l'IC et d'autres paramètres reliés au stress. Pour cela 240 poussins de souche ROSS PM3 (souche conventionnelle de type *Standard*) âgés d'un jour ont été testés dans un schéma en double aveugle permettant de mesurer les effets de MHUSA, contre un placebo. L'essai s'est effectué en deux phases distinctes, séparées par un vide sanitaire de deux semaines, avec nettoyage complet des deux bâtiments utilisés. Ces derniers sont strictement identiques et divisés en six enclos distincts et identiques. Durant la première phase de l'essai, le bâtiment A a reçu le traitement MHUSA et le bâtiment B le traitement placebo. Après la période de vide sanitaire, un second lot de 120 poussins âgés de un jour fut testé en inversant les traitements (bâtiment A : placebo et bâtiment B : MHUSA). Les méthodes d'élevage ont respecté les normes habituelles en termes d'alimentation, d'accès à l'eau, de luminosité ou de température. Ainsi, ont été testés, durant chacune des deux phases de l'essai, 60 poussins sous MHUSA et 60 poussins sous placebo. Les 60 poussins étaient répartis équitablement par 10 (5 mâles et 5 femelles) dans chacun des six enclos de chaque bâtiment. MHUSA était diffusé de façon constante durant toute la période d'élevage.

Après 35 jours, les IC des poulets issus des deux traitements n'étaient pas significativement différents. On ne remarque pas non plus d'effet traitement quant à la mesure sanguine du glucose, du cholestérol total et des triglycérides. En revanche un effet traitement a été montré à la fois sur le ratio hétérophiles/lymphocytes HLR (MHUSA < placebo,  $p < 0,001$ ) et sur la corticostérone CS (MHUSA < placebo,  $p < 0,001$ ). Les poulets sous MHUSA sont plus lourds à 35 jours que les placebo ( $p < 0,01$ ) et ils ont une meilleure croissance puisque le gain de masse moyen par jour et par animal est supérieur ( $p < 0,01$ ). En revanche, la quantité d'aliment ingéré quotidiennement n'est pas significativement différente selon les traitements. Enfin, les mesures de pH sur les fientes de volailles ne montrent pas de différences entre les traitements.

Ces résultats indiquent que MHUSA influence le niveau basal de stress en diminuant la réponse aux stimuli potentiellement stressants. Les poulets de chair traités avec MHUSA durant leur période complète d'élevage montrent une tendance à une meilleure assimilation de la nourriture, ce qui leur permet d'avoir une croissance améliorée. Cela est probablement dû à une meilleure adaptation à leur environnement.

**Mots clés :** poulets de chair, stress, sémiochimique, indice de consommation, bien-être,

## **5.2. Texte original de la communication**

### **Title: Effects of a semiochemical on Feed Conversion Index and related indicators on fast growing broilers housed during 42 days**

Authors: I. Madec<sup>1</sup>, J.F. Gabarrou<sup>2</sup>, D. Moulin<sup>2</sup>, L. Bougrat<sup>1</sup>, C. Lafont-Lecuelle<sup>1</sup>, and P. Pageat<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Pherosynthese, Le Rieu Neuf, 84490 Saint Saturnin Les Apt, France

<sup>2</sup>EI Purpan – 75 voie du TOEC, BP 5761, 31076 Toulouse cedex 3, France

**ABSTRACT** Consequences of stress in poultry may be assessed through a wide range of parameters. A semiochemical named MHUSA is known to decrease stress in broilers. As stress influences their feeding behavior, this trial has been built so as to test the influence of MHUSA on Feed Conversion Index and related indicators. Two hundred and forty chicks were placed into 24 similar crates (10 chicks per crate) at one day of age. After 35 days, chickens under MHUSA presented similar Feed Conversion Index compared to control. A treatment effect was observed on both Heterophil:Lymphocyte Ratio and Corticosterone (MHUSA<control;  $p \leq 0.001$  for both), indicating a lower level of stress under MHUSA. Glucose, total cholesterol and triglycerides values were comparable among treatments. Live weight and daily weight gain were higher under MHUSA ( $P < 0.01$  for both), while daily food intake was comparable among treatments. Finally, fecal pH did not show a difference among treatments. It may be concluded from this study that broilers under MHUSA tend to better assimilate food, leading to a faster growth, because they cope better with stress in their surrounding.

**Key words:** Broiler, Stress, Semiochemical, Feed Conversion, Welfare.

## INTRODUCTION

Consequences of stress in aves may be assessed through a range of parameters. For example, stress affects welfare as it decreases complexity of both locomotor and resting sequences (Maria et al, 2004). The level of stress may also be observed through blood parameters. Mainly, the Heterophil:Lymphocyte Ratio (HLR) and the Corticosterone level (CS) are observed to assess stress in poultry (Thaxton et al, 2006). Secondary blood parameters are also known to be influenced in a stressing situation since stress causes elevation in glucose and total cholesterol whereas triglyceride level is reduced (Mumma et al, 2006). In stressed broilers, one can observe both low growing performances (Siegel, 1995) and weight gain (Zulfiki et al, 2002). The synthetic analogue of a semiochemical, named MHUSA (Mother Hen Uropygial Secretion Analogue), is known to have favorable effects on broilers by lowering HLR and a lower CS level thus reducing the stress response (Madec et al, 2005; Madec et al, 2006). The native semiochemical is secreted from the uropygial gland of mother hens (*Gallus gallus*) when isolated in natural mothering conditions. It has a similar effect compared with the species' specific appeasing pheromones mainly described in mammals (Moltz and Leet, 1981 ; Mc Glone and Anderson, 2002 ; Pageat and Gaultier, 2003). The hen's native secretion, composed of fatty acids, is produced continuously from four days before hatching until separation occurs (Pageat, 2002). Madec et al (2006, 2008) showed that both carcass weights and growth rate improved using MHUSA. According to Mumma et al (2006) stress leads to proteinic catabolism and increases food and water consumption. Authors added that a stress has a negative effect on feed conversion. Moreover, according to several studies (Richards, 2003; Maria et al, 2004), the feeding behavior of broilers is disturbed by stress. Thus, as stress influences feeding behavior, we hypothesize that less stressed broilers would tend to better utilize food. Since MHUSA has a potential to decrease stress, it could thus influence feeding efficiency in broilers. Moreover, it seems possible that, as a consequence of better food utilization, the litter pH could be lowered in less stressed birds because of a better amino acid utilization and reduced nitrogen excretion (Pope et al, 2004). This could result in a reduced ammonia volatilization in broiler houses (Burgess et al, 1998). The following trial was designed to assess the stress reducing effect of MHUSA on the feed conversion index and other related stress indicators.

## MATERIALS AND METHODS

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

Two identical buildings were used for the study. Each one was divided into 6 identical crates of 120cmx125cm each. Apart from dimensions, these crates were comparable to basically floored pens. In each crate, a heater (Infra Red light) was provided during the first week. Floor was made of concrete covered by an insulating plastic carpet to ease faecal sampling. Artificial light was maintained 23L:1D providing 20 lux per building when light was on while temperature, hygrometry and dead birds were checked twice a day. A total of 240 broilers (strain ROSS PM3) were utilized in the study. There were 60 birds in each building for each one of the 2 trials, using a 1:1 sex ratio as in conventional husbandries. Five males and 5 females were placed at one day of age in each crate. Each bird was individually identified by numbered wing tags prior to placement. Animals had free access to water and an nutritional adequate diet. A starter diet was provided during the first 18 days and a growing-finishing diet was provided from 19 to 42 days. Animal care and sample collection were performed according to the 95/29/CE European convention.

### ***Treatment***

The product tested in our experiment is a synthetic analogue of an odorous secretion coming from hens' uropygial glands (also known as the "preening gland"). Our treatment was identical to the one tested and described in the study by Madec et al (2006). Briefly,

the treatment was incorporated into a gelatin matrix block composed of water (135g), non-ionic surfactant (7g) and a gelling gum (5g), plus either 3g of water (control) or 3g of MHUSA. This gelatine matrix block (control or MHUSA) was held in specially manufactured perforated plastic containers suspended 120cm above the ground, out of reach of the birds. Since they are fatty acid methyl esters (FAME), the components of MHUSA are heavier than air and this delivery arrangement allowed the treatment to diffuse into the air around the birds. Finally, treatment was blinded since it was impossible to tell the difference between MHUSA and control matrixes (difference in odour and appearance is impossible to make), and the persons involved in the trial were unaware of which group was given which treatment.

### ***Experimental design***

Two buildings and two batches were utilized in the experiment: building A and building B. In the first trial, birds in building A acted as control (received control containers) whereas birds in building B received the semiochemical (MHUSA containers). After the first trial was done (meaning animals were slaughtered), a 14 day clean out was conducted on the research facilities. After the clean out, a replication occurred (meaning arrival of new day old birds): birds in the building B acted as control whereas birds in the building A received the MHUSA treatment. A total amount of 24 blocks (4 replacements x 6 blocks) were used per building and per batch, meaning one block was provided per crate and was replaced every 10 days. Both trials were conducted in the same manner. This experimental design was chosen, first to be free of a potential building effect and second to avoid any cross contamination of treatments from one building to another. Since MHUSA is a semiochemical, it could not be placed in the same building as the controls. Because of this treatment fashion, we randomized treatments on buildings rather than on chickens.

### ***Indicators***

Each bird was individually weighed 11 times (WELTECH®, Bird Weighing System 1050): once the first week, then twice a week. Feed intake was measured the same days birds were weighed (i.e. twice weekly) so that the Feed Conversion Index (CI) could be calculated for each period. Feed Conversion Index (CI), the main dependent variable, was calculated by dividing daily feed consumption by Daily Weight Gain (DWG). Data collected allowed for the determination of CI, Daily Food Intake (DFI), DWG and Live Weight (LW). On D39, blood samples were pulled on each bird. The blood was collected via the brachial vein and conserved in EDTA tubes. The physiological blood indicators (HLR and CS) were studied at D39, 3 days before slaughter. HLR was estimated from blood film smears using May-Grunwald and Giemsa stains (Lucas and Jamroz, 1961). CS level was determined by Radio Immuno Assay method (De Jong et al, 2001). Both HLR and CS were measured by a specialized laboratory (LDH, ENV Nantes, La Chantrerie, Nantes-France). Apart from these two blood indicators, we also measured Glucose (Glu), total Cholesterol (Chol) and Triglycerides (Tri). Glu, Chol and Tri were analyzed by a private independent laboratory (Aubert-Verneuil, Apt-France) and determined using an auto analyzer (Ektachem model DT60) using enzymatic procedures (Elliott, 1984). Samples of excreta were collected from each crate manually, using sterilized gloves and appropriate polyethylene bags. Each week, 10 samples were taken from each crate. These bags were stored inside a cooler prior to transport to the laboratory. Feces were then analyzed for pH, according to the method described by Burgess et al (1998). Briefly, 10g of excreta and 1g of  $Al_2(SO_4)_3$  were mixed and the pH of samples was measured thanks to a pH-meter (Model CG 843, Schott), right after the mixing, using a 20ml mixture of distilled water and 1g of the sample.

### ***Statistical analysis***

To eliminate the potential impact of the blood sampling on feeding behavior, the D35 results were analyzed. First, we thought that blood samples could have had an effect on feeding behavior and thus on many linked parameters. Second, we wanted to analyse

each parameter (except from blood sample) on a same basis (i.e. D35). Results dealt with data from either 240 values (10 birds\*12 crates, replicated) or with 24 values (12 crates, replicated), depending on available data. The bird represented the experimental unit (240 values) for the dependent variables blood and growth parameters. The crate was the experimental unit (24 values) for IC, DFI and feces pH and our main parameter was IC. Results were analyzed using the Statistica 5.0 software (Statsoft) and means which were significantly different (MHUSA vs control) at the  $P < 0.05$  were separated using the repeated t-test.

## RESULTS

Birds' growing conditions were comparable among treatments since we did not observe any difference either in temperature ( $34.9 \pm 5.7^\circ\text{C}$  vs  $34.1 \pm 4.4^\circ\text{C}$ , for MHUSA and control, respectively) or percentage of hygrometry ( $52.6 \pm 14.8$  vs  $52.9 \pm 14.9$ , for MHUSA and control, respectively). Moreover, we noted comparable results concerning dead birds since we observed a total of 8 and 7 dead birds in MHUSA and control, respectively. There were no significant difference between treatments for CI and DFI (Table 1). Individual LW and DWG were significantly heavier for the MHUSA ( $P < 0.01$ ). Results from blood samples are presented in Table 2. There was a treatment effect for both HLR and CS, which were lower in the MHUSA group ( $P < 0.001$  and  $P < 0.001$  for HLR and CS, respectively). None of the other blood indicators showed such a difference. Indeed, Glu, Chol and Tri values did not show any difference among treatments. Finally, feces pH did not show a difference among treatments ( $6.0 \pm 0.2$  vs  $6.2 \pm 0.3$ , for control and MHUSA, respectively).

## DISCUSSION

Previous studies using MHUSA in broilers showed that birds under this semiochemical had higher LW compared to control (Madec et al, 2005; Madec et al, 2006; Madec et al, 2008). The current study results are similar for LW but the results did not support the hypothesis that CI would be improved for broilers exposed to MHUSA. It appears that broilers treated with MHUSA tend to be heavier while their food consumption is not significantly different, although higher, to that of the control birds. This may explain the lack of significant difference in CI among treatments. Nevertheless, our values of CI are in accordance with previous observations (Coufal et al, 2006), but LW appear lower compared to other studies (Mehaffey et al, 2006). It appears that brooding conditions did not support optimal performance. The test sites probably did not provide adequate environmental control leading to temperature variations which is known to influence growth in chicken (Lin et al, 2005). Nevertheless, in our experiment, temperature and hygrometry were comparable among treatments, while mortality was similar among treatments and below references, stated at 1.5% of the total population by Hadorn et al (2002). These observations mean that our breeding conditions were acceptable, even if not idealistic, for animal growth and welfare. Moreover, our stocking density was well below commercial densities (Omeira et al, 2006). The current study utilized 10 birds per crate which was 7 birds/m<sup>2</sup> as compared to 20 birds/m<sup>2</sup> observed in some farms. It is known that birds show changing behavior pattern under stress as they tend to be less active and eat less often (Nielsen, 1999), which is in accordance with our observations. Moreover, Maria et al (2004) pointed out a lower activity in stressed birds because of lower body energy level and Mumma et al (2006) described lower growth curves in case of ACTH induced stress in laying hens. In pigs, a synthetic maternal pheromone, similar to MHUSA, is known to have a potential to stimulate feeding behaviour and weight gain in piglets (Mc Glone and Anderson, 2002). These references showed that MHUSA may have reduced stress level, but also increased activity and feeding behavior. This hypothesis is in accordance with results by Bohus et al (1987) showing a correlation between feeding behavior and CS level, and with those of Tachibana et al (2007), which proved the existing positive relationship between CS level

and anorexia. The current results show the CS level was lower for the MHUSA exposed birds which supports the theory that MHUSA decreases stress. This is similar to a previous study testing MHUSA in broilers where MHUSA lowered CS (Madec et al, 2006; Madec et al, 2008). Observed differences in DWG tend to show that chicks exposed at an early age to MHUSA are positively influenced since LW at D7 is correlated to LW at both D21 and D42 (Gonzales et al, 2003). In their study, these authors did not find any differences in HLR, indicating no chronic stress state which is not similar to the current results. In our study, the difference observed in HLR among treatments may be due to the repeated visits due to experimental needs. The presence of humans could be considered a disturbing event (Luescher & Sheehan, 2005) and thus affect both HLR and CS if repeated. The three remaining blood parameters (Glu, Chol and Tri) were apparently not influenced by the treatment, which is different from what had been found in other studies in which a stressing situation tended to increase these values (Puvadolpirod and Thaxton, 2000; Mumma et al, 2006). It has to be noted that these studies used a model of stress by continuous ACTH injection. This is different from the present study. Thaxton et al (2006) found no influence on Glu, Chol and Tri on a stressing situation in over crowded male broilers, while CS showed higher values compared to control. Our findings appear logical since body fat content and level of triglycerides are linked (Oh et al, 2007). Indeed, a comparable Tri level between treatments reach conclusions similar to those by Madec et al (2006) who observed no statistical differences in body fat between MHUSA and control, but a difference in muscle content. It could thus be hypothesized that the observed weight difference is due to muscle metabolism. It would then appear that birds under MHUSA could transform eaten food in a valuable way. As MHUSA seems to be specific to poultry, it could be compared to the fact that newborns are attracted to breast odours in Humans (Porter and Winberg, 1999), indicating a relationship between a mother semiochemical and feeding behavior of related young's. We planned behavioral observations in subsequent studies to ascertain if the mother semiochemical MHUSA influences feeding behaviour in broilers. Finally, our results show that pH values of excreta are not influenced by the treatment MHUSA. As Derikx et al (1994) showed that the more the pH value increases, the more ammonia is released by the litter, it seems interesting to note that using MHUSA, broilers seem to reach their final weight earlier without causing environmental damage regarding nitrogen release. Since other parameters affect litter pH and ammonia generation rates, such as moisture and nitrogen litter content (Coufal et al, 2006), further studies are needed to ascertain this hypothesis. Thus, as there is a demand and a need for accuracy of land application of poultry litter, this represents a strong argument to fully understand chain reaction from the diffusion to specific reaction due to MHUSA.

## REFERENCES

- Bohus, B., R.F. Benus, D.S. Fokkema, J.M. Koolhass, C. Nyakas, G.A. van Ootmerssen, A.J.A. Prins, A.J.H. de Rooter, A.J.W. Scheurink, and A.B. Steffens. 1987. Neuroendocrine states and behavioral and physiological stress responses. *Prog. in Brain Res.* 72: 57-70.
- Burgess, R.P., J.B. Carey, and D.J. Shafer. 1998. The impact of pH on nitrogen retention in laboratory analysis of broiler litter. *Poult. Sc.* 77: 1620-1622.
- Coufal, C.D., C. Chavez, P.R. Niemeyer, and J.B. Carey. 2006. Nitrogen emissions from broilers measured by mass balance over eighteen consecutive flocks. *Poult. Sci.* 85: 384-391.
- De Jong, I.C., A. van Voorst, J.H. Erkens, D.A. Ehhardt, and H.J. Blokhuis. 2001. Determination of the circadian rhythm in plasma corticosterone and catecholamine concentrations in growing broilers breeders using intravenous cannulations. *Physiol. Behav.* 74: 299-304.

Derikx, P.J.L., H.C. Willers, and P.J.W ten Haves. 1994. Effects of pH on the behaviour of volatiles compounds in organic manures during dry-matter determination. *Bioresource Tech.* 49: 41-45.

Elliott, R. J. 1984. Ektachem DT-60 Analyzer. *Physician's Leading Comput. J.* 2:6.

Gonzales E., N. Kondo, E.S. Saldanha, M.M. Loddy, C. Careghi, and E. Decuypere. 2003. Performance and physiological parameters of broiler chickens subjected to fasting on the neonatal period. *Poult. Sci.* 82:1250-1256.

Hadorn R., H. Wiedmer, and H. Oester. 2002. Effets de différents taux d'occupation dans l'engraissement normal des poulets [effect of different stocking density on growth in broilers] *Agrarforschung* 9 : 440-445.

Lin, H., H.F. Zhang, R. Du, X.H. Gu, Z.Y. Zhang, J. Buyse, and E. Decuypere . 2005. Thermoregulation responses of broiler chicken to humidity at different ambient temperatures. Four weeks of age. *Poult. Sci.* 84 : 1173-1178.

Luescher, A. U., and K. Sheehan. 2005. Rearing environment and behavioural development in psittacine birds. *Proc. 5th Int. Behav.Vet. Med., Minneapolis USA.*

Lucas, A.M., and C. Jamroz. 1961. Atlas of avian hematology. Agriculture Monograph 25, USDA, Washington DC.

Madec, I., D. Saffray, J.F. Gabarrou, C. Lafont, L. Bougrat, J. Gigante, and P. Pageat. 2005. Comparison of the behaviour of three groups of chickens during their growth. *Proc. 5th Int. Behav.Vet. Med., Minneapolis USA.*

Madec, I., P. Pageat, L. Bougrat, D. Saffray, C. Lafont, C. Falewee, M.A. Gervasoni, A. Bollart, and J. F. Gabarrou. 2006. Influence of a Semiochemical Analogue on Growing Performances and Meat Quality of Broilers. *Poult. Sci.* 85: 2112-2116.

Madec, I., J.F. Gabarrou, L. Bougrat, D. Guillaumey, and P. Pageat. 2008. Are 35 days enough to observe the stress-reducing effect of a semiochemical analogue on chickens (*Gallus gallus domesticus*) housed under high density? *Poult. Sci.* 87: 222-225.

Maria, G.A., J. Escos, and C.L. Alados. 2004. Complexity of behavioural sequences and their relation to stress condition in chickens: a non invasive technique to evaluate animal welfare. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 86: 93-104.

Mc Glone, J.J., and D.L. Anderson. 2002. Synthetic pheromone stimulates feeding behaviour and weight gain in weaned pigs. *J. Anim. Sci.* 80: 3179-3183.

Mehaffey, J.M., S.P. Pradham, J. Meullenet, J.L. Emmert, S.R. McKee, and C.M. Owens. 2006. Meat quality evaluation of minimally aged broiler breast fillets from five commercial genetic strains. *Poult. Sci.* 85: 902-908.

Moltz, H., and M. Leet. 1981. The maternal pheromone of the rat: identity and functional significance. *Phys. Behav.* 26: 301-306.

Mumma, J.O, J.P. Thaxton, Y. Vizzier-Thaxton, and W.L. Dosdon. 2006. Physiological stress in laying hens. *Poult Sci.* 85: 761-769.

Nielsen, B.L. 1999. On the interpretation of feeding behaviour measures and the use of feeding rate as an indicator of social constraint. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 63: 79-91.

Oh, K.S., E.Y. Kim, M. Yoon, and C.M. Lee. 2007. Swim training improves leptin receptor deficiency-induced obesity and lipid disorder by activating uncoupling proteins. *Exp. Mol. Med.* 39: 385-394.

Omeira, N., E.K. Barbour, P.A. Nehme, S.K. Hamadeh, R. Zurayk, and I. Bashour. 2006. Microbiological and chemical properties of litter from different chicken types and production systems. *Sci. Tot. Env.* 367: 156-163.

Pageat, P. 2002. Avian appeasing pheromones to decrease stress, anxiety and aggressiveness. US Patent 60/389,768.

Pageat, P., and E. Gaultier. 2003. Current research in canine and feline pheromones. *Vet. Clinics* 33: 187-211.

Pope, T., L.N. Loupe, P.B. Pillai, and J.L. Emmert. 2004. Growth performances and Nitrogen excretion of broilers using a phase feeding approach from twenty six to sixty three days of age. *Poult.Sc.* 83: 676-682.

- Porter R.H., and J. Winberg. 1999. Unique salience of maternal breast odors for newborn infants. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 23: 439-449.
- Puvadolpirod, S., and J.P. Thaxton. 2000. Model of physiological stress in chickens, 1. Responses parameters. *Poult. Sc.* 79: 363-369.
- Richards, M.P., 2003. Genetic regulation of feed intake and energy balance in Poultry. *Poult. Sc.* 82 : 907-916.
- Siegel, H.S. 1995. Stress, strains and resistance. *Br. Poult. Sci.* 36: 003-22.
- Tachibana T., D. Oikawa, H. Takahashi, T. Boswell, and M. Furuse. 2007. The anorexic effect of alpha-melanocyte-stimulating hormone is mediated by corticotrophin-releasing factor in chicks. *Comp. Biochem. Physiol.* 147:173-178.
- Thaxton, J.P., A. Dozier, S.L. Branton, W. Morgan, D.W. Miles, W.B. Roush, B.D. Lott, and Y. Vizzier Thaxton. 2006. Stoking density and physiological adaptative responses of broilers. *Poult. Sc.* 85: 819-824.
- Zulkifli, I., J. Gilbert, P.K. Liew, and J. Ginsos. 2002. The effects of regular visual contact with human beings on fear, stress, antibody and growth responses in broiler chickens. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 79: 103-112.

**Table 1.** Influence of MHUSA treatment on individual performance indicators at D35

	Control	MHUSA
Conversion Index	1.85±0.20	1.78±0.10
Live weights (g)	1130±294	1238±331**
Daily weight gain (g)	32.3±8.4	35.4±9.5**
Daily food intake <sup>(1)</sup> (g)	2093±305	2344±538

<sup>(1)</sup> Indicated per box ; Means are indicated ± Standard Error. \*\*P<0.01.

**Table 2.** Influence of MHUSA treatment on blood indicators at D39.

	Control	MHUSA
HLR <sup>1</sup>	0.355±0.220	0.269±0.109***
CS <sup>2</sup>	10.1±12.2	3.8±7.1***
Glu <sup>3</sup>	2.57±0.27	2.52±0.28
Chol <sup>4</sup>	1.27±0.22	1.31±0.27
Tri <sup>5</sup>	0.92±0.35	0.98±0.40

<sup>1</sup>HLR: Heterophil:Lymphocyte Ratio; <sup>2</sup>CS: Corticosterone (ng/ml); <sup>3</sup>Glu: glucose (g/l); <sup>4</sup>Chol: Cholesterol (g/l), <sup>5</sup>Tri: Triglycerids (g/l). Means are indicated ± Standard Error. \*\*\*P<0.001.

## 6. Essai en station n°2 : physiologie et production de cytokines

---

### 6.1. Type de communication et résumé

➤ Type de communication : ce travail a été soumis pour publication dans *Brain Behaviour and Immunity* (proposé le 10 mars 2008)

#### ➤ Résumé

Le but de ce travail était de mesurer les effets d'un analogue de sécrétion maternelle odorante (MHUSA) sur la réponse immune et l'activation de l'axe hypothalamo-hypophysio-surrénalien chez des poulets en situation de stress provoquée. Deux groupes de 12 poulets (*Gallus gallus domesticus*) ont été testés par paires pour des mesures de Corticostérone (GC) qui était le paramètre principal de l'étude, pour le Ratio Hétérophiles / Lymphocytes (HLR), IL1 $\beta$ , IL6 et pour IFN $\gamma$  (paramètres secondaires). Les poulets sont mis en situation de stress (isolement et nouveauté) durant 3 heures dans une cage en verre de 0,08m<sup>2</sup> alimentée par de l'air chargé soit en MHUSA soit en un placebo de MHUSA. Des prises de sang sont effectuées toutes les 60 minutes à partir de l'introduction de l'animal dans le dispositif en verre. Trois prises de sang sont ainsi effectuées pendant la situation de stress, elles sont notées T1, T2 et T3, respectivement à 60min, 120min et 180min après l'introduction de l'animal dans le dispositif en verre. Une prise de sang (notée T0) est également effectuée avant le début de la phase de stress et d'exposition au traitement, afin d'avoir une comparaison entre les groupes de traitement en situation non stressante.

Les résultats montrent que GC est influencé à la fois par le traitement ( $p < 0,05$ ) et par la durée ( $p < 0,05$ ). Il y a aussi un effet du traitement à T3 pour HLR ( $p < 0,001$ ), à T2 pour IFN $\gamma$  ( $p < 0,05$ ) et à T1 pour IL6 ( $p < 0,05$ ). Pour chacune des différences significatives observées, la valeur provenant des individus sous MHUSA est plus faible que celle provenant de leur pendant sous le placebo.

En présence du stimulus maternel MHUSA, les poulets domestiques montrent à la fois une modulation de l'axe hypothalamo-hypophysio-surrénalien et de la réponse immunitaire. Il est suggéré que MHUSA influence la production de IFN $\gamma$  et de IL6, eux-même liés à la production de GC, mais aussi influencés par des situations de stress. Les résultats obtenus montrent que MHUSA présente un intérêt pour la production industrielle de poulets puisqu'il est reconnu que cette dernière est génératrice de stress. De plus, comme le stress influence l'immunité et donc par extension la santé des poulets, il semble particulièrement intéressant de prolonger ce type d'investigations. Nous notons enfin que MHUSA présente des particularités chimiques comparables à celles des phéromones d'apaisement découvertes chez les mammifères, tout en ayant une influence similaire sur les réponses au stress. Nous concluons que MHUSA apparaît comme un outil méthodologique intéressant pour étudier les stimulations apportées par la mère comme la protection ou l'apprentissage.

**Mots clés** : odeur maternelle, poulet, corticostérone, système immunitaire, cytokines, stress, phéromone.

## **6.2. Texte original de la communication**

**Title: Influence of a mother-hen odorous secretion on the hypothalamic-pituitary-adrenal and immune reaction in domestic chickens (*Gallus gallus domesticus*) experiencing a standardized stress-eliciting situation.**

Authors: Iltud Madec<sup>a</sup>, Jean-François Gabarrou<sup>b</sup>, Hélène Eutamien<sup>b</sup>, Céline Lecuelle<sup>a</sup>, Laurent Bougrat<sup>a</sup>, Mathilde Levêque<sup>c</sup>, Vassilia Th  odorou<sup>c</sup> and Patrick Pageat<sup>a</sup>.

<sup>a</sup>Pherosynthese, Le Rieu Neuf, 84490 Saint Saturnin Les Apt, France

<sup>b</sup>EI Purpan – 75 voie du TOEC, BP 5761, 31076 Toulouse cedex 3, France

<sup>c</sup>Neuro-Gastroenterology and Nutrition Unit, UMR 1054 INRA/ESAP, 180 chemin de Tournefeuille, BP 3, 31931 Toulouse cedex 9, France

**ABSTRACT** The aim of this study was to measure the effects of a mother odorant (MHUSA) on the HPA and immune systems of chickens experiencing a standardized stress. Two groups of 12 chickens (*Gallus gallus domesticus*) have been tested by pairs for corticosterone (GC) as main parameter and for HLR, IL1 $\beta$ , IL6 and IFN $\gamma$  as secondary parameters. Chickens experienced stress during 3 hours in a test box made of glass sized 0.08m<sup>3</sup> of which air was provided either with MHUSA or a placebo. Blood samples have been performed on each bird each 60min (T1, T2 and T3). We found a treatment effect on GC ( $p < .05$ ) as well as a time effect ( $p < .05$ ). We also found a treatment effect at T3 for HLR ( $p < .001$ ), at T2 for IFN $\gamma$  ( $p < .05$ ) and at T1 for IL6 ( $p < .05$ ). For each observed significant differences, values were lower in the MHUSA treated group. In presence of the maternal odorous stimulus, chickens show a modulation of the HPA and immune response. We hypothesize that MHUSA may influence production of IFN $\gamma$  and IL6 which are linked to GC and influenced by stressors. These findings are of interest regarding stressing environment of industrially housed birds because stress and health are linked. It is also pointed out that MHUSA shows similar chemical pattern and lead to similar physiological reactions compared to some pheromones used in mammals. It is concluded that MHUSA appears to be an interesting tool in studying stimulations provided by the mother (protecting and nursing).

**Key words:** maternal odorant, chicken, corticosterone, immune system, cytokines, stress, pheromone

## INTRODUCTION

When animals face stressing conditions of life, the central and peripheral catecholamine systems and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPA) are activated (Samson et al., 2007). The HPA and the immune system are mutually regulatory (Maes et al., 1995) and an increased release of glucocorticoid hormones can be measured (Aguilera et al., 2007). Beside aggressions from conspecifics or predators, novelty and social interactions with conspecifics can induce stress too. Capability to cope with novelty and social skills appear to be highly depending to early development and attachment to the mother. Disorders affecting the quality of the postnatal environment and especially the interactions with the mother, have been shown to be especially detrimental to the functionality of the HPA system in mammals (Rosenfeldt et al., 1992; Liu et al., 1997; Worlein and Laudenslager, 2001). Young mammals subjected to early separation show a significant reduction in mitogen-induced lymphocyte proliferation and long-term suppression of cell-mediated immune responses (Worlein and Laudenslager, 2001). In birds, the influence of distressing events or inappropriate conditions of life on the HPA axis and immune system, has been described in literature (Zulkifli et al., 2002; Vleck et al., 2000; Campo et al., 2005). In poultry, stress induces an increase in the heterophil to lymphocyte ratio (HLR) (Campo et al., 2005) as well as of the corticosterone blood level (GC) and repeated stress induces changes in immunity by lowering the response (Post et al., 2003). Several situations are known to be stressful in birds. Socially isolated chickens show higher level of stress compared to other living with conspecific (Saito et al., 2005). Handling and transportation (Stern et al., 1995), as well as novel environment (Martin, 1978), are also known to be stressful to birds. As observed in mammals, early experience and maternal relationships play a major role in the sensitivity to stressful events in birds too (Martin, 1978; Collette et al., 2000). Neonatal handling in Amazon parrots chicks (*Amazona amazonica*), as a technique to supply tactile stimulation from the mother and improve socialization to humans, diminishes the sensitivity to distressing situation (being restrained), and results in a lower GC and delayed-type hypersensitivity (response to phytohemagglutinin-P injection) (Collette et al., 2000). The influence of the mother on the development and emotional balance of the chicks is based on sensory stimulation. Tactile stimulations seem very obvious but are not the only stimuli involved in the maternal relationship, the role of visual and acoustic stimuli has been underlined by different authors (Gruss and Braun, 1996; Göth and Evans, 2004). Such stimuli, and especially auditory stimuli known for playing an important role in maternal recognition by chicks, modulate the monoaminergic activity in the chicken forebrain (mediorostral neostriatum/hyperstriatum ventrale) which is involved in the control of emotional responses (Gruss and Braun, 1996; Schnabel and Braun, 1996; Gruss and Braun, 1997). Different other studies have shown the interest of odorous signals in the chick-mother relationship, underlining the precocity of the olfactory capabilities in newly-hatched chicks (Lalloue et al., 2003) and the possible role of such stimuli in interindividual recognition (Clark and Smeraski, 1990; Mabayo et al., 1996; Lalloue et al., 2003). In 2002, we have identified a secretion from the uropygial glands of hens having chicks, which shared many common characteristics with some pheromones previously identified in mammals (Pageat, 2002). This secretion begins to be secreted in the days following hatching of the chicks and we have named it "Mother Hen Uropygial Secretion". A synthetic analogue of this mixture of methyl-esters, the MHUSA (Mother Hen Uropygial Secretion Analogue) has been produced and tested in field and lab studies, showing its efficacy in improving the technical performances of broilers and controlling fear-related reactions (Madec et al., 2005; Madec et al., 2006; Madec et al., 2007; Madec et al., 2008b). During a trial comparing MHUSA with a control, the analogue of the maternal odorous secretion appeared to reduce the fear-related behaviours of chickens exposed to a leurre of flying predator (e.g. less chickens discontinues their feeding behaviour and those which have discontinued it are back sooner on eating after the leurre has disappeared). During the field-studies, in poultry farms, GC and HLR appeared to be

lower in broiler treated with MHUSA than in controls, their Daily-Weight-Gain was higher with heavier fillets (Madec et al., 2006; Madec et al., 2008b). Further published data describing the quality of the meat which is deeply influenced by stress on studying pH, colour and weight-loss after death and on cooking, have shown a significant influence of MHUSA in a sense that led to suspect that the treatment was effective in controlling the sensitivity of the chickens to stressors (Madec et al., 2008a). Those results were very similar to those described in the literature with synthetic analogues of odorous maternal secretions released by mammalian species (McGlone and Anderson, 2002; Kooni et al., 2005; Falewee et al., 2006; Gaultier et al., 2008). With chickens treated with MHUSA as well as with mammals treated with synthetic analogues of maternal pheromones, the autonomic reactions as well as the HPA activations and the fear-related behaviours are decreased, making the animals more capable to cope with their environment. The aim of this study is to measure the effects of MHUSA on the HPA and immune systems of chickens experiencing a standardized situation cumulating handling, novelty and social isolation.

## MATERIALS AND METHODS

### ***Experimental design***

The experiment has been led at the Pherosynthese Research Institute in Southern France. Experimental design was two a superiority trial, parallel groups, single-blind, against control, single blind and repeated measures. One of the most challenging point on assessing effects of semiochemicals, lays in controlling possible contamination between test and control groups. In order to prevent such a risk, the chickens from the control group, treated with the control product, have been tested first, when those from the test group (receiving MHUSA) went second.

### ***Individuals and sampling conditions***

The total population of 24 chickens (*Gallus gallus domesticus*) enrolled in this study were obtained from the same poultry farm. They were from the same strain (SASSO TN 441) and of the same age (70 days old), making them sexually immature (maturity usually reached at 90 days). Whatever the chickens' sexual status, our population was made of 12 females and 12 males. Since the tests were performed during two different following weeks, two identical groups of chickens (12 and 12, 6 males and 6 females in each) have been used, in order to have comparable animals regarding their age and naivety for the test (figure 3). Because possible contamination was a major concern, the chickens enrolled in this study during the first week received the control treatment when those experiencing the situation during the second week were treated with MHUSA. Methods of breeding, handling and sample collection were performed according to the 95/29/CE European convention. The chickens were kept in a 3m<sup>2</sup> pen layed with fresh straw and free access to water and food. We assumed the chickens were in good health and had not received any medical treatment during the week before the experiment.

### **Testing conditions**

The stressing event included handling, novelty and isolation. The birds, after spending two days in a pen with their conspecifics, were handled for blood sampling and then placed in the test box divided in two compartments separated by a clear wall (figure 1). This test box is made of clear glass and sized 50x45x35cm (0.08m<sup>3</sup>), and is divided in two airtight and watertight compartments of the same size. The ground of the test box was constituted of a removable cork carpet, and fresh water was provided. This box was located in a 10 m<sup>2</sup> room where the birds had never been previously and was thus a novel environment where the chickens were socially isolated. During the test, the environment was controlled regarding the light (continuous artificial light), constant temperature (22°C) and hygrometry (70%). Because social isolation sometimes induces panic reactions in chickens (Saito et

al., 2005), we placed one bird in each compartment of the box making them capable to see each others. Chickens were thus experiencing the test by pairs made of one female and one male.

### ***Treatment***

Since the diffusion of the semiochemical MHUSA is crucial in this experiment, the air breathed by the chickens went exclusively from a 10m<sup>3</sup> bottle of purified air (Air Liquide Company). This air went first through a glass bottle containing either the treatment product or the control. The air was delivered at a pressure of 0.15 bars allowing a 4.5 liters per minute flow and thanks to regulators (HBS-HBSI, L'Air Liquide, France), we ensured to deliver the same air flow to the two compartments of the testing box.. One compartment was assigned to females and the other one to males. The product tested in our experiment, MHUSA, is a synthetic analogue of an odorous secretion coming from hens' uropygial glands. This analogue was included in macromolecular gelatin blocks (Nicols S.A., 59980 Bertry, France) from which it was slowly released. The gelatin matrix of the blocks consisted of water (>90%), non ionic surfactant (4%) and a gelling gum (3%). Those blocks included 2% of the active substance (MHUSA). This galenic form of the product was identical to the treatment tested in our previous field trials (Madec et al., 2005 ; Madec et al., 2006 ; Madec et al., 2008a). On the contrary, the blocks used for the control group were only made of the matrix and had the same visual characteristics as MHUSA blocks. In order to have an optimal release of the odorant, the blocks were divided in pieces weighting 20g each and placed in the glass bottles situated on the air circuit (figure 2). The treatment started 30 minutes before introduction of the birds and lasted for 3 hours. Treatment products were weighted at the beginning and in the end of the test to measure the total amount of active substance that has been perfused in the test box. Before introducing a new pair of chickens, the testing boxes were cleaned with a 2.5% solution of ammonium-alkyl-dimethyl-benzyl-chlorid (Major C100 Neutre™, Setal – France). The detergent was diluted (1%) in purified water warmed (50°C) before being rinsed twice with warm purified water and then dried with pure cellulose paper. Between 2 passages, a wash out of 30 minutes was performed (during which both cork carpets and water were renewed) in order to prevent any risk of odorous contamination. This odorous contamination includes both tracks from the treatment product and alarm pheromones possibly released by the chickens as a consequence to the stress (Bandyopadhyay et al., 1990). Our washing protocol had been shaped taking those phenomena in account.

### ***Observed parameters and methods of measurement***

In order to assess the activation of the HPA and immune systems, different parameters have been studied. Variations in the secretion of GC is regarded as a typical consequence to HPA activation as described in the introduction. Thus, we decided to use GC as the principle parameter we have used for the evaluation of the HPA activation. HLR, as a secondary parameter, will provide information about the evaluation of the immune system. During this experiment, we had the opportunity to assess the variations of some cytokines (IL1 $\beta$ , IL6 and IFN $\gamma$ ), thanks to specific monoclonal antibodies. Those results have been analysed as secondary parameters too. The blood was collected in the wing vein and kept in EDTA tubes. Tubes were stored at +4°C and were centrifuged (3000rpm, 10min) right after sampling. Serum was then collected and stored in dry tubes at -80°C until analyses. GC has been measured using Radio Immuno Assay method (De Jong et al., 2001 ; Puvadolpirod and Thaxton, 2000). To measure HLR, one hundred leucocytes (granular and non granular) were counted from blood film smears using May-Grunwald and Giemsa stains (Lucas and Jamroz, 1961). Assuming the absence of standardized methods to measure cytokines in chickens, we had to tailor a method based on techniques targetted to mammals. In order to strengthen our results, we decided to replicate the measurements. It led us to only use the pairs of chickens for which we had enough serum: 3 pairs of females met this criterion. The three cytokines have been measured using Western Blot Analyses.

From each serum sample, 8 $\mu$ l was taken and added to 32 $\mu$ l of denaturing solution (mother solution: 0.37ml  $\beta$ -Mercaptoethanol, 4.0ml distilled water, 1.0ml Tris HCL pH 6.8, 0.8ml glycerol, 1.8ml SDS 10%). After 4 minutes in 100°C water, these samples were subjected to 12% SDS-PAGE carried out at 140 V (constant voltage) during 60 minutes at room temperature. Proteins were then electro-transferred onto 0.20 mm nitrocellulose membrane (Amersham International, UK), at 250 mA (constant current) during 50 minutes at room temperature (ice cube conjugated). Those two steps were performed using a Bio-Rad Cell System. The membrane was blocked with a solution comprising washing solution (PBS and Tween20 at 0.1%) made of 6% fat-free milk, for 60 minutes at room temperature (constant shacking, 60rpm). The membrane was then incubated overnight at +4°C with the primary antibody (constant shacking, 60rpm). We used a 1/400 dilution for all primary antibodies (IL1 $\beta$ , IFN $\gamma$ , IL6; Serotec Ltd, Kidlington, Oxford, UK). After rinsing 3 times (5, 10 and 15 minutes in the washing solution), HRP conjugated secondary antibody was used (Sheep anti rabbit, dilution 1/6000, Serotec Ltd, Kidlington, Oxford, UK) for 60 minutes at room temperature (constant shacking, 60rpm). Membranes were then washed 3x10 minutes, plus 30 minutes in the washing solution. The immunolabelled bands were identified by fluorography on Hyperfilm (Amersham International, UK), using ECL detection reagents (Pierce Biotech, Rockford, IL, USA). Films were exposed for 3 minutes. We looked for band intensities for the 3 studied proteins at respective known molecular weight: 29kDa, 27kDa and 18kDa for IL1 $\beta$ , IL6 and IFN $\gamma$ ; respectively. Band intensities from Western Blot analyses were quantified by densitometry and expressed as mean area density using Quantify one 4.1.1 software (GeneTools).

### ***Experiment timeline***

The experimental design and its timeline are summarized in figure 3. The chickens enrolled in the study were blood sampled for the first time on being still with their flock. Including it, a total of four samples were collected for each bird, every each hour. The first sample was noted T0 and the 3 followings T1, T2 and T3. Those samples were obtained respectively 1, 2 and 3 hours after introduction in the testing box.

### ***Statistical analysis***

In this study, the experimental unit is chicken. Even if we choose a week based treatment, our study is acceptable for the principle parameter (GC) and the secondary parameter (HLR). Concerning cytokines, because of the versatility of the gels used in the electrophoresis for their evaluation, experimental design is different: we have paired chickens of the same sex, but different treatments on the same gel. The data have been collected as Excel® files. The management of missing data has been made by excluding it from the analysis while abnormal data have been deleted from analysis. Data were assumed to reach normal distribution and have homogenous variances. Because we were capable to analyze only few samples for cytokine measurements, we assumed the effective should be small and thus we controlled normality and variances for those secondary parameters. Data related to the main parameter GC have been analyzed thanks to Repeated Measured ANOVA model with two between-subjects factors (Treatment and Sex). In case of significance for between-subject factors we used a Student-Newman-Keuls Test for pairwise comparisons. The secondary parameter HLR has been analyzed with a two-way ANOVA model (Treatment and Sex) at T0 and T3. The other secondary parameters (IL1 $\beta$ , IL6 and IFN $\gamma$ ) were analyzed using paired-t-Test for T0, T1, T2 and T3. Data were examined using Statistica 5.0 software (Statsoft). Significance was expressed as at least  $p < .05$ .

## **RESULTS**

### ***Preliminary observations***

24 chickens were enrolled in the study, but due to haemolysis in blood samples from 6 between the chickens (5 in control and 1 in MHUSA group) we just had GC data from 18 chickens. One chicken from the control group died during the experiment leading us to measure HLR on 23 chickens. Taking in account the remaining amount of serum after measuring GC and the amount of material for measuring cytokines which was accessible to us, we were just capable to use 3 pairs of chickens (6 females) for measuring cytokines levels. Since the population used in measuring cytokines is less than 10 individuals, we have verified the distribution was Gaussian and the variances homogenous. Chickens from the two groups were comparable at T0 since there was no significant difference between the two groups regarding the principle parameter GC and the secondary parameters HLR and cytokines (figures 4, 5, 7, 8 and 9).

### ***Treatment release***

During the whole treatment period (10 hours for each group), on weighting the blocks we measured a weight loss of 15.2% for the control and 12.8% for MHUSA. Taking in account the rate of active substance in the MHUSA blocks, 0.2g of MHUSA have been diffused during the whole testing period for the chickens from treatment group A.

### ***Main parameter GC***

ANOVA within subjects shows a very highly significant influence of Time on GC (table 1). There is no significant effect for the interaction between Time\*Sex; Time\*Treatment or Time\*Sex\*Treatment (table 1). Both the treatment and control group show a significant variation of GC during the different steps of the test and this variation show same pattern for both groups. We did not measure any significant difference between males and females for the principle parameter GC even if the p value ( $p = .0602$ ) could lead to conclude to a tendency (table 2). The sex does not influence the treatment effect which appears to be significant (table 2), allowing us to compare the two treatments using the Student-Newman-Keuls Test for pairwise comparisons. There is a significant treatment effect for GC at T1 ( $p < .05$ ), T2 ( $p < .05$ ) and T3 ( $p < .05$ ). The HPA activation during the test (after T0) appears to be always lower in the MHUSA group when compared to the control (figure 4).

### ***Secondary parameters***

At T3, the ANOVA analysis for the secondary parameter HLR does not show any significant influence of the sex on the evolution of this parameter neither any influence of the sex on the treatment effect (table 3 and 4). There is a very highly significant treatment effect for HLR at T3 (table 4). HLR measured at T3 is very highly significantly lower in the MHUSA group when compared to the control group (figure 5). Band intensities were detected for the 3 studied proteins from Western Blot analyses, (see example in figure 6). We observed a treatment effect at T2 for IFN $\gamma$  (MHUSA < Control,  $p < .05$ ) and at T1 for IL6 (MHUSA < Control,  $p < .05$ ), while all other comparisons were not significant, at any time (figures 7, 8 and 9).

## **DISCUSSION**

Our results confirm that the cumulation of handling, novelty and social isolation induces stress-related reactions as shown by the variation of both HPA and immune indicators within 180min (e.g. GC and HLR variations from T0 to T3). GC and HLR increase between T0 and T3, indicating an activation of the HPA and immune systems as described in birds by different authors (Puvaldopirod and Thaxton, 2000; Zulkifli et al., 2000; Saito et al., 2005). These results are in accordance with the variations measured in IL6 and IFN $\gamma$ , both known for being present at a higher level in the serum of stressed birds (Wigley and Kaiser, 2003; Calcagni and Elenkov, 2006) and mammals (Maes et al., 1993; Maes et al., 1995). Differences between the two treatment groups for cytokines were found to be

significant. The lower variation of the indicators, as observed during exposure to this stressing situation in the MHUSA treated group, are also in accordance with previous results using the same semiochemical (Madec et al., 2006 ; Madec et al., 2008a; ; Madec et al., 2008b). In presence of this maternal odorous stimulus, chickens experiencing a situation inducing acute stress, show a milder reaction characterised by a modulation of the HPA and immune response. The kinetics of the activation of the HPA and immune systems in our experiment is in accordance with the literature for some parameters but shows also some difference. The HPA activation, evaluated by measuring GC, is observed as early as 120min post stress, which is similar to published references (Puvaldopirod and Thaxton, 2000). As the relationship between HPA activation, elevated HLR and elevated cytokines production has been established (Nakamura, 1998; Wigley and Kaiser, 2003), our results seem realistic. The controversy could lie in the time elapsing before measuring a difference in the pro-inflammatory interleukines blood level. A significant elevation of mRNA levels of both IL1 $\beta$  and IFN $\gamma$  after 180 minutes is reported in a published study using stimulation by injection of LPS to chickens of highly sensitive lines (Leshchinsky and Klasing, 2001). Other authors, using *Salmonella enterica serovar typhimurium* as stressor, observed a first variation 360 min following infection (Whitanage et al., 2004). Such differences among results could be due to the nature of the stressor, which was mostly viral and bacterial infection in the cited works, different from our stressing challenge. The increase in IL6 during our test and the significant difference between treatments seems in accordance with results obtained in humans experiencing stressing events (Maes et al., 1993; Maes et al., 1995). Nevertheless, it has been shown that, in mammals, IL6 peaks before GC (Chamanza et al., 1999), which seems to be realistic regarding our results from which we observed that both IL6 and GC increased in the Control group as early as T1. In our experiment, MHUSA seems to influence production of cytokines IFN $\gamma$  and IL6 which are known to be linked to GC production and influenced under stress (Weigley and Keiser, 2003 ; Calcagni and Elenkov, 2006). Thus, the fact that we observed some significant differences for IFN $\gamma$  and IL6, analyzing three pairs, represents a good hope for future analyses. Some authors (Franchini et al., 2004) suggested that cytokines activated by acute stress in vivo could contribute to restore immunological homeostasis and influence thymic glucocorticoid-mediated functions. These finding are of interest regarding stressing environment of industrially housed birds. Indeed, stress and health are known to be linked and it is suggested that under particular conditions, stress hormones may facilitate inflammation, through induction of cytokines (Calcagni and Elenkov, 2006). Modern chicken production leads to mortality due to a greater susceptibility to infectious diseases (Stern et al., 1995; Shapiro et al., 1998). Our results show a specific reaction from birds under the mother odour analogue, the chickens from the treated group show significant differences with the control group regarding their HPA and immune activation in a stressful situation. Kanitz et al. (2003) observed behavioural, neuroendocrine and immunological consequences in isolated piglets. This work is similar to our in the way there was also a significant increase of interleukin and corticosteroids concentration and a decrease of lymphocyte in isolated (stressed) piglets compared to Controls. Authors concluded that not only the activity of the HPA system was influenced, but also the immune-brain circuitry, with possible negative consequences in health and welfare. In human, it has been shown that crying babies stopped crying when they were presented a mother's odour, other than their own (Sullivan and Toubas, 1998).The influence of odorous stimuli on the emotional and immune reactions has been demonstrated in rodents and some other species including humans (Shibita et al., 1990; Komori et al., 1995; Hosoi and Tsuchiya, 2000). Olfactory stimuli like citralva (3,7-dimethyl-2,6-octadienenitrile), a terpenoid known to be one of the most potent odorous stimulants, have shown to suppress hypersensitive cutaneous reaction to 2,4,6-trinitrochlorobenzene in C57BL/6 mice (Hosoi and Tsuchiya, 2000). This biological effect appears to be mediated by an acute release of glucocorticoids that will act as antagonists to the hypersensitive immune reaction. This observation deeply differs from our results on different points. The first and most important difference is related

to the HPA response: in our stress-eliciting test, MHUSA tested chickens show a significantly lower GC blood level. The second interesting point is the difference between MHUSA and citralva regarding their chemical nature and olfactory characteristic. The synthetic product used in our trial, as well as the native one (Pageat, 2002), are made of a mixture of methyl-esters from fatty acids which are not identified as highly stimulating odorous compounds. The origin of the secretion (mother-hens' uropygial glands), its chemical compounds (esters of fatty acids) and its effects on HPA activation in stressing conditions, make this odorous stimulus very similar to the maternal appeasing pheromones described in mammals and especially to the Pig Appeasing Pheromone PAP (Kooni et al., 2005). According to published data, adult sows experiencing a social stress (meeting a novel conspecific of the same age), in a surrounding previously sprayed with a 2% solution of PAP, displayed less aggressive reactions and moreover shown a significantly ( $p=0.05$ ) lower salivary cortisol level when compared to a control group experiencing the same stress in a surrounding treated with a control product. In our study, the birds had never been in contact neither with their mother nor with MHUSA, either before or after birth. Chickens, in modern poultry farms, are obtained through a process which is fully controlled by humans and has nothing to do with the natural life cycle of animals. The hens are artificially fecondated, they are not allowed to sit on and the eggs are incubated in an incubator where the chicks will hatch before being transferred to the farm where they will grow before being slaughtered. During such a life-cycle, they will never have any opportunity to be in touch with their mothers and attach to her. The effectiveness of a maternal odorous secretion in such naive birds, leads us to conclude that this secretion has innate and specific effects which look like those described with pheromones in other species (Schaal et al., 2003). In mammals, chemical communication plays a major role in the relationship between mother and offspring (McGlone and Anderson, 2002; Pageat and Gaultier, 2003). The stimulations provided by the mother, her protecting and nursing function and the chemical signals she releases, influence the development of the HPA and immune systems (Shanks and Lightman, 2001). Between the different stimuli, the pheromones could play a specific role in this development and regulation thanks to the direct activation of limbic and hypothalamic neurones through the main olfactory and accessory-olfactory pathway (Takami, 2002; Brennan and Zufall, 2006). Poultry, produced in the current industrial way, are an excellent model for studying the consequences of maternal deprivation and the effectiveness of different strategies shaped for supplying this lack in order to prevent its medical and economical consequences.

## ACKNOWLEDGEMENTS

Authors thank NGN unit of INRA-Tournefeuille for welcoming us and providing access to their facilities for performing Western Blot analyses. We also thank Professor Brigitte Siliart from LDH, Veterinary Faculty of Nantes (France) for technical assistance in measuring GC and HLR.

## REFERENCES

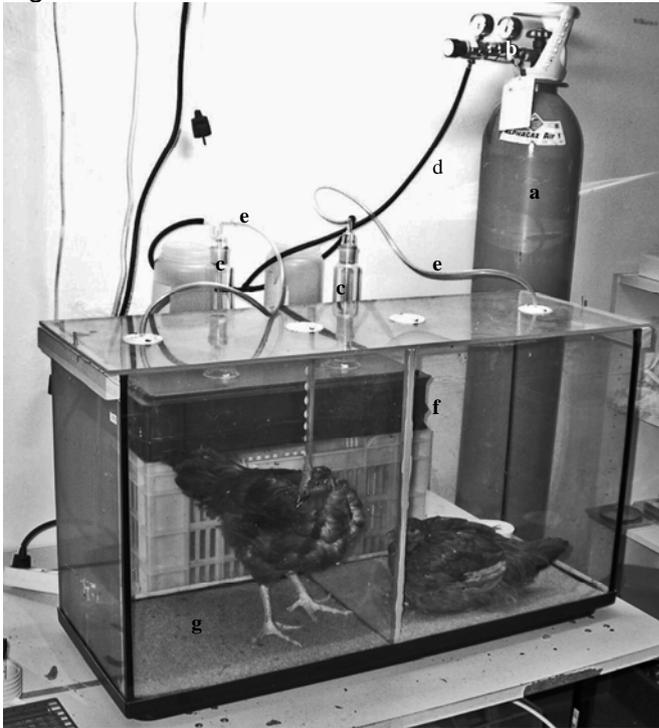
- Aguilera, G., Kiss, A., Liu, Y., Kamitakahara, A. 2007. Negative regulation of corticotropin releasing factor expression and limitation of stress response. *Stress* 10, 153-161.
- Bandyopadhyay, A., Deadiraki, H., Ranjit, M., Bhattacharyya, S.P. 1990. Adrenocortical influence on histokinetics and lipid components of uropygial gland of immature chick. *Indian J. Exp. Biol.* 28, 915-919.
- Brennan, P.A., Zufall, F. 2006. Pheromonal communication in vertebrates. *Nature* 444, 308-315.
- Calcagni, E., Elenkov, I. 2006. Stress system activity, innate and T helper cytokines, and susceptibility to immune-related disease. *Ann. N. Y. Acad. Sc.* 1069, 62-76.

- Campo, J.L., Gil, M.G., Davila, S.G., Munoz, I. 2005. Influence of perches and footpath dermatitis on tonic immobility and heterophil to lymphocyte ratio of chickens. *Poult. Sc.* 84, 1004-1009.
- Chamanza, R., van Veen, L., Tivapasi, M., Toussaint, M.J.M. 1999. Acute phase proteins in the domestic fowl. *World Poult. Sc. J.*, 55 61-71.
- Clark L., Smeraski, C. 1990. Seasonal shifts in odor acuity by starlings. *J. Exp. Zool.* 255, 22-29.
- Collette, J.C., Millam, J.R., Klasing, K.C., Wakenell, P.S. 2000. Neonatal handling of Amazon parrots alters the stress response and immune function. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 66, 335-349.
- De Jong, I.C., van Voorst, A., Erkens, J.H., Ehhardt, D.A., Blokhuis, H.J. 2001. Determination of the circadian rhythm in plasma corticosterone and catecholamine concentrations in growing broilers breeders using intravenous cannulations. *Physiol. Behav.* 74, 299-304.
- Falewee, C., Gaultier, E., Lafont, C., Bougrat, L., Pageat, P., 2006. Effect of a synthetic equine maternal pheromone during a controlled fear-eliciting situation. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 101, 144-153.
- Franchini A., Marchesini E., Ottaviani E. 2004. Corticosterone 21-acetate in vivo induces acute stress in chicken thymus: cell proliferation, apoptosis and cytokine responses. *Histol. Histopathol.* 19, 693-699.
- Gaultier, E., Vienet-Legu , D., Falewee, C., Bonnafous, L., Bougrat, L., Lafont, C., Pageat, P. Efficacy of Dog Appeasing Pheromone in reducing stress related behaviours in newly adopted puppies (*Canis familiaris*). *Vet. Record*, Accepted Paper.
- G th, A., Evans, C.S. 2004. Social responses without early experience: Australian brush-turkey chicks use specific visual cues to aggregate with conspecifics. *J. Exp. Biology* 207: 2199-2208.
- Gruss, M., Braun, K. 1996. Stimulus-evoked increase of glutamate in the mediorostral neostriatum/hyperstriatum ventrale of domestic chick after auditory filial imprinting: an in vivo microdialysis study. *J. Neurochem.* 66, 1167-1173.
- Gruss M, Braun K. 1997. Distinct activation of monoaminergic pathways in chick brain in relation to auditory imprinting and stressful situations: a microdialysis study. *Neuros.* 76, 891-899.
- Hosoi, J, Tsuchiya, T. 2000. Regulation of cutaneous allergic reaction by odorant inhalation. *J. Invest. Dermatol.* 114, 541-544.
- Kanitz, E., Tuchscherer, M., Puppe, B., Tuchscherer, A., Stabenow, B. 2003. Consequences of repeated early isolation in domestic piglets (*Sus scrofa*) on their behavioural, neuroendocrine, and immunological responses. *Brain Behav. Immun.* 18, 35-45.
- Komori, T., Fujiwara, R., Tanida, M., Nomura, J., Yokoyama, M. 1995. Effects of citrus fragrance on immune function and depressive states. *Neuroimmunomodulation* 2, 174-180.
- Kooni, M., Yonezawa, T., Kikusui, T., Stafford, K., Pageat, P., Mori, Y. 2005. Synthetic pig appeasing pheromone relieves agonistic stress in adult female pigs. In: Kusunose, K., Shusuke, S. Ed. *Proceedings of the 39<sup>th</sup> International Congress of the ISAE*, Kanagawa, Japan: ISAE Pub., 132.
- Lalloue, F.L., Ayer-Le lievre, C.S., Sicard, G. 2003. Analyses of the functional maturation of olfactory neurons in chicks before and after birth. *Chem. Senses* 28, 729-737.
- Leshchinsky, T.V., Klasing, K.C. 2001. Divergence of the inflammatory response in two types of chickens. *Dev. Comp. Immunol.* 25, 629-638.
- Levine E., landsberg G., Horwitz D., Duxburry M., Mertens P., Meyer K., Radosta-Huntley L., Reich M. Willard J. (Eds.) *Current issues and research in veterinary behavioral medicine*. Purdue University Press, West Lafayette, p 78-81.

- Liu D., Diodio J., Tannenbaum B., Caldji C., Francis D., Freedman A., Sharma S., Pearson D., Plotsky P.M., Meaney M.J. 1997. Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *Science*. 277, 1659-1662.
- Lucas, A.M., Jamroz, C. 1961. Atlas of avian hematology. Agriculture Monograph 25, USDA, Washington DC.
- Mabayo, R.T., Okumura, J.I., Hirao, A., Sugita, S., Sugahara, K., Furuse, M. 1996. The role of olfaction in oil preference in the chicken. *Physiol. Behav.* 59, 1185-1188.
- Madec, I., Saffray, D., Gabarrou, J.F., Lafont, C., Bougrat, L., Gigante, J., Pageat, P. 2005. Comparison of the behaviour of three groups of chickens during their growth. In Mills D., Madec, I., Pageat, P., Bougrat, L., Saffray, D., Falewee, C., Gervasoni, M.A., Bollart, A., Gabarrou, J.F. 2006. Influence of a semiochemical analogue on growing performances and meat quality of broilers. *Poult. Sci.* 85, 2112-2116.
- Madec, I., Gabarrou, J.F., Guillaume, D., Bougrat, L., Pageat, P. 2008a. Are 35 days enough to observe a reduction of stress by using a hen's semiochemical analogue on chickens (*Gallus gallus domesticus*) housed under high density? *Poult. Sci.* 87, 222-225.
- Madec, I., Pageat, P., Bougrat, L., Lecuelle-Lafont, C., Saffray, D., Falewee, C., Bollard, A., Chabrol, P., Gabarrou, J.F. 2008b. Influence of a preen gland secretion on growth and meat quality of heavy broilers. *Animal* 2(4): 631-635.
- Maes, M., Bosmans, E., Meltzer, H.Y. 1995. Immunoendocrine aspects of major depression. Relationships between plasma interleukin-6 and soluble interleukin-2 receptor, prolactin and cortisol. *Eur. Arch. Psychiatry. Clin. Neurosci.* 245, 172-178.
- Maes, M., Scharpe, S., Meltze, H.Y., Bosmans, E., Suy, E., Calabrese, J., Cosyns P. 1993. Relationships between interleukin-6 activity, acute phase proteins, and function of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in severe depression. *Psychiatry Res.* 49, 11-27.
- Martin, J.T. 1978. Embryonic Pituitary Adrenal Axis, behavior development and domestication in birds. *Amer. Zool.* 18, 489-499.
- McGlone, J.J., Anderson, D.L. 2002. Synthetic maternal pheromone stimulates feeding behavior and weight gain in weaned pigs. *J. Anim. Sci.* 80, 3179-3183.
- Nakamura K., Mitral Y., Yoshioka M., Koizumi N., Shibahara T., Nakajima Y. 1998. Serum levels of interleukin-6, alpha-1acid glycoprotein, and corticosterone in two week old chickens inoculated with escherichia coli lipopolysaccharide. *Poult. Sc.* 77, 908-911.
- Pageat, P., Gaultier, E. 2003. Current research in canine and feline pheromones. *Vet. Clin. Small Anim.* 33, 187-211.
- Pageat, P. 2002. Avian appeasing pheromones to decrease stress, anxiety and aggressiveness. US Patent 60/389,768.
- Post J., Rebel, M.J., ter Huurne, A.A.H.H. 2003. Physiological effects of elevated plasma corticosterone concentrations in broiler chickens. An alternative means by which to assess the physiological effects of stress. *Poult. Sc.* 82, 1313-1318.
- Puvadolpirod, S., Thaxton, J.P. 2000. Model of physiological stress in chickens. 2. Dosimetry of adrenocorticotropin. *Poult. Sc.* 79, 370-376.
- Rosenfeld P., Suchecki D., Levine S. 1992. Multifactorial regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis during development. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 16, 553-568.
- Saito, S., Tachibana, T., Choi, Y.H., Furuse, M. 2005. ICV CRF and isolation stress differentially enhance plasma Corticosterone concentration in layer and meat type neonatal chicks. *Comp. Biochem. Physiol.* 141, 305-309.
- Samson, J., Sheeladevi, R., Ravindran, R., Senthilvelan, M. 2007. Stress response in rat brain after different durations of noise exposure. *Neurosci. Res.* 57, 143-147.
- Shanks, N., Lightman, S.L. 2001. The maternal-neonatal neuro-immune interface: are there long-term implications for inflammatory or stress-related disease? *J. Clin. Invest.* 108, 1567-1573.
- Schaal, B., Coureaud, G., Langlois, D., Ginies, C., Semon, E., Perrier, G. 2003. Chemical and behavioural characterization of the rabbit mammary pheromone. *Nature* 424, 68-72.

- Shapiro, F., Nir, I., Heller, D. 1998. Stunting syndrome in broilers: effect of stunting syndrome inoculum obtained from stunting syndrome affected broilers, on broilers, leghorns and turkey poults. *Poult. Sc.* 77, 230-236.
- Schnabel, R., Braun, K. 1996. Development of dopamine receptors in the forebrain of the domestic chick in relation to auditory imprinting. An autoradiographic study. *Brain Res.* 720, 120-130.
- Shibata, H., Fujiwara, R., Iwamoto, M., Matsuoka, H., Yokoyama, M. 1990. Recovery of PFC in mice exposed to high pressure stress by olfactory stimulation with fragrance. *Intern. J. Neurosc.* 51, 245-247.
- Stern, N.J., Clavero, M.R.S, Baile, J.S., Cox, N.A, Robach, M.C. 1995. *Campylobacter* spp in broilers on the farm and after transport. *Poult. Sc.* 74, 937-941.
- Sullivan, R.M., Toubas, P. 1998. Clinical usefulness of maternal odor in newborns: soothing and feeding preparatory responses. *Biol. Neonate* 74, 402-408.
- Takami, S. 2002. Recent progress in the neurobiology of the vomeronasal organ. *Microsc. Res. Tech.* 58, 228-250.
- Vleck, C.M., Vertalino, N., Vleck, D., Butcher, T.L. 2000. Corticosterone and heterophil to lymphocyte ratios in free living Adelie penguins. *The Condor* 102, 392-400.
- Wigley, P., Kaiser, P. 2003. Avian cytokines in health and disease. *Braz. J. Poult. Sc.* 5, 1-14.
- Withanage, G.S.K., Kaiser, P., Wigley, P., Powers, C., Mastroeni, P., Brooks, H., Barrow, P., Smith, A., Maskell, D., McConnell, I. 2004. Rapid expression of chemokines and proinflammatory cytokines in newly hatched chickens infected with salmonella enterica serovar typhimurium. *Infect. Immun.* 72, 2152-2159.
- Worlein J.M., Laudenslager M.L. 2001. Effects of early rearing experiences and social interactions on immune function in nonhuman primates. In: Ader R., Felten D.L., Cohen N. (Eds.) *Psychoneuroimmunology*. 3<sup>rd</sup> edition. Academic Press, San Diego, Volume 2, pp. 73-85.
- Zulkifli, I., Che Norma, M.T., Chong, C.H., Loh, T.C. 2000. Heterophil to lymphocyte ratio and tonic immobility reactions to preslaughter handling in broiler chickens treated with ascorbic acid. *Poult. Sci.* 79, 402-406.
- Zulkifli, I., Gilbert J., Liew, P.K., Ginsos, J. 2002. The effects of regular visual contact with human beings on fear, stress, antibody and growth responses in broiler chickens. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 79, 103-112.

Figure 1. The test.



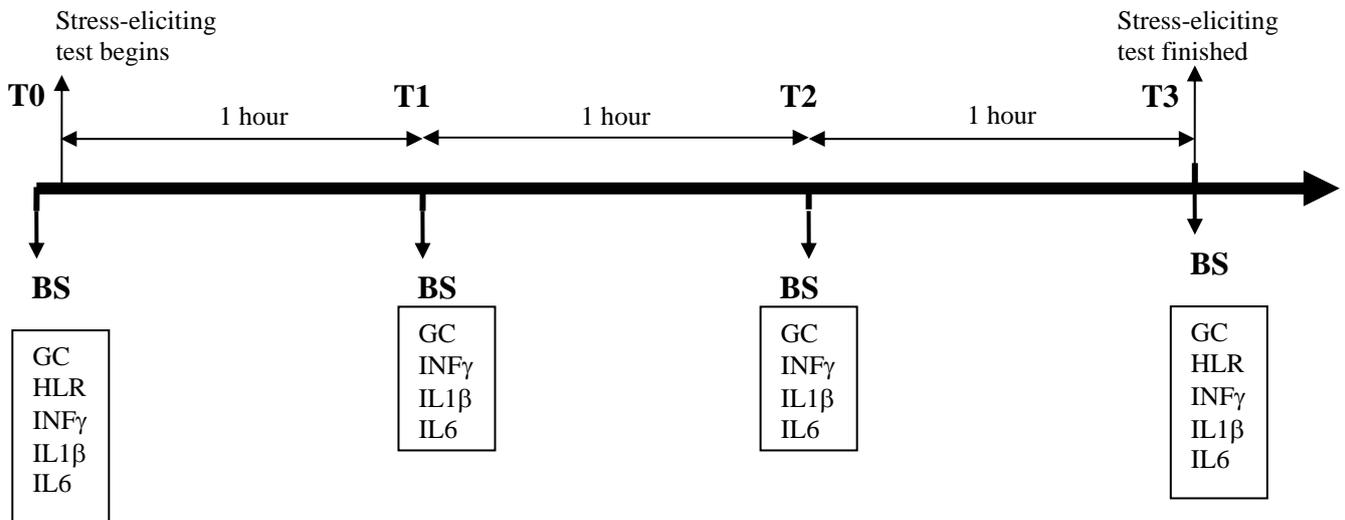
a: bottle of air ; b: regulator ; c: bottles containing the treatment ; d: pipe driving the air from the gas bottle ; e: pipe driving the air from the bottle containing the treatment ; f: testing box; g: cork removable ground.

Figure 2: The way the treatment was delivered.



a: pipe driving the air from the gas bottle to the bottle containing the treatment ; b: pipe leading the air charged with the treatment to the test box ; c: bottle containing the treatment; d: the blocks (treatment and control) are divided in pieces ; e: test box.

Figure 3. Timeline of the experimental design.



BS: Blood Sampling ; T0, T1, T2, T3: milestones of the experiment.  
 In square boxes: blood parameters: GC: corticosterone ; HLR: Heterophil to Lymphocyte Ratio ;  $INF\gamma$  : Gamma Interferon ;  $IL1\beta$  : Interleukin 1  $\beta$  ; IL6 : Interleukin 6.

Table 1. Effects within-subjects for GC (corticosterone).

	F value	df	p value	significance
Time	9.68	3	<0.0001	***
Time*Sex	0.22	3	0.8840	NS
Time*Treatment	1.54	3	0.2175	NS
Time*Sex*Treatment	1.00	3	0.4009	NS

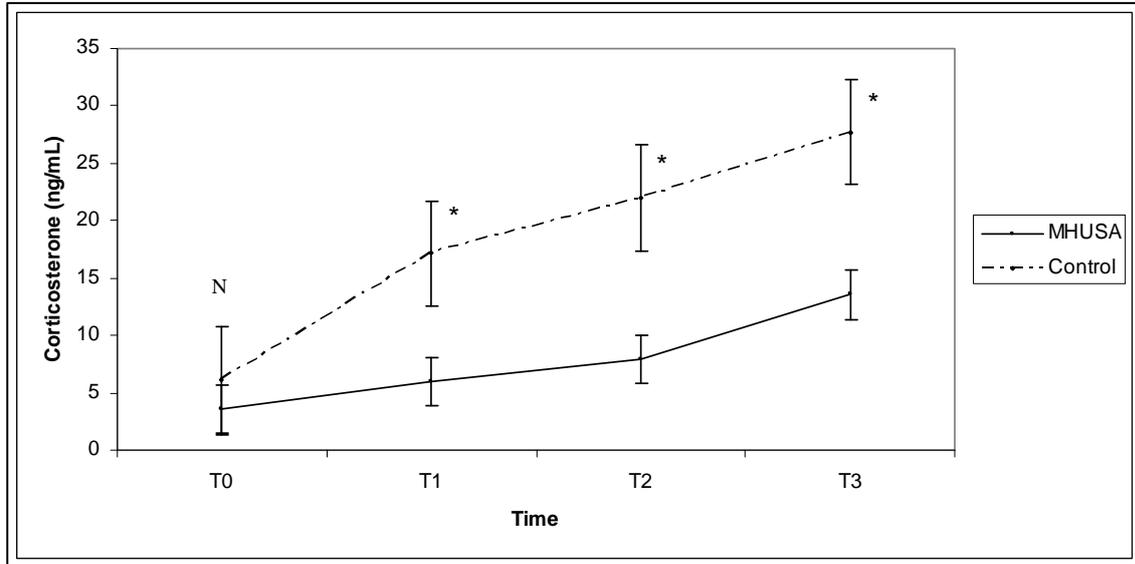
NS: non significant. \*\*\* : very highly significant ( $p < .001$ )

Table 2. Effects between-subjects for GC.

	F value	df	p value	significance
Sex	4.18	1	0.0602	NS
Treatment	8.83	1	0.0101	*
Sex*Treatment	1.04	1	0.3260	NS

NS: non significant. \* : significant ( $p < .05$ )

Figure 4. Evolution of GC during the test for each treatment group.



T0: blood sample obtained before test; T1, T2, and T3: blood samples obtained every hour, during 3 hours of testing session. Error bars= Standard Mean Error.

\*:  $p < .05$  ; NS: non significant.

Table 3. HLR at T0: Two-way ANOVA.

Control		MHUSA		Significance		
Males (n=6)	Females (n=6)	Males (n=6)	Females (n=6)	Sex	Treatment	Sex*Treatment
0.18 ± 0.10	0.17 ± 0.06	0.10 ± 0.02	0.20 ± 0.08	F=2.55 ; p=.1257 NS	F=0.64 ; p=.4337 NS	F=3.77 ; P=.0666 NS

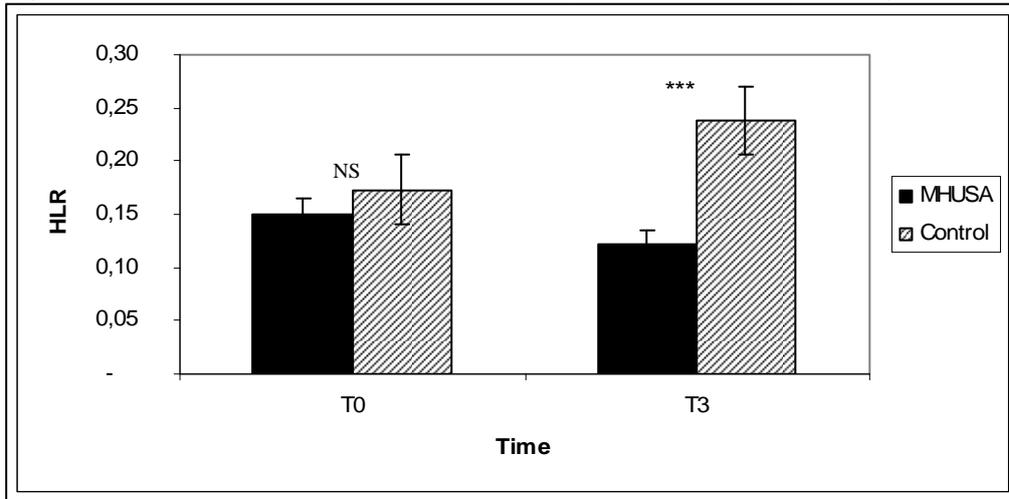
NS: non significant. Data are shown mean ± SD

Table 4. HLR at T3: Two-way ANOVA.

Control		MHUSA		Significance		
Males (n=6)	Females (n=5)	Males (n=6)	Females (n=6)	Sex	Treatment	Sex*Treatment
0.21 ± 0.08	0.27 ± 0.11	0.10 ± 0.03	0.14 ± 0.04	F=3.25 ; p=.0873 NS	F=17.34 ; p=.0005 ***	F=0.29 ; p=.5985 NS

NS: non significant. \*\*\*: very highly significant ( $p < .001$ ). Data are shown mean ± SD

Figure 5. Effect of MHUSA on Herophil:Lymphocyte Ratio depending on sampling time.



T0: blood sample obtained before test; T3: blood sample obtained after 3 hours of testing session. Error bars= Standard Mean Error. \*\*\*:  $p < .001$  ; NS: non significant.

Figure 6. Western Blot analyses for  $IFN\gamma$ . 20kDa detection spot is indicated by the arrow.

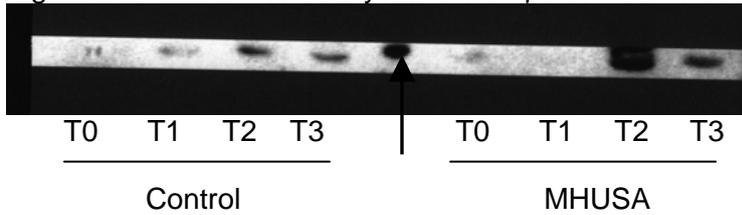
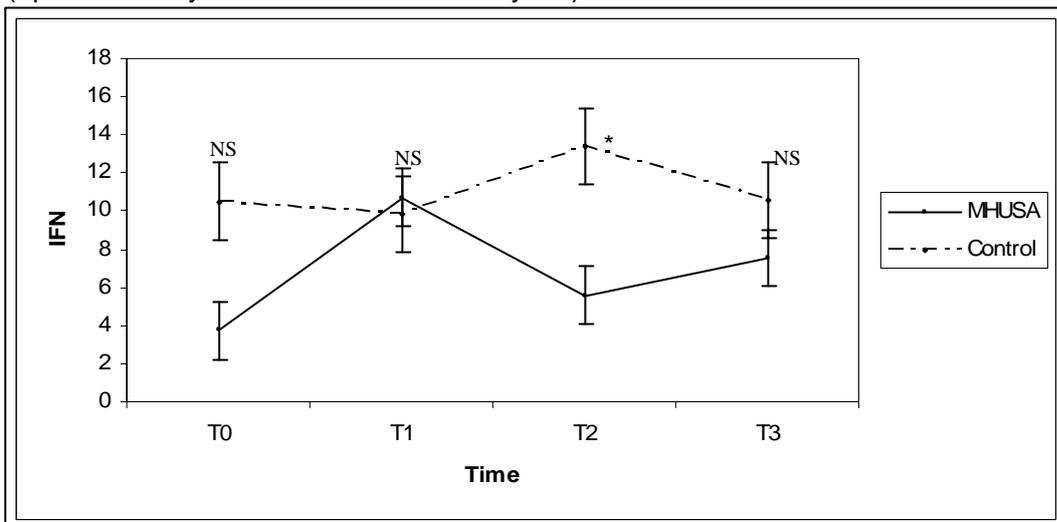
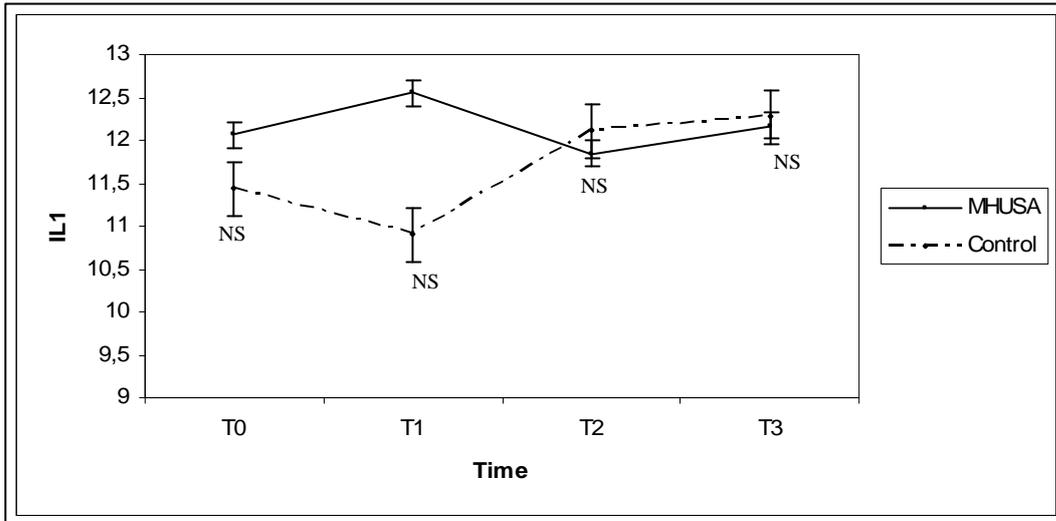


Figure 7. Effect of MHUSA on  $IFN\gamma$  level from blood samples depending on sampling time (optical density from Western Blot analyses).



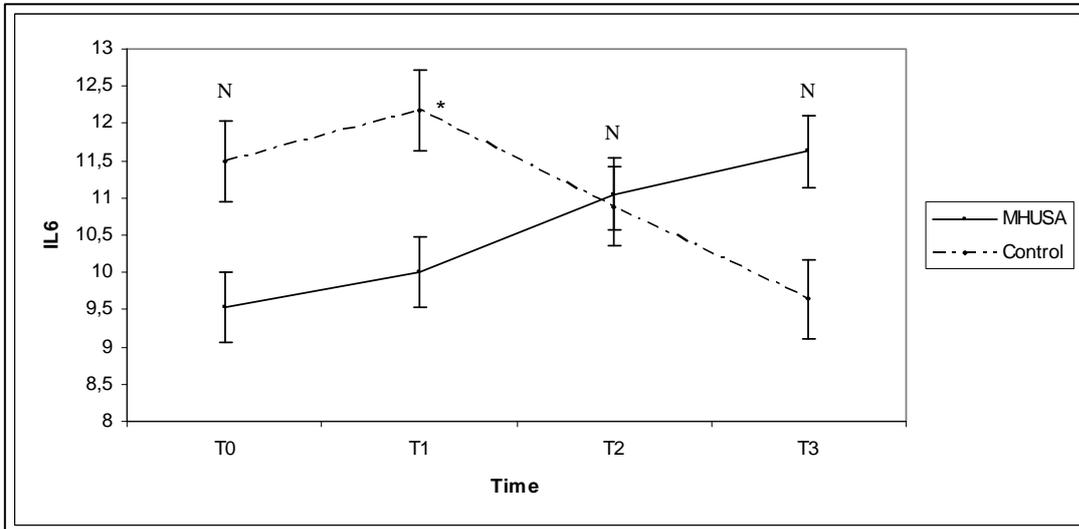
T0: blood sample obtained before test; T1, T2, and T3: blood samples obtained every hour, during 3 hours of testing session. Error bars= Standard Mean Error. \* :  $p < .05$  ; NS: non significant..

Figure 8. Effect of MHUSA on IL1 $\beta$  level from blood samples depending on sampling time (optical density from Western Blot analyses).



T0: blood sample obtained before test; T1, T2, and T3: blood samples obtained every hour, during 3 hours of testing session. Error bars= Standard Mean Error. NS: non significant.

Figure 9. Effect MHUSA on IL6 level from blood samples depending on sampling time (optical density from Western Blot analyses).



T0: blood sample obtained before test; T1, T2, and T3: blood samples obtained every hour, during 3 hours of testing session. Error bars= Standard Mean Error. \*:  $p < 0.05$  ; NS: non significant.

## 7. Essai en station n°3 : évolution comportementale du poulet en croissance

### 7.1. Type de communication et résumé

➤ Type de communication : ce travail a fait l'objet d'une communication orale publiée dans les *proceedings* du congrès de l'IBVM (5<sup>th</sup> International Behavioural and Veterinary Medicine, Minneapolis, USA, 78-81) - 2005

#### ➤ Résumé

Pour les espèces avicoles de rente, les tests de comportement classiquement retrouvés dans la littérature demandent trop d'investissement en temps. Cette expérimentation a été construite dans le but d'évaluer l'effet de différentes perturbations, dans différentes ambiances, sur le comportement de poulets.

Des poussins âgés d'un jour ont été introduits dans trois types d'atmosphère d'élevage différents : présence d'une mère adoptive (réelle ou postiche), présence d'une odeur rappelant la mère (HOA ou Hen's Odorant Analgue) et ambiance neutre. Chaque enclos accueillait 40 poussins. Les poussins sont tous de la même souche et sont tous arrivés le même jour. Dans B1 et B2, les poussins ont une mère et dans B3, rien (le tableau ci-dessous décrit les combinaisons possibles). Le ratio est de : une mère pour 10 poussins.

Enclos	OVC	OV	O	PVC	PV	P	V1	V2	T
Mère	+ postiche + chaleur	+ postiche		+ postiche + chaleur	+ postiche		vraie 1	vraie 2	
Traitement	Odeur maternelle			Placebo			Vraie poule		

O : doeur, V : visuel, P : placebo, V : vraie, T : témoin.

Deux fois par semaine, apparaît un événement : prédateur ou visiteur. Le comportement des poussins a été filmé. A la fin de l'expérimentation (au 38<sup>e</sup> jour) les poulets ont été pesés et le ratio hétérophiles/lymphocytes (HLR) mesuré.

Les données issues du bâtiment « vraie poule » n'ont pu être analysées pour cause de cannibalisme. Avant la troisième semaine, les poussins restent majoritairement dans une zone neutre, proche d'une source de chaleur. Passée cette période, l'influence de l'événement est visible : les poulets traités sous HOA semblent plus prompts à venir vers la mangeoire. Quand le prédateur est présent, les poulets ont des réactions de fuite alors que l'apparition du visiteur provoque un retrait des poulets vers la zone neutre. Les poulets sous HOA sont plus lourds en fin d'essai ( $p < 0,001$ ) et aucune différence n'est observée concernant HLR.

Ces résultats nous indiquent que des poules adultes ne semblent accepter des poussins que dans des conditions particulières. Ensuite, nous pouvons confirmer l'importance d'une source de chaleur. Les résultats obtenus montrent l'importance de l'environnement et des facteurs s'y rapportant. Il apparaît que HOA peut devenir un moyen pour étudier les liens entre différents paramètres physiologiques, de croissance et comportementaux.

**Mots clés** : poussin, analogue d'odeur maternelle, événement

## **7.2. Texte original de la communication**

### **Title: Comparison of the Behaviour of Three Groups of Chickens (*Gallus domesticus*) during Their Growth: Preliminary Results**

Authors: I. Madec<sup>1</sup>, D. Saffray<sup>1</sup>, J. F. Gabarrou<sup>2</sup>, C. Lafont<sup>1</sup>, L. Bougrat<sup>1</sup>, J. Gigante<sup>1</sup>, P. Pageat<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Phérosynthèse, Le Rieu Neuf, 84490 Saint Saturnin Les Apt, France

<sup>2</sup>ESA Purpan, 75 voie du TOEC, 31076 Toulouse, France

### **INTRODUCTION**

Understanding animals' behaviour is especially challenging in farm animals. Concerning poultry, the large number of individuals, prohibits the performance of specific observations. Classical behavioural tests are too time consuming (Campo *et al.* 2000). Our goal was to find a way to observe known consequences of different disturbances to conclude on a specific related range of behaviour. In this way, straightforward tests would be able to be performed by numerous persons (i.e. technicians, behaviourists, breeders). In poultry, two main ranges of behaviors are referenced. The first one is fear, characterised by immobility (Gallup 1977), and the second one is stress, characterized by several factors, such as the heterophil over lymphocyte ratio (HLR) (Puvaldolpried and Thaxton 2000). Because we believe that the management of farm animals is very different from birds in natural conditions (Dawkins *et al.* 2004) we introduced another kind of parameter, which was called "atmosphere" i.e. comparing natural conditions to classical rearing husbandries). To this aim, different treatments were compared: adoptive hens (fake or real) and putative maternal pheromone. This experiment was intended to study the relationship between physiological criterion and behavioural observations, in different atmospheres.

### **MATERIALS AND METHODS**

Three groups (in three separate, similar buildings) of chickens were bred. In each building, three crates were composed of 40 chicks each at a stocking density of 14 heads/m<sup>2</sup>. The first group (pheromone or P) and the second group (control or C) were bred the same way. In the first crate, we introduced four non mobile fake adult hens (named "mother") represented by soft plastic toys resembling lying hens. In the second crate, the same fake adult hens were provided, but they were warm. In the last crate, there was no mother. In each crate, a source of heat was provided (lights). Chicks were aged one day on the first day of the trial (noted D0). The third group (natural or N) was reared the same way compared to P and C, except for "mothers". In the first crate, commercial laying hens were introduced. In the second crate, we introduced hens considered as good adopting mothers ("negre soie"). In each of the three buildings, mothers (fake or real) stayed in crates from D0 to D15. We considered that one mother for 10 chicks represented what may be seen in natural adoptive conditions. Hens were introduced at the same moment as the chicks. Each week, two events happened on two different days: a "visitor" and a "predator". The "predator" consisted of a black flying object creating a shadow on the soil. The "visitor" consisted of an unknown person, wearing a white overall, a mask and a hat. Both events had been performed once a week to avoid habituation. Observations of animals were performed using one camera per crate. Both scan sampling and films were recorded. In each pen, one quarter of the area representing a Neutral Zone (or NZ) was not video taped. This neutral zone was also the area which contained the source of heat. Spatial localization of animals was observed twice: 5 minutes before and 5 minutes after the event. We focused on the reaction of the animals toward the event. On D8 and D38, 25 animals per crate were weighed individually. At the end of the batch, blood samples were

drawn for HLR measurements. Animals were examined for overall health status on arrival at D0 and weekly. In groups P and C, treatment consists of a saturation of the atmosphere (passive diffusion) using either a putative pheromone (named HOA for Hens Odorant Analogue) or a placebo. Treatment was blinded. HOA consists of an analogue of the natural secretion of a laying hen having chicks. It has been included in a manufactured slow release block weighing 75g and containing 2% HOA. Crates were named as shown in Table 1.

Table 1. Crate names depending on the treatment

Crate	PVH	PV	P	CVH	CV	C	NA	NL	N
Mother	Visual+heat	Visual	Heat	Visual+heat	Visual	Heat	Visual+heat	Visual	Heat
Treatment	pheromone			control			natural		

## RESULTS

Some data could not be adequately analyzed. First, the N building had to be removed from the study due to a significant number of injured chicks. Second, the data from the PVH crates could not be included in the study on D38 (except for video recordings). Scan samplings showed that chicks from C were close to the “mother” only if it was next to the feeder (one “mother” out of four). Before the third week, chicks spent most of the time in the NZ, except in CVH and PVH (more activity). From the period of approximately 21 days to the end, animals congregated in small groups (three to four individuals) resting or looking for a place to rest. More animals were showing feeding behaviour on the third week in the HOA building, regardless of which crate they were housed in (non statistical data). Animals’ reactions to events can be divided into two main categories: before and after the third week. Before this central point, animals were localised in the NZ, regardless of the event. From the third week to D38, chicks from HOA building were quicker to come to the feeder after the event (non statistical data). Within each building, no remarkable differences were observed during the visitor event. Animals went to the opposite crate side from the “visitor”. Chicks showed withdrawal reactions when the “predator” appeared (no building or crate effect). Chicks from all pens in the treated building had equivalent mean weights. We observed weight differences at D8 (CVH = CV < C, Student test,  $t = 2.31$ , 48 d.f.  $p < 0.05$ ). At D38, comparison between buildings showed higher live weights for animals under HOA (Wilcoxon test,  $z = 4.45$ , 148 d.f.  $p < 0.001$ ), whereas C was not different from P and CV weights were lower compare to PV weights (Wilcoxon test,  $z = 6.48$ , 48 d.f.,  $p < 0.001$ ). There was no difference in the HLR between buildings.

## DISCUSSION

It is commonly accepted that “negre soie” are adoptive mothers but scientific data describing this fact are lacking. Thus, we conclude that young chickens (of this breed) cannot be adopted by adults (from another breed) in such an environment. The failure of adoption may be due to several causes: high density (four supplementary adults per pen compared to other buildings), confined areas or high number of chicks per hen. The fact that CVH and PVH chicks looked more active is probably related to a heat effect. Observed weight differences at D8 are in accordance with the fact that chicks without HOA seem to be afraid of the toys. Results concerning animals’ spatial localization in C could mean that the desire to eat the food is greater than the fear of an unknown presence. The comparison of the buildings highlights the fact that characteristics of the crates (treatment and toys) are of importance. To improve our model, it would be interesting to work on several points. (1) Physiology: segregate the crates with regard to HLR and studying corticosterone levels (Post *et al.* 2003). (2) Behaviour: avoid a NZ and consider both vocalizations, importance of predator’s eyes, and animals’ Tonic Immobility (Gallup 1977, Campo *et al.* 2000). (3) Studying correlation between parameters.

## CONCLUSION

It appears from our results that HOA could represent a useful tool to study links between easily observed and tabulated parameters and behaviour. The final objective of this work is to establish a correlation among all studied factors to have a straightforward behavioural approach by studying physiological and growth parameters.

## REFERENCES

- Campo J L, Garcia M, Gil M, Munoz I and M Alonso 2000 Relationship between bilateral asymmetry and tonic immobility reaction or heterophil to lymphocyte ratio in five breeds of chickens. *Poultry Science* 79: 453–459
- Dawkins M S Donnelly C A and Jones T A 2004 Chicken welfare is influenced more by housing conditions than by stocking density. *Nature* 427 pp. 342–344.
- Gallup G G 1977 Tonic Immobility: the role of fear and predation *Psychological Records* 1: 41–61
- Post J Rebel M J and ter Huurne A A H M 2003 Physiological effects of elevated plasma corticosterone concentrations in broiler chickens. An alternative means by which to assess the physiological effects of stress. *Poultry Science* 82: 1313–1318
- Puvaldolpriod S and Thaxton J P 2000 Model of physiological stress in chickens, response parameters *Poultry Science* 79: 363–369

## 8. Essai en station n°4 : peur et réactions comportementales

---

### 8.1. Type de communication et résumé

➤ Type de communication : ce travail a été soumis pour publication dans *Applied Animal Behaviour Science* (proposé le 19 mars 2008)

#### ➤ Résumé

Des poulets en croissance sont soumis durant six semaines à des événements ponctuels et standardisés. Leurs réactions vis-à-vis de ces derniers sont mesurées dans deux types de conditions. On compare en effet une atmosphère dans laquelle est diffusée le sémiochimique MHUSA à une atmosphère sous un placebo de ce dernier. Sur un total de 240 poussins âgés d'un jour en début d'essai, nous avons obtenu 1106 images. Celles-ci nous ont permis de spécifier le comportement de chaque poussin en fonction d'une grille de lecture préalablement établie et selon le moment d'observation par rapport à l'âge de l'animal et à l'événement proposé. Les poulets ont été confrontés à deux événements : un prédateur et un visiteur. Le prédateur consiste en une ombre portée au sol, effectuant des mouvements de va-et-vient et des battements d'ailes (durée : quatre minutes). Le visiteur est une personne inconnue qui reste immobile au centre de l'enclos de poussins durant deux minutes.

Des différences significatives entre les deux traitements ont été obtenues après l'apparition du prédateur. En effet, le prédateur entraîne moins de mouvements (paramètre principal) dans le groupe MHUSA par rapport au groupe placebo ( $p < 0,0001$ ). Nous constatons également moins d'interactions entre les animaux lorsqu'ils sont sous MHUSA ( $p < 0,05$ ) et que les poulets du groupe MHUSA ont tendance à moins rester allongés ( $p = 0,054$ ). En revanche, le prédateur n'a pas eu d'influence sur les comportements de substantation ou de station debout. Le visiteur n'induit pas de différences comportementales significatives entre les deux traitements. Enfin, les animaux sous MHUSA ont des poids vifs plus élevés sous MHUSA, à six semaines ( $p < 0,001$ ).

Nous émettons l'hypothèse que les poulets se sont habitués au visiteur mais que MHUSA influence les réactions de peur des poulets de façon innée, comme observé lorsqu'intervient le prédateur, qui semble représenter une menace suffisamment forte. Néanmoins, il semble que MHUSA ne soit pas capable de remplacer intégralement la mère, même si la réponse peut être qualifiée d'innée. Cela implique la mise en place d'investigations supplémentaires pour l'interprétation des comportements observés. MHUSA apparaît toutefois comme un outil intéressant pour la compréhension du rôle de la mère dans le développement du poussin.

**Mots clés:** odeur maternelle, peur, poussin, stress, événement, développement.

## **8.2. Texte original de la communication**

### **Title: Effects of a maternal odorant on innate fear response in domestic chickens (*Gallus gallus*)**

Authors: I. Madec<sup>1</sup>, J.F. Gabarrou<sup>2</sup>, E. Gaultier<sup>1</sup>, J. Bowen<sup>3</sup>, and P. Pageat<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Pherosynthese Research Institute, Le Rieu Neuf, 84490 Saint Saturnin Les Apt, France.

<sup>2</sup>EI Purpan – 75 voie du TOEC, BP 5761, 31076 Toulouse cedex 3, France.

<sup>3</sup>Department of Biomolecular Medicine, Imperial College London, U.K.

**ABSTRACT** The present experiment tested chicks' reactions to repeated exposure to standardized acute stressors over a 6-week period, either in the presence or absence of the putative semiochemical MHUSA. MHUSA has previously been shown to reduce stress in the chicken. A total of 240 chicks were reared in groups in an identical environment, with or without the addition of MHUSA, and their behaviour, growth and development were measured. Significant differences in behaviour were observed between the treatment groups with the repeated presentation of a simulated predator stimulus, but no difference was observed with repeated visits by an unknown person. We hypothesize that habituation reduced the emotional impact of the visitor stimulus, but that, being innately fear inducing, the predator stimulus was not subject to habituation. Birds reared in the presence of MHUSA moved significantly less when confronted by the predator stimulus than the control birds ( $p < 0.0001$ ). There were also significantly less interactions between birds reared in the presence of MHUSA ( $p < 0.05$ ), and less birds lying down ( $p = 0.054$ ) under MHUSA compared to control. Treatment did not have any significant influence on the number of birds showing eating or standing behaviour after occurrence of the predator. At 6 weeks of age, chickens under MHUSA were heavier compared to control ( $p < 0.001$ ). We conclude that chicks reared in an environment with MHUSA were less fearful, particularly in response to a non-habituating, fear-inducing predatory stimulus. The response to MHUSA was probably an innate one. However, further investigations are needed to fully interpret the behavioural response to MHUSA. MHUSA appears to be an interesting tool for understanding of the role of the hen in the development of the chick.

**Key words:** odorant, fear, chick, stress, event, development

## INTRODUCTION

In avian species, responses to stressors can be either learned (Currio et al., 1978) or innate (Goth, 2001), and birds are also often neophobic (Bouchard et al., 2007). As an example of an innate fear response in the domestic chicken (*Gallus gallus*), Freire et al. (2006) observed a strong, generalized fear reaction to an image of a hawk at its first presentation. Chicks are also able to acquire a fear of a potential threat that has been identified by the mother, showing that they will rely on her for protection and warning against danger. She also provides warning signals as well as signals that alleviate stress (Field et al., 2007). The absence of a relationship between the mother and the chick can thus have detrimental effects since she delivers signals which are essential to enable her chicks to cope with their surroundings (Richard-Yris and Leboucher, 1986 ; Wauters and Richard-Yris, 2002). Although the precise olfactory, visual and auditory sensory cues the chick responds to, and the manner in which its behaviour is altered in order to avoid threat remain unclear, it has been shown that the chick can learn about an aversive object (Johnston et al., 1998). Chicks that have not spent time with their mother and have therefore not learned the detailed aspects of how to respond to her communication may still show simplified, innate, responses to these stimuli. In previously published work, an analogue of a secretion from mother hens, denoted as MHUSA (Mother Hens' Uropygial Secretion Analogue) has shown its potential to reduce stress-related reactions in industrially raised chickens (Madec et al., 2006 ; Madec et al., 2008). The chemical composition of MHUSA follows a pattern comparable to that of some mammalian semiochemicals. In some mammalian species, such as the dog (Pageat and Gaultier, 2003), the pig (Mc Glone and Anderson, 2002), and the rat (Moltz and Leet, 1981), it has been described that the mother secretes substances that have a calming effect on the offspring. Moreover, Roden and Wechsler (1997) showed that there were broad ranging and significant differences in the behaviour of chicks when they were reared with or without the presence of a hen. There is evidence that olfaction is important in the behaviour of chicks, with chicks not only being able to find their own nipple according to its odour (Bonnadonna et al, 2004) but also being able to discriminate between odours (Roper and Marples, 1997). The readiness of broiler chickens to traverse a runway in order to reach conspecifics, indicating a need for aggregation, has been assessed through motivation to be next to them after exposure to a stressor (Vallortigara et al., 1990). Thus it is of interest to observe chicks' response to threat when their environment is perfused with MHUSA in the presence or absence of potential threat. As shown by Barnett and Hemsworth (1989), the presence of a person could be perceived either as a threat (handling) or as a source of improved welfare or opportunity (food). The threatening status of people is therefore equivocal and relies on learning (Henderson et al., 2001). Flying predators always represent a threat to chicks and chickens, and the fear response to stimuli of associated with such predators should not be subject to habituation or positive conditioned associations that might interfere with avoidance and defensive behaviours since this would adversely affect survival. In support of this, Palleroni et al. (2005) demonstrated that the appearance of a flying predator stimulus, regardless of its size, was always regarded as a threat. The present experiment investigates the behavioural responses of commercially raised naïve chicks to two types of threat, when they were reared in an environment treated with MHUSA or a placebo odour.

## MATERIALS AND METHODS

### ***Birds and housing conditions***

Batches of one day old chicks were introduced to two identical, contiguous houses (isolated thanks to two walls). In each house, groups of 40 chicks (20 males and 20

females) were placed in one of three rearing crates. A common broiler breed was used (ROSS PM3). Living conditions were as close as possible to those of typical commercial husbandry. Chicks used in the trial were obtained from a single breeding unit, and were one day old on the first day of the trial (noted D0). They had been vaccinated for Mareks, Gumborow and Newcastle diseases at the hatchery on the day prior arrival on site, in line with common disease control practise. Their health status was assessed upon arrival (D0) and then on a weekly basis during the 42 days of the trial. Birds were bred according to methods of breeding and collection from the 95/29/CE European convention. Each crate was 240cm x 120cm, with a concrete floor covered with straw. Ambient temperature and hygrometry were measured every day and maintained at levels typical of standard commercial conditions. For the first two weeks an additional source of heat was provided, in the form of an overhead infra-red lamp above each crate. Throughout the trial, artificial light was maintained on a 18L:6D pattern, with an illumination level of 120 lux. Stocking density at the end of trial was equivalent to approximately 25 kg/m<sup>2</sup> (14 heads/m<sup>2</sup>). Free access to food and fresh water was maintained, and checked daily. Feed type was identical for all crates. A common starter diet was fed from D0 to D17. From D18 to D24, all birds were provided a common grower diet, followed by a common finishing diet until slaughter.

### ***Experimental design***

Two different treatments were compared using a double blind procedure (all personnel involved in the trial were unaware which groups received placebo or MHUSA until the analysis was complete). As the treatment, the atmosphere of the crates was saturated with either MHUSA or a placebo of MHUSA (which acts as control) as described by Madec et al. (2006). Treatment of the crates, with MHUSA or placebo, began on the day prior to the arrival of the chicks (D-1). Each one of the two separate parts of the building received a different treatment. We choose this experimental design in order to avoid any transfer of the odour chemicals under test between the houses. In each crate a camera (CAMSET 13, Velleman©) was positioned so that the behaviour and location of individual chicks could be clearly recorded.

### ***Challenges***

To assess the potential impact of MHUSA, we choose to focus on the behaviour of birds after two standardised stressing events, each one of which being expected to have a different effect. The birds were exposed to two stress events each week, on separate days. Every Tuesday a specially dressed person visited the house, and on every Thursday the birds were exposed to a simulated predator stimulus. The predator stimulus consisted of a back-illuminated (20 watts) flying object that created a moving shadow on the ground 160cm below it (after Schleidt, 1961). This object was 60cm wide and 80cm long, was painted black and designed to create the appearance of a flying predator. During each test event the simulated predator flew back and forth at a constant speed for a total time of 240 seconds, whilst flapping its wings. The second stress event was a visit to the by an unfamiliar person (named the visitor). This person was dressed differently from the animal keepers, wearing a white overall, a mask and a hat. Keepers always wore blue overalls and did not wear a mask or hat. The visitor walked into the house and went to the centre of the crate, where he stood upright and motionless for 120 seconds. The visual aspect of a moving object seems to have more impact than a sound event (Bolhuis and Honey, 1994), and touch contact would be impossible to standardize in a group test. So, in order to make the two types of test event comparable, the visual aspects of each test stimulus had to be the most salient. It was therefore important to minimise noise and contact with the birds. The tests were conducted in conditions that were as close to silence as possible. The visitor wore slippers and the predator stimulus was silent. Care was taken to minimise any physical contact with the birds. It has also been shown that the predator's gaze may be

important (Watve et al., 2002). To reduce variation introduced by this, the simulated predator did not have eyes drawn on it and the visitor did not look at the birds.

### ***Parameters***

Five mutually exclusive behavioural items were measured; moving (bird upright, the picture comes out blur), standing (upright, on both legs), lying (breast on the floor), interaction (bird facing another) and eating (head in the feeder). These were chosen because they were the same as those used by Roden and Wechsler (1997), for a comparison of the behaviour of domestic chicks reared with or without a hen. In each crate, we computed the total number of birds which showed each item using a series of fixed images captured during the visitor/predator tests and then analysed. Each fixed image was taken 60 seconds after occurrence of the visitor/predator. As the goal was to observe the reaction of birds to the test events, and particularly any escape reactions, our main parameter was movement. Finally, we looked at body growth as a physiological and welfare parameter. To that end, we assumed that chicks had a similar live weight on D0 (Careghi, 2005). Then, on D38, 14 randomly chosen birds (7 males and 7 females) were removed from each crate for individual live weight measurements (scale WELTECH© BW 1050).

### ***Dead birds***

We chose not to replace dead birds during experimentation. This decision was made for several reasons. Firstly, new birds would not have been under treatment before introduction to their respective treatment group. Second, we thought that behaviour could have been influenced by the introduction of new individuals to a previously homogeneous group. Thirdly, a new individual could also represent a stressor for the birds in the extant group and would itself experience stress from joining the group. The relative effects of these factors might also depend upon the age of the birds at the time of replacement; introducing a new bird into the group at day 20 could potentially be more stressful than at day 5, for example.

### ***Data analysis***

Data (except body live weights) was analysed using the chi-squared test (Statistica 5.0, Statsoft). We compared the number of birds performing each described item from each fixed image. Since the crates were identical the data from each of the three crates in each building was combined to provide a total of 120 individuals for each treatment group. Thereby, for each analysis, the experimental unit was the bird. For the whole experiment, 1106 behavioural fixed positions were analyzed. Live weights for 84 birds (D38) were studied using the same software but results were obtained from Student t-test. For all data, we looked for a treatment effect, considering results significant if  $p < 0.05$ .

## **RESULTS**

Concerning the main parameter (movement), we observed a treatment effect for the simulated predator stimulus since significantly fewer birds were observed to be moving in the MHUSA group compared to control (30 vs 83 for MHUSA and control, respectively,  $p < 0.0001$ ). The same difference was not observed for the visitor events. Essentially, the responses by the birds to the visitor were comparable between the treatments. Treatment did not have any significant effect on the number of birds showing eating or standing behaviour after occurrence of the predator. However, there were less interactions (165 vs 176 for MHUSA and control, respectively,  $p < 0.05$ ) and fewer birds tended to be lying down (15 vs 34 for MHUSA and control, respectively,  $p = 0.054$ ) in the MHUSA group compared to control, after occurrence of the predator. At D38, chickens reared in the presence of MHUSA were heavier compared to control ( $1492 \pm 215\text{g}$  vs  $1232 \pm 321\text{g}$ ,  $p < 0.001$ ) and the overall number of dead birds was not different among treatments.

## DISCUSSION

In our experiment, we observed that birds raised under MHUSA showed less movement (main parameter) when challenged by the appearance of a simulated predator. To warn of threat, birds give specific calls when they detect a particular type of predator and their conspecifics respond by mounting an appropriate escape response (Evans and Evans, 2007). In the present study this could be seen as a difference in escape responses, with these being more pronounced in the control. This is in accordance with results from Roden and Wechsler (1997) as they compared the effect of the presence, or absence, of the mother hen on behavioural responses of chicks to similar events. With a real hen, there would be an odourant gradient, with levels of semiochemicals probably being higher close to the hen. At times of stress or danger chicks would be expected to move closer to the hen, and therefore into a region of increased and consistent semiochemical concentration. In the present experiment, the concentration of MHUSA would be expected to be high and relatively consistent across the test crate area. We might hypothesize that in such a MHUSA rich environment it would be most appropriate for chicks not to move because they are already in an area of high semiochemical concentration and therefore already in what is perceived to be a secure location. Any additional movement would make the bird more noticeable to the predator. The lack of directionality in the MHUSA signal in our test environment might also contribute the observations in this study. A non-directional signal may have the effect of either indicating that the bird has already reached an optimum location and does not need to decide on a direction of movement, or it may be confuse the bird so that it is unable to choose which direction to move in. The balance of these effects would depend upon the concentration of MHUSA. In this experiment the level was high, which would favour the former explanation: the bird is already in a suitable location and does not need to move. Similar results have been described by Collias (2000), who observed the imprinting process in the chicken and showed that the presence of the mother reassures her chicks, and other chickens. In our testing paradigm, birds had the same number of visitor experiences as predator experiences, but their reactions to these were different. Reactions to the visitor were not altered by the presence of MHUSA. This may have been due to a relative difference in the salience or fearfulness of the visitor and predator stimuli. It may also relate to a difference in habituation to the two types of stimulus. The birds appeared to habituate to the presence of the visitor, but the response to the predator stimulus may have been so innate that it was not subject to habituation. As the series of tests proceeded the emotional impact of the visitor tests would be reduced, so that the fearfulness of visitor events was too low for there to be a significant difference in responses between the MHUSA and control groups. This relates to previous results that indicate that habituation to certain stimuli would be disadvantageous if those stimuli always had the potential to indicate danger (Fisher-Mamblona, 2000). The lack of influence of MHUSA on the reactions of chickens toward the visitor is also in accordance with remarks by Cranberg et al. (2000) who observed no relationship between the stockperson attitude and birds' behaviour, contrasting to studies in other industrial productions. Hemsworth and Barnett (1993) suggested that birds showing a higher level of fearfulness are also less productive. Within our experiment this would mean that even if some habituation to the visitor had occurred, productivity should be better under MHUSA because of its effect on general fearfulness in the rearing environment. This is relevant to our findings, which showed better growth under MHUSA, as indicated by higher body live weights. The birds in our study had no opportunity to learn about potential threat from the behaviour of their mother (or a hen), so they were expected to show either neophobic or innate programmed responses to a relevant threat, here apparently represented by the flying predator, and not by the visitor. Chicks have also not had the chance to learn about the meaning of the MHUSA signal, or how to respond to the location of the treatment, for example moving closer to hen (or MHUSA), where they will also feel more protected (Field et al., 2007). From these observations, it seems more likely that responses to MHUSA must be innate. It

thus appears that MHUSA has the property of reducing innate responses to environmental stimuli that would otherwise persist despite improvements in husbandry management. In such industrial conditions, feeding attitude and efficiency of feeding are of major interest. From our observations, despite an increase in growth rate, MHUSA had no effect on feeding behaviour. MHUSA seems to have a biologically relevant effect since it reduces innate fear in the same way that the close proximity of the hen would. However, it remains unclear precisely why chickens reared in the presence of MHUSA show a different pattern of movements. Observation of less laying down in MHUSA treated birds is of importance because interest in increasing activity level in chickens as been recently stated by Shields et al. (2005). The overall effect of MHUSA to reduce sudden escape movements and increasing standing behaviour may have significant positive implications for reducing the rate of leg problems in growing birds (Bizeray et al., 2002). It is difficult to interpret the fewer interactions observed under MHUSA. Campo and Davila (2002) have shown a positive correlation between fear-induced tonic immobility and aggression. The reduced interaction we observed could be explained by this, if indeed these interactions were aggressive. It is clear that both of these behaviours warrant deeper analysis in a dedicated study in which they could be investigated as a main parameter. Using observations of the effect of an odourant analogue appears to be a new and revealing way to investigate behaviour linked with the maternal bond and behaviour in chickens. This study offers insight into the role of the hen (mother) in the development of the chick (young).

## CONCLUSION

Chicks reared in an environment with MHUSA are less fearful, particularly in response to a non-habituating, fear-inducing predatory stimulus. The second main conclusion is that the studied MHUSA has a potential in controlling stress in broilers living in intensive farming conditions.

## REFERENCES

- Barnett, J.L., Hemsworth, P.H. 1989. Fear of humans by laying hens in different tiers of a battery: behavioural and physiological responses. *Br. Poult. Sci.* 30, 497-504.
- Bizeray, D., Estevez, I., Leterrier, C., Faure, J.M. 2002. Influence of increased environmental complexity on leg condition, performance, and level of fearfulness in broilers. *Poult. Sci.* 81, 767-773.
- Bolhuis, J.J., Honey, R.C. 1994. Within-event learning during filial imprinting. *J. of Exp. Psychol: Anim. Behav. Proc.* 20, 240-248
- Bonadonna, F., Villafane, M., Bajzak, C., Jouventin, P. 2004. Recognition of burrow's olfactory signature in blue petrels, *Halobaena caerulea*: an efficient discrimination mechanism in the dark. *Anim. Behav.* 67, 893-898.
- Campo, J.L., Davila, G. 2002. Effect of photoperiod on heterophil to lymphocyte ratio and tonic immobility duration of chickens. *Poult. Sc.* 81, 1637-1639.
- Careghi, C., Tona, K., Onagbesan, O., Buyse, J., Decuyper, E., Bruggeman, V. 2005. The effects of the spread of hatch and interaction with delayed feed access after hatch on broiler performance until seven days of age. *Poult. Sci.* 84, 1314-1320.
- Cranberg, P.H., Hemsworth, P.H., Coleman, G.J. 2000. Human factors affecting the behaviour and productivity of commercial broiler chicken. *Br. Poult. Sc.* 41, 272-279.
- Collias, N.E. 2000. Filial imprinting and leadership among chicks in family integration of the domestic fowl. *Behav.* 137, 197-211.
- Curio, E., Ernst, U., Vieth, W. 1978. Cultural Transmission of Enemy Recognition: One Function of Mobbing. *Science* 202, 899-901.
- Evans, C.S., Evans, L. 2007. Representational signalling in birds. *Biol. Lett.* 22, 8-11.
- Fisher-Mamblona, H. 2000. On the evolution of attachment disordered behaviour. *Attach. Hum. Dev.* 2, 8-21

Field, S.E., Rickard, N.S., Toukhsati, S.R., Gibbs, M.E. 2007. Maternal hen calls modulate memory formation in the day-old chick: the role of noradrenaline. *Neurobiol. Learn. Mem.* 88, 321-330.

Freire, R., van Dort, S., Rogers, L.J. 2006. Pre- and post-hatching effects of corticosterone treatment on behavior of the domestic chick. *Horm. Behav.* 49, 157-165.

Goth, A. 2001. Innate predator-recognition in Australian brush-turkey (*Alectura lathami*, *Megapodiidae*) hatchling. *Behav.* 138, 117-136.

Henderson, J.V., Nicol, C.J., Lines, J.A., White, R.P., Wathes, C.M. 2001. Behaviour of domestic ducks exposed to mobile predator stimuli. 1. Flock responses. *Br. Poult. Sci.* 42, 433-438.

Hemsworth, P.H., Barnett, J.L. 1989. Relationships between fear of humans, productivity and cage position of laying hens. *Br. Poult. Sci.* 30, 505-518.

Johnston A.N.B, Burne T.H.J., Rose S.P.R. 1998. Observation learning in day-old chicks using a one-trial passive avoidance learning paradigm. *Anim. Behav.* 56, 1347-1353.

Madec, I., Gabarrou, J.F., Guillaume, D., Bougrat, L., Pageat, P. 2008. Are 35 days enough to observe a reduction of stress by using a hen's semiochemical analogue on chickens (*Gallus gallus domesticus*) housed under high density? *Poult. Sc.* 87, 222-225.

Madec, I., Pageat, P., Bougrat, L., Saffray, D., Lafont, C., Falewee, C., Gervasoni, M.A., Bollart, A., Gabarrou, J.F. 2006. Influence of a Semiochemical Analogue on Growing Performances and Meat Quality of Broilers. *Poult. Sc.* 85, 2112-2117.

Mellor, D.J., Diesch, T.J. 2007. Birth and hatching: key events in the onset of awareness in the lamb and chick. *N. Z. Vet. J.* 55, 51-60.

Mc Glone, J.J., and D.L. Anderson. 2002. Synthetic pheromone stimulates feeding behaviour and weight gain in weaned pigs. *J. Anim. Sci.* 80: 3179-3183.

Moltz, H., and M. Leet. 1981. The maternal pheromone of the rat: identity and functional significance. *Phys. Behav.* 26: 301-306.

Nicol, C.J. 2004. Development, direction, and damage limitation: social learning in domestic fowl. *Learn. and Behav.* 32, 72-81.

Pageat, P., and E. Gaultier. 2003. Current research in canine and feline pheromones. *Vet. Clinics*: 33, 187-211.

Palleroni, A., Hauser, M., Marler, P. 2005. Do responses of galliform birds vary adaptively with predator size? *Anim Cogn.* 8, 200-210.

Richard-Yris, M.A., Leboucher, G. 1986. Induced maternal behaviour in the domestic hen. Influence of partial or total separation on the maintenance of maternal responsiveness [Article in French]. *C. R. Acad. Sci. III.*302, 387-390

Roden, C., Wechsler, B. 1997. A comparison of the behaviour of domestic chicks reared with or without a hen in enriched pens *Appl. Anim. Behav. Sci.* 55, 317-326.

Roper, T.J., Marples, N.M. 1997. Odour and colour are cues for taste avoidance learning in domestic chicks. *Anim. Behav.* 53, 1241-1250.

Schleidt, V.W.M. 1961. Reaktionen von truthuhnern auf fliegende raubvogel und versuche zur analyse ihrer AAP's. *Max-Planck-Institut für Verhallens*, 534-559.

Shields, S.J., Garner, J.P., Mench, J.A. 2005. Effect of sand and wood-shavings bedding on the behaviour of broiler chickens. *Poult. Sci.* 84, 1816-1824.

Tallet, C., Arnould, C., Picard, M., Porter, R. 2003. Influence of olfaction on initial weight gain in two genotypes of chicks. *Spring Meeting WPSA.* 779-780.

Vallortigara, G., Cailotto, M., Zanforlin, M. 1990. Sex differences in social reinstatement motivation of the domestic chick (*Gallus gallus*) revealed by runway tests with social and nonsocial reinforcement. *J. Comp. Psychol.* 104, 361-367.

Watve, M., Thakar, J., Kale, A., Puntambekar, S., Shaikh, I., Vaze, K., Jog, M., Paranjape, S. 2002. Bee-eaters (*Merops orientalis*) respond to what a predator can see. *Anim. Cogn.* 5, 253-259.

Wauters, A.M., Richard-Yris, M.A.. 2002. Mutual influence of the maternal hen's food calling and feeding behaviour on the behaviour of her chicks. *Dev. Psychobiol.* 41, 25-36.

## 9. Essai en station n°5 : test de préférence

---

### 9.1. Type de communication et résumé

➤ Type de communication : ce travail a été accepté pour publication aux *Neuro-Endocrinology Letters* (accepté le 05 juillet 2008, publication prévue dans le Vol. 29 n°4, août 2008).

#### ➤ Résumé

Il a été montré qu'un analogue synthétique d'un bouquet moléculaire nommé MHUSA (Mother Hen Uropygial Secretion Analogue) induisait des modifications comportementales chez le poulet. Nous émettons l'hypothèse que MHUSA pourrait avoir un effet attractif pour le poussin puisqu'il s'agit d'une substance émise par la mère.

L'essai décrit met des poussins âgés de 3 jours en situation de choix lors d'une situation stressante : contention manuelle, changement d'environnement et isolation, alors qu'ils étaient avec des congénères du même âge dans un enclos, depuis leur arrivée sur site, deux jours plus tôt. Chaque poussin est introduit au centre d'un tunnel long de deux mètres. Ce dernier est virtuellement divisé en trois zones égales. La zone centrale est nommée N (neutre) et les zones de part et d'autre MHUSA ou placebo, selon qu'un diffuseur de la substance active ou du placebo est placé à l'extrémité de cette zone. Quinze poussins sont ainsi introduits tour à tour dans le tunnel, à la suite de quoi les traitements sont inversés : l'extrémité ayant reçu le traitement placebo devient MHUSA et donc MHUSA devient placebo. Quinze autres poussins sont alors testés. Le protocole respecte une procédure en aveugle et tous les poussins introduits dans le tunnel, puis observés, selon la même procédure, sont naïfs vis-à-vis de MHUSA. La répartition des poussins dans le tunnel durant la période d'observation a été déterminée grâce aux 360 images obtenues par *scan sampling*. En effet, la localisation de chaque poussin est notée toutes les minutes, soit 11 positions durant les 11 minutes de durée du test de choix. Au bout de 9min 30 sec, les poussins sont exposés à un événement stressant standardisé (ouverture – fermeture de porte). La position des poussins est aussi notée juste après cet événement, ce qui fait un total de 12 images x (15 poussins) x 2 lots = 360 positions.

Sur la totalité des observations (paramètre principal) on observe que les poussins sont plus souvent dans la zone MHUSA que la zone placebo ( $p < 0,05$ ). Toujours sur la totalité des positions, les poussins sont plus souvent dans les extrémités (MHUSA ou placebo combinées) que dans la zone N ( $p = 0,07$ ). A partir de l'introduction dans le tunnel jusqu'à la troisième minute, les poussins restent dans la zone neutre ( $p < 0,05$ ).

Ces résultats montrent que les poussins effectuent un choix après la 3<sup>e</sup> minute d'introduction (MHUSA ou placebo). Ce même choix indique le plus souvent une attirance vers MHUSA. Durant les premières minutes, il semble que le poussin s'adapte à son nouvel environnement. Après cette période d'adaptation, il se dirige vers une source locale qui lui rappelle son groupe ou quelque chose s'y rapprochant, peut-être en relation avec le lien d'attachement. Après l'apparition de l'événement stressant, on observe un retour à une situation similaire à celle du début de test. Ceci laisse supposer que le poussin a perdu ses références dans le tunnel et sa confiance dans l'environnement proche.

Nous émettons trois conclusions suite à cette expérimentation. D'abord, MHUSA possède un effet attractif vis-à-vis de poussins naïfs. Ensuite, MHUSA semble influencer sur la réaction du poussin face à un événement stressant. Enfin, la réaction à MHUSA ne nécessite aucun apprentissage et semble innée.

**Mots clés** : poussin, stress, nouveauté, isolation, sémiochimique, empreinte

## **9.2. Texte original de la communication**

**Title: Influence of a maternal odorant on copying strategies in chicks facing isolation and novelty during a standardized test**

Authors: I. Madec<sup>1</sup>, J.F. Gabarrou<sup>2</sup> and P. Pageat<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Pherosynthese, Le Rieu Neuf, 84490 Saint Saturnin Les Apt, France

<sup>2</sup>EI Purpan – 75 voie du TOEC, BP 5761, 31076 Toulouse cedex 3, France

**ABSTRACT** A synthetic analogue of a mother-hen odour named MHUSA (Mother Hen Uropygial Secretion Analogue) is known to reduce stress-related behaviour in the chicken. We hypothesize that MHUSA may have an attractant effect on chicks. In order to test this, 30 chicks were individually exposed to MHUSA, placebo or neutral when self isolated in a straight shuttle box. The location of the chicks within the test chamber during the observation period was recorded with 360 consecutive scan-sampled images. During the first three minutes immediately after introduction to the test area chicks spent more time in the neutral zone ( $p < 0.05$ ). However, taking the results from the total observation period, chicks spent more time in the MHUSA and placebo zones combined than in the neutral zone ( $p = 0.07$ ). They were also more often observed in the MHUSA zone compared to the placebo zone ( $p < 0.05$ ). These results suggest that during the first three minutes in the shuttle, individuals were adapting to their new environment. After this adaptation period, chicks directed themselves towards specific local stimuli, as they tried to reach their group or something that resembled it (attachment link). After a stressor was introduced, we observed a return to the same situation as during the first three minutes of the test, with chicks returning to the neutral zone, suggesting that the chick had lost its reference points or its confidence in the environment. Three main conclusions may be drawn from this trial. Firstly, MHUSA has an attractant effect on naïve chicks. Secondly, it appears to play a role in the reaction of chicks faced with a stressful event, and finally, the reaction to MHUSA seems innate and does not require previous experience or conditioning.

**Key words:** Chick, Stress, Novelty, Isolation, Odorant, Semiochemical, Imprinting

## INTRODUCTION

Chickens (*Gallus gallus*) are social animals that aggregate to create a social structure (Bradshaw, 1992). Runway and treadmill tests are often used to assess social behaviour or the motivation of birds to be near to conspecifics (Vallortigara *et al.*, 1990). These methods require the chick to go through a corridor and are usually used to measure bird's attempt to remain close to siblings (Mills and Faure, 1991). For example, following a stressful event, the readiness of a bird to traverse a runway in order to reach conspecifics has been used to estimate the disinhibition of induced fear (Nicol and Scott, 1991). Chickens are generally attracted to familiar stimuli (Clarke and Jones, 2000), with chicks tending to approach live conspecifics placed at either end of a two choice runway (Carmichael *et al.*, 1998). When a hen is in the presence of chicks, it produces specific odour chemicals, regardless of whether or not the chicks are its own (Richard-Yris *et al.*, 1983). When chicks are isolated from a hen, they tend to show specific patterns of behaviour (Roden and Wechsler, 1997). Recent studies have demonstrated the efficacy of a synthetic analogue (Pageat, 2002) of a mother-hen odour secretion (Mother Hen Uropygial Secretion Analogue, MHUSA) in lowering stress, as indicated by blood parameters, in industrially raised broiler chickens (Madec *et al.*, 2006 ; Madec *et al.*, 2008). Whilst these blood parameters are commonly referenced as indicators of stress in birds (Mumma *et al.*, 2006), they may in fact be less sensitive than behavioural indicators (Feltenstein *et al.*, 2003). In addition, it is often difficult to take blood samples from chicks, and the procedure itself may have a detrimental impact on their welfare. Thus, the aim of the present trial was to test the attractiveness of MHUSA in chicks facing isolation and novelty. Chicks are naïve during the first five to seven days after hatching (Nicol, 2004) and there is an optimal period for imprinting in chicks. Collias (2000) showed that the ability to imprint decreases as early as the first day after hatching. In processing plants, chicks are typically delivered at one day of age, after artificial incubation and hatching. They have therefore had no contact with adult birds after hatching. Handling, transportation and novelty are known sources of stress (Grandin, 1997), and Warnick *et al.* (2006) suggest that isolation stress in chicks resembles panic. So, it appeared ideal to perform the odour preference test on previously minimally stressed chicks at three or four days of age, after adaptation to their rearing environment. We chose to present individual chicks with a simple task using a linear corridor, rather than a v-shaped runway, to test the attractiveness of MHUSA, as this provided a strong motivation and facilitated behavioural observations (Vallortigara *et al.*, 1990). As shown by Hazard *et al.* (2008), it was anticipated that studying the response to isolation and placing the chick alone in a novel environment might provide greater understanding of responses to restraint, since both these stressors are components of the restraint test.

## MATERIAL AND METHODS

### ***Subjects and housing conditions***

Thirty chicks, from strain ROSS PM3, were used for the trial. The chicks had been vaccinated for Marek's, Gumborow and Newcastle disease at the hatchery, on the day prior to their arrival on site. Chicks stayed in a dedicated barn for three days after arrival. They had free access to conventional food and water, and the rearing conditions were consistent with commercial temperature and hygrometry standards. Because it has been shown that circadian rhythm may influence reaction to stress (Dubovicky *et al.*, 2007), the procedure was performed under full artificial uniform light. Methods of breeding and experimentation were in accordance with the 95/29/CE European convention.

### ***Treatments and apparatus***

A shuttle box, measuring 200 x 50 x 25 cm (length x width x height) was built for the trial. This test apparatus was situated in a separate room with similar ambient temperature to that of the barn. The shuttle box was marked into three equal sections. The ends were labelled A and B, and the central part was labelled N (neutral). Within the shuttle box the soil base was covered with fresh straw, the same as in the barn. As shown on figure 1, a drawer (20cm width) allows the chick to be gently introduced into the middle of the shuttle. Two different treatments were compared at the same time, using treatment blocks placed at opposing ends of the shuttle box. The treatment blocks consisted of slow-release macromolecular gelatin composed of water (>90%), non ionic surfactant (4%) and a gelling gum (3%) (Nicols S.A., 59980 Bertry, France). MHUSA blocks contained 2% of the principle, while control blocks contained matrix alone. Control and MHUSA blocks were visually indistinguishable and weighed 150g. MHUSA and control blocks were placed at opposite ends of the shuttle box, in zones A and B, but experimenters were blinded with respect to which block contained the active principle.

### **Procedure**

Experiments were carried out on two batches of 15 chicks. The experiment was performed on one chick at a time, and each chick was tested once. For the first batch of 15 chicks, a MHUSA block was placed at end A of the shuttle box and a placebo block at end B. For the second batch of chicks exactly the same design was used but the location of the blocks was reversed (MHUSA block at end B). Chicks were not able to make physical contact with the blocks, as these were placed behind a grille at the extreme end of the shuttle box. Birds were tested consecutively, with the same blocks remaining in position throughout the batch of experiments. Video recording (CAMSET 13, Velleman©) commenced immediately after a chick was introduced in the shuttle box. Scan sampling was recorded using a video cassette recorder (DAEWOO© SV-813S) to record the spatial location of the chick every 60 seconds. The isolation paradigm followed that which was described by Feltenstein *et al.* (2003), and involved isolation of the group-raised chick from its social companions. After 9min 30sec, chicks were then exposed to a stressful event. This was achieved by opening and closing the door of the testing room in a manner that was standardized for all the tests. The position of the chick within the shuttle box was recorded immediately after this event. Each test lasted 11 minutes from the introduction of the chick in the shuttle box, so that the position of each chick was recorded 12 times (each 60sec and after event). This gave a total of 360 location measurements for the 30 chicks.

### **Statistics**

Statistical analysis was performed using SYSTAT 10 software. For each sampled time point the position of the chick under test was recorded as A, B or N, according to the section of the shuttle box it was in at that time. Thus there were 30 observations for each of the 12 time points. A Chi squared test was then performed for each time point and for the entire data set (n=360). Positions of the chick were noted in a yes/no design for each time point and for each chick. Three sets of results were therefore obtained: MHUSA vs other (placebo and Neutral cumulated), placebo vs other (MHUSA and Neutral cumulated), and Neutral vs other (MHUSA and placebo cumulated). We then compared computed observations to theoretical ones. We tested for equality between computed and theoretical values (5% risk, df=1), focusing on our main parameter: scan of the total observations after the two batches. Results were considered significant if  $p < 0.05$ .

## **RESULTS**

As shown in table 1, chicks were significantly more frequently observed in the MHUSA zone compared to placebo for the cumulated 360 scan samples (main parameter) performed (Stot,  $p < 0.05$ ). This was also the case at 8 minutes post introduction of the chick (S8,  $p < 0.05$ ) and there was a trend for chicks to be observed more often in the

MHUSA zone, compared to placebo, immediately after the stressful event (S9p,  $p=0.1$ ) and one minute after it (S10,  $p=0.1$ ). For all other observations, there was no significant difference. During the time immediately after introduction to the shuttle box (0-3 minutes after introduction) birds were recorded significantly more often in zone N than in both the MHUSA and placebo zones combined (denoted as COM). Indeed, for time points S1 ( $p<0.001$ ), S2 ( $p<0.05$ ) and S3 ( $p<0.05$ ), more chicks were observed in the neutral zone compared to COM (table 2), while we observed the reverse at S5 ( $p<0.05$ ) and S6 ( $p<0.01$ ) since there were more chicks in COM. For time points S7, S8, S9 and S11, we found no statistical difference between the number of chicks in N compared to COM. Immediately after the stressful event, as well as 60 seconds after it, chicks were significantly more commonly observed in COM compared to N (S9p,  $p<0.05$  and S10,  $p<0.05$ ). For the cumulative data for all 360 time points chicks were more frequently recorded in COM than in N (Stot,  $p=0.07$ ).

## DISCUSSION

Since Collias (2000) has demonstrated that chicks are able to recognize their siblings at 3 days of age, we would expect that after four days in the barn with the same companions, chicks from our trial were used to their surroundings and social contact with each other. After the age of four days, age and sex may influence the chick's response to a component similar or equivalent to a semiochemical (Fluck *et al.*, 1996). Thus, the decision to use MHUSA on naïve chicks at four days of age was not influenced by these biological factors. In the barn, chicks were used to their environment, and still naive of any stressors. They were also old enough to imprint on other chicks, as demonstrated by Collias (2000). Since the whole trial was performed in a single day there cannot have been any time related effects. Apart from being imprinted upon them, chicks may also have become the subject of similar bonds of attachment from their siblings. Thus, as shown by Fisher-Mamblona (2000), the chicks may have been both imprinted and imprinted upon. Knowing this, we may hypothesize that when chicks were separated from their group, they experienced panic not only because of novelty, but also because of the sudden loss of attachment. Our experimental design is close to the one by Warnick *et al.* (2006), which proposed that a separation stress paradigm better modelled panic disorder than it models generalized anxiety disorder. The experience of merely being handled, even for a few seconds, is able to create stress (Grandin, 1997). The chicks used in this study, because they have been handled and moved from their initial crate, have had to experience and cope with a new environment, isolation and a closed shuttle box. The main studied parameter (Stot) shows that MHUSA plays an attractant effect on naïve chicks test when exposed to isolation stress. From global results, we can split the response of the chicks into three phases, with regard to the events that happen to them. The first phase lasted from introduction to the shuttle box until the fourth minute. During this phase, individuals adapted to the new environment. This would explain the tendency for chicks to remain in the neutral zone of the shuttle box. This is in accordance with results by Feltenstein *et al.* (2002) showing more distress vocalization than change of location in a social separation test. In the present study vocalisation was not analysed and it would have been interesting to look for correlations between vocalisation and location in the shuttle box. Our results are also in accordance with those of Feltenstein *et al.* (2003), which involved isolation periods, followed by observation of stress parameters. The second phase could be characterized as the "choice period", lasting from S4 (included) until S9 (inclusive). During those six minutes, the chick tries to reach its group or something that provides a similar experience of attachment. This was confirmed by the tendency for chicks to choose the MHUSA zone during this period. The end of this second period is reached when the stressful event arises (S9p). From that moment, it seemed that the isolated chick lost its reference points or its confidence in the environment. These results are in accordance with those of Henderson *et al.* (2001) who attested of the importance of noise in danger perception in

birds. In our experiment, the event appears to be stressful enough to produce significant results. After S10 (included), it seems that the chicks return to the same state as at time point S1, so that the individual has to learn to adapt to the environment again. It would have been of interest to observe the reaction of the chicks from S11 onward, to compare with S1 to S3. Nevertheless, apparition of the stressing event was of interest since it has been reported that stress response reaches its maximum before 10 min since corticosterone level does not increase further after this interval (Hazard *et al.*, 2008). We hypothesize that because MHUSA plays a role in the chick's response to stress, it will have attractant properties, and that this attractiveness may be either learned (odour dependant) or innate (semiochemical) (Brennan and Zufall, 2006). On the one hand, chick's response to MHUSA appears to be innate and specific for two main reasons. First, none of them had been in the presence of their mother nor exposed to MHUSA. Second, a learning process would have led to a faster reaction after occurrence of the stressor. According to Brennan and Zufall (2006), MHUSA could thus be defined as a signaller semiochemical. On the other hand, chicks spent three days with the same conspecifics and MHUSA may remind them of their siblings. Indeed, Bonadonna *et al.* (2004) showed that chicks are able to find their own nipple using odours. Nevertheless, these observations may also result from imprinting due to mutual imprinting in the resting barn during the period before introduction into the tunnel (Fisher-Mamblona, 2000). Thus, it is more likely that MHUSA is innate since the ability to imprint decreases one day after hatching (Collias, 2000). The main conclusions from this test are that MHUSA plays a role in the chick's reaction to a stressful event, that it has an attractant-like effect on naïve chicks, and that these effects may be innate and not learned.

## ACKNOWLEDGMENTS

Authors would particularly like to thank Dr Jonathan Bowen, from Royal Veterinary College – University of London, for his English proof reading of this manuscript.

## REFERENCES

- Bradshaw RH (1992) Conspecific discrimination and social preference in the laying hen. *Appl Anim Behav Sci.* 33: 69-75.
- Brennan A, Zufall F (2006). Pheromonal communication in vertebrates. *Nature* 444: 308-315.
- Bonadonna F, Villafane M, Bajzak C, Jouventin P (2004). Recognition of burrow's olfactory signature in blue petrels, *Halobaena caerulea*: an efficient discrimination mechanism in the dark. *Anim Behav.* 67: 893-898.
- Carmichael NL, Jones, RB, Mills AD (1998). Social preference in Japanese quail chicks from lines selected for low or high social reinstatement motivation: effects of number and line identity in the stimulus birds. *Appl Anim Behav Sci.* 58: 353-363.
- Clarke CH, Jones R.B (2000). Effects of prior video stimulation on open-field behaviour in domestic chicks. *Appl Anim Behav Sci.* 66: 107-117.
- Collias NE (2000). Filial imprinting and leadership among chicks in family integration of the domestic fowl. *Behav.* 137: 197-211.
- Dubovicky M, Mach M, Key M, Morris M Paton S, Lucos, JB (2007). Diurnal behavioural and endocrine effects of chronic shaker stress in mice. *Neuroendocrinol Lett.* 28: 846-853.
- Feltenstein MW, Ford NG, Freeman KB, Sufka KJ (2002). Dissociation of stress behaviors in the chick social-separation-stress procedure. *Physiol Behav.* 15: 675-679.
- Feltenstein MW, Lambdin LC, Webb HE, Warnick JE, Khan, SI, Khan IA, et al. (2003). Corticosterone response in the chick separation-stress paradigm. *Physiol Behav.* 78: 489-489.
- Fisher-Mamblona H. (2000). On the evolution of attachment disordered behaviour. *Attach Hum Dev.* 2: 8-21.

Fluck E, Hogg S, Mabbutt PS, File SE (1996). Behavioural and neurochemical responses of male and female chicks to cat odour. *Pharmac Bioch Behav.* 54: 85-91.

Grandin, T. (1997). Assessment of stress during handling and transport. *J Anim Sci.* 75: 249-257.

Hazard D, Couty M, Richard S, Guémené D (2008). Intensity and duration of corticosterone response to stressful situations in Japanese quail divergently selected for tonic immobility. *Gen Comp Endocrinol.* 155: 288-297.

Henderson JV, Nicol CJ, Lines JA, White RP, Wathes CM (2001). Behaviour of domestic ducks exposed to mobile predator stimuli. 1. Flocks responses. *Br Poult Sci.* 42 : 433-438.

Madec I, Gabarrou JF, Guillaume D, Bougrat L, Pageat P. (2008). Are 35 days enough to observe a reduction of stress by using a hen's semiochemical analogue on chickens (*Gallus gallus domesticus*) housed under high density? *Poult Sci.* 87: 222-225.

Madec I, Pageat P, Bougrat L, Saffray D, Lafont C, Falewee C, et al. (2006). Influence of a Semiochemical Analogue on Growing Performances and Meat Quality of Broilers. *Poult Sci.* 85: 2112-2117.

Mills AD, Faure JM (1991). Divergent selection for duration of tonic immobility and social reinstatement behavior in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) chicks. *J Comp Psychol.* 105: 25-38.

Mumma JO, Thanxton JP, Vizzier-Thaxton Y, Dosdon WL (2006). Physiological stress in laying hens. *Poult Sci.* 85: 761-769.

Nicol CJ (2004). Development, direction, and damage limitation: social learning in domestic fowl. *Learn Behav.* 32: 72-81.

Nicol CJ, Scott GB (1990). Pre-slaughter handling and transport of broiler chickens. *Appl Anim Behav Sci.* 28: 57-73.

Pageat P. (2002). Avian appeasing pheromones to decrease stress, anxiety and aggressiveness. US Patent 60/389,768

Richard-Yris MA, Garner DH, Le boucher G (1983). Induction of maternal behaviour and some hormonal and physiological correlates in the domestic hen. *Horm and Behav.* 17: 345-355.

Roden C, Wechsler B (1997). A comparison of the behaviour of domestic chicks reared with or without a hen in enriched pens *Appl Anim Behav Sci.* 55: 317-326.

Vallortigara G, Cailotto M, Zanforlin M. (1990). Sex differences in social reinstatement motivation of the domestic chick (*Gallus gallus*) revealed by runway tests with social and nonsocial reinforcement. *J Comp Psychol.* 104: 361-367.

Warnick JE, Wicks RT, Sufka KJ (2006). Modeling anxiety-like states: pharmacological characterization of the chick separation stress paradigm. *Behav Pharmacol.* 17: 581-587.

**Table 1.** attractiveness of the MHUSA treatment on naive chicks experiencing isolation and novelty – MHUSA vs placebo

Tint <sup>1</sup>	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S9p <sup>2</sup>	S10	S11	Stot <sup>3</sup>
MHUSA	2	5	7	8	11	9	8	12	10	13	13	11	109
Neutral	22	19	19	15	11	9	15	14	12	10	10	12	168
Placebo	6	6	4	7	8	12	7	4	8	7	7	7	83
Significance <sup>4</sup>	ns	p<0.05	ns	p=0.1	p=0.1	ns	p<0.05						

<sup>1</sup>Tint: time (minutes) post introduction of the chick in the shuttle

<sup>2</sup>S9p: 5sec after the stress

<sup>3</sup>Stot: cumulated 360 observations

<sup>4</sup>Significance: significant value means that more individuals are in the MHUSA zone compared to placebo.

**Table 2.** Moves of the naive chicks in chicks experiencing isolation and novelty – MHUSA vs placebo

Tint <sup>1</sup>	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S9p <sup>2</sup>	S10	S11	Stot <sup>3</sup>
Neutral	22	19	19	15	11	9	15	14	12	10	10	12	168
COM <sup>4</sup>	8	11	11	15	19	21	15	16	18	20	20	18	192
Significance <sup>5</sup>	p<0.001	p<0.05	p<0.05	ns	p<0.05	p<0.01	ns	ns	ns	p<0.05	p<0.05	ns	p=0.07

<sup>1</sup>Tint: time (minutes) post introduction of the chick in the shuttle

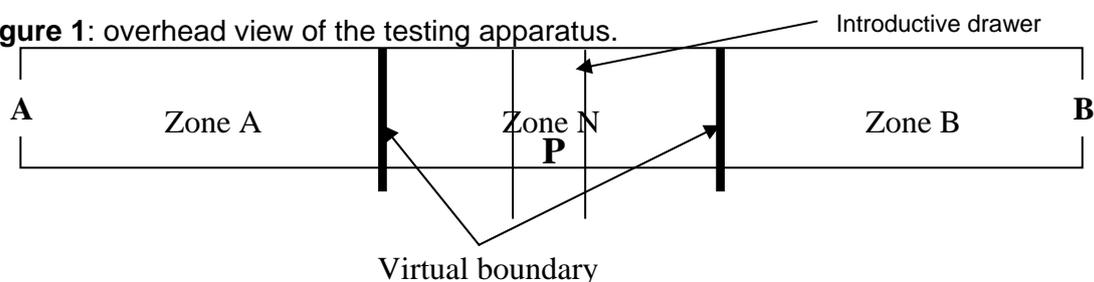
<sup>2</sup>S9p: 5sec after the stress

<sup>3</sup>Stot: cumulated 360 observations

<sup>4</sup>COM: MHUSA and placebo combined

<sup>5</sup>Significance: comparison between the number of animals in N compared to COM

**Figure 1:** overhead view of the testing apparatus.



# **Partie III : discussion générale**

Analyse des méthodes

Analyse des résultats

Extension du travail

# Chapitre I : analyse des méthodes utilisées

## 1. Validation de MHUSA

---

Avant d'entreprendre les essais dont les résultats ont été présentés plus haut, nous avons tenu à déterminer si MHUSA pouvait avoir une influence sur des poulets en situation d'élevage. La méthode dite de *screening* nous a permis d'obtenir une réponse rapide. Cette méthode consiste à analyser des résultats préliminaires permettant d'affiner les hypothèses de départ. Nous avons donc pratiqué ces tests de *screening* sur de petits effectifs (en laboratoire, résultats non présentés). Comme base de travail, nous avons pris les résultats d'une étude sur porcs (Mc Glone et Aderson, 2002). Elle indique une meilleure croissance et une diminution des bagarres (induisant des plaies) en élevages industriels en cas d'utilisation d'une apaisine maternelle de même nature que MHUSA. Nous avons choisi des paramètres d'observation similaires. Les résultats obtenus (essai en élevage n°1) nous ont semblé suffisamment probants pour envisager la construction de protocoles expérimentaux permettant la validation de l'efficacité de MHUSA. L'étape suivante de notre raisonnement fut de construire des plans d'expérimentation nous permettant de nous affranchir de biais éventuels.

## 2. Composante zootechnique

---

### 2.1. Lieux d'étude

Les performances dépendent de l'environnement et de la génétique (Mc Arthur *et al.*, 2006). L'adaptation de l'animal à cet environnement est indispensable pour obtenir les meilleurs rendements (Wingfield *et al.*, 1997) et les comportements agressifs augmentent quand celui-ci est stressant pour l'animal (Van Hoek et King, 1997). Ainsi, la comparaison des résultats zootechniques en conditions d'élevage et en routine, constituait une étape nécessaire. Nous avons choisi de tester MHUSA dans les types d'élevage les plus représentés en France : *Label*, *Lourd* et *Standard*. Notre volonté était d'avoir l'échantillonnage le plus large possible afin de tester l'influence potentielle de différents types d'environnement. L'Homme a créé des souches en fonction des types d'élevage dans lesquels on voulait faire évoluer les poulets. On pouvait ainsi penser que le facteur génétique influence la réponse à MHUSA. Comme on établit le lien entre l'économie, le bien-être et la productivité (Bradshaw *et al.*, 2002), nous avons utilisé cette base bibliographique, appuyée par des études pré-existantes en France (par exemple Chartrin *et al.*, 2003) pour établir les paramètres à étudier en élevage de volailles en particulier. Les critères d'évaluation des performances choisis sont aussi en accord avec une bibliographie plus large, au-delà des critères techniques français (Shane, 2003). Cette approche nous a permis de comparer les résultats avec des données d'autres tests en élevage, donc en conditions équivalentes.

Au début de notre travail, nous sommes partis de l'hypothèse selon laquelle la stabilisation de l'état émotionnel serait plus aisée en conditions d'élevage *Label*. En effet, outre la petite durée d'une bande en *Standard*, les conditions de proxémie et un contexte diminuant, voire annulant la possibilité de mise en place d'une hiérarchie diminuaient les chances de voir un effet de MHUSA. C'est pourquoi nous avons plus de résultats en *Label*. Travailler en conditions réelles présente aussi ses désavantages. Par exemple, mis

à part le personnel d'élevage, aucune personne participant à l'étude n'était présente sur l'élevage au quotidien. Des données auraient pu être compilées en effectuant des relevés plus rapprochés. Cela met en avant l'importance de la gestion technique du travail comme l'utilisation de la main d'œuvre ou la bonne entente avec l'éleveur. L'étape consistant à mesurer l'influence de MHUSA sur l'efficacité alimentaire n'a ainsi pu se faire qu'en station, où le facteur limitant n'était pas l'effectif étudié mais le nombre de mangeoires utilisé (nombre d'enclos par traitement).

## **2.2. Taille des effectifs et analyse des échantillons**

La taille des effectifs était imposée par les élevages utilisés pour nos essais. Le choix des tailles d'échantillons tests s'est effectué en fonction des contraintes techniques, puis a été répété pour uniformiser nos résultats. Les deux types majeurs de contraintes rencontrés furent d'ordre temporel et financier. En effet, les pesées et prises de sang devaient être effectuées en une nuit pour être le plus homogènes possibles. Le nombre d'animaux utilisé avait également une limite imposée par l'éleveur et/ou l'abattoir pour des questions de rentabilité. Toutefois, toutes les mesures ont permis de respecter les règles décrites par Van Der Sluis (2003), notamment en termes de respect d'effectif et d'homogénéisation des échantillons. Enfin, tous les échantillons ont été collectés et analysés selon la même procédure.

Les analyses de qualité de viande n'ont été effectuées que sur poulets *Label*. Nous ne sommes pas en mesure de savoir si l'influence de MHUSA est reproductible sur les autres types de production. Nous n'avons pas testé la qualité de viande sur des productions n'ayant pas accès à un parcours. Aucune de nos analyses ne prend non plus en compte la tendreté de la viande, comme proposé par Fletcher (2002). L'effectif à tester nous semblait important en raison de la taille des jambons de poulets industriels, qui avoisinent 10kg. L'obtention d'un échantillon représentatif aurait nécessité environ 10 fois plus de poulets que le nombre testé dans nos conditions en utilisant nos paramètres. Nous avons choisi d'effectuer les mesures de qualité de viande 24 heures après l'abattage, notamment en raison des conditions de travail à l'abattoir, que nous ne voulions pas perturber. Ainsi, nous n'avons pas de valeurs de qualité dans les minutes suivant l'abattage, comme l'ont par exemple étudié El-Rammouz *et al.* (2004). D'autres méthodes existent pour les mesures de qualité, notamment pour la couleur : plusieurs mesures sont parfois effectuées en plusieurs zones du muscle. La face ventrale ou dorsale du filet peut être étudiée et le moment d'observation varie selon les auteurs.

## **3. Composante physiologique**

---

### **3.1. Lieux d'étude et stress**

Le lieu d'attente des poulets, en amont du test étudiant la production de cytokines, se justifiait d'abord par l'obligation d'avoir des animaux naïfs au début du test. Ensuite les sujets devaient rester « au repos » avant de commencer l'expérimentation. Nous voulions en effet tester la réponse immunitaire et il existe une relation entre la peur et l'immunité (Zulkifli *et al.*, 2002). Placer les poulets en attente dans la pièce du test aurait posé la question de la « pollution » de l'atmosphère ambiante par des signaux d'alarme émis par les individus en situation de test, et donc de stress (Palleroni *et al.*, 2005). Enfin, ce lieu d'attente nous permettait d'effectuer une ligne de base (prise de sang à T0). A partir de ce moment les animaux subissent une prise de sang toutes les 60 minutes, dans le dispositif de testage (illustration 38).

### **Illustration 38 : isolation de poulets en cage de verre**

*Dispositif de testage expérimental utilisé pour effectuer des dosages de cytokines et autres paramètres sanguins suite à un stress associant contention, déplacement et isolation (MHUSA vs placebo).*



(Phérosynthèse, 2007)

La contention des animaux, leur transport, la perte de leurs repères sociaux, leur isolement et le changement de lieux constituent la situation stressante. Les réponses immunologiques et hormonales montrent que les conditions proposées sont concluantes pour tester l'hypothèse selon laquelle MHUSA pouvait avoir une influence sur la production de IL1, IL6 et IFN $\gamma$ . Nous avons pris le risque d'utiliser une compilation de différents épisodes stressants : l'immobilisation (Rodenburg *et al.*, 2005), la contention (Chamanza *et al.*, 1999), puis l'isolement (Saito *et al.*, 2005). C'est la résultante de ces trois stress que nous avons mesurée. Notre technique d'analyse nous permet de conclure à l'efficacité de la situation de stress. Comme le stress augmente pour le groupe placebo, le protocole de stress pourrait être indiqué comme un test standardisé, utilisable pour d'autres types d'expérimentations (comportements, autres tests de physiologie...).

### **3.2. Protocole expérimental et analyse statistique**

Les données ont été analysées par échantillons appariés. Cela explique notamment que nous n'avons que 3 paires d'animaux étudiées pour chacune des interleukines, au lieu des 12 potentielles. Les poulets sont passés dans la salle de test par couple (un mâle et une femelle). Les 6 couples placebo ont été testés en 24 heures, les 6 couples MHUSA pareillement, mais une semaine après. Afin d'obtenir des résultats les plus comparables possibles, nous avons choisi de prendre en considération l'ordre de passage des couples. Une fois la technique mise au point, nous avons utilisé tout le potentiel d'échantillon existant pour effectuer une analyse statistique la plus juste possible. Il existe un nombre important de biais potentiels que nous avons souhaité gommer, notamment la variabilité entre les gels pour le transfert des protéines. Nous avons décidé de mettre les échantillons de deux animaux par gel (donc huit échantillons au total : un pour chaque prise de sang) : une paire de même sexe (par exemple MA3 vs MB3 pour une comparaison entre le Mâle sous traitement A en troisième position et le Mâle sous traitement B en troisième position). Nous n'avons utilisé que les échantillons permettant d'avoir ces huit points. Ainsi, s'il manquait un point sur les quatre prises de sang, l'animal n'était pas étudié (ni son pendant donc). Nous avons en effet pensé que les quatre points étaient nécessaires à une étude de la cinétique d'apparition. L'ordre de passage nous a aussi semblé important car comparer un animal soumis au test en premier avec le dernier (traitements différents) pouvait être perturbé par la différence d'attente dans l'aire de repos entre les animaux.

Notons que les poulets n'ont jamais été isolés dans l'air de repos : même le dernier animal étudié était encore en compagnie de congénères car nous avons plus d'animaux que nécessaire pour le test.

La technique consistant à déterminer les quantités d'interleukines, même si elle reste semi-quantitative, est intéressante dans le sens où elle nous permet de comparer les groupes de traitement et d'y déceler une éventuelle différence. La contrepartie de l'innovation reste la faiblesse quantitative de comparaison. En effet, il n'existe à notre connaissance aucune étude qui ait relevé un temps d'apparition de cytokines chez *Gallus gallus* aussi court après un stress. Les études évoquant la cinétique de ces hormones étudient des temps de latence plus espacés (de l'ordre de 3 heures) ; toutefois sans observer les temps intermédiaires, comme nous l'avons fait. Regrouper des situations de stress connues qui permettent une observation précise de l'évolution des productions hormonales parallèlement à des indicateurs de stress sanguins est une méthode nouvelle pour la volaille. Dans la technique montrée, les poulets subissent quatre prises de sang pour cinq marqueurs étudiés. Les deux premiers (ratio hétérophiles/lymphocytes et corticostérone) permettent de faire le lien avec les techniques connues d'évaluation de stress alors que les trois autres (IL1, IL6 et IFN $\gamma$ ) indiquent une activation de l'axe hypothalamo-hypophysaire (Puvadolpriod et Thaxton, 2000).

### **3.3. Technique d'analyse**

Il fut nécessaire de mettre au point une technique d'analyse permettant la séparation et le dosage des peptides de la famille des interleukines. Ce passage obligé était prévu avant le début de l'essai. Cela fut réfléchi et mis au point en s'inspirant de travaux sur les mammifères chez qui l'étude de la fonction et de la production des interleukines est plus avancée que chez *Gallus gallus*. Les techniques permettant d'observer la production d'interleukines chez la volaille ne nous apparaissaient pas accessibles (techniquement et en terme de calendrier) car elles entraînaient la mesure de la production des protéines du fos, majoritairement observées après un stress induit par l'inoculation de bactéries (Turner *et al.*, 2002), ce qui ne correspondait ni à nos travaux, ni à nos critères.

Weining *et al.* (1998) montrent que l'on trouve l'homologue de l'IL-1 $\beta$  des mammifères chez le poulet. Un fragment de cet homologue (50%) est aussi fonctionnel chez le poulet. Une étude similaire, réalisée par Scheider *et al.* (2001), indique que l'IL-6 est une cytokine avec peu de spécificités et que l'on peut comparer les séquences d'ADN de cette dernière entre *Gallus gallus* et l'Homme. Enfin, nous avons voulu observer la production de IFN $\gamma$ , même si la littérature sur le sujet était moins abondante que pour les deux interleukines précédentes. Une logique de globalité nous a amené à travailler sur IFN $\gamma$  : technique d'analyse similaire aux deux autres éprouvées, cinétique d'apparition liée. Cette cinétique d'apparition des interleukines nous est donnée par Nakamura *et al.* (1998), ce qui nous a permis de guider nos choix d'interleukines à chercher dans les échantillons de sang.

## **4. Composante comportementale**

---

### **4.1. Lieux d'étude**

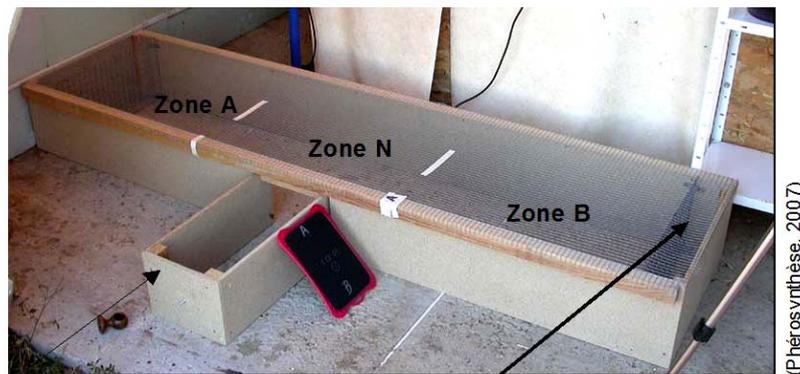
Nous avons effectué toutes les études comportementales sur site. Ceci se justifie au regard du planning de travail puisque nous nous étions fixé de mesurer les incidences comportementales après l'obtention de résultats à l'échelle industrielle. Entreprendre des travaux de recherche fondamentale, lourds et coûteux, aurait été contraignant. Il est apparu inutile d'entreprendre ce type d'étude, moins appliqué, en élevage et cela nous a

permis de travailler sur des effectifs moins importants, rendant les essais techniquement plus abordables.

Pratiquer des tests sur site permet d'effectuer les observations en temps voulu (ou plus rapproché dans le temps) et d'envisager des méthodes de travail incompatibles avec des élevages industriels (prédateur et visiteur). De plus, nous avons pu utiliser des poussins pour pratiquer le test de choix (illustration 39).

### **Illustration 39 : descriptif du tunnel pour le test de choix**

Des poussins ( $n=30$ ), sont tour à tour introduits dans le tunnel par le tiroir dans la zone neutre (N), ils sont ensuite laissés libres d'aller en zone B (placebo derrière la grille), en Zone A (MHUSA derrière la grille) ou de rester en zone N.



● Tiroir d'introduction du poussin

● Grille de protection du traitement

## **4.2. Echantillonnage**

La première étape du travail s'articulait autour de la question suivante : quels paramètres comportementaux vont varier sous l'influence de MHUSA ? Nous avons choisi de tester une palette d'items comportementaux variés, à partir de la bibliographie sur le poulet domestique, dont la base principale était l'étude de Roden et Wechsler (1997). Les cinq paramètres étudiés, multipliés par les deux événements imposés, permettaient de dégrossir les types de comportement variant selon MHUSA. Afin d'avoir un lien avec les autres approches de ce travail, nous avons aussi effectué un relevé des poids vifs en fin d'expérimentation. Comme notre but principal était d'observer la réaction des poulets aux challenges (événements) imposés, nous avons ensuite choisi comme paramètre principal l'item « animal en mouvement ». Dans cette série d'analyse de nos données comportementales, nous n'avons pas testé la reproductibilité des mesures. Notre but était en effet d'observer les réactions des poulets face à un événement. Ainsi, ne prendre en considération qu'une seule photographie avant l'événement constitue une limite à notre analyse, même si les mesures sont répétées par le nombre d'enclos étudiés. En revanche, le delta mesuré avant vs après l'événement permet d'observer les réactions immédiates. Ici effectuer plusieurs photographies suivies aurait constitué un biais par rapport à ce que nous voulions observer. Parmi les différentes méthodes (Martin et Bateson, 1986 ; Altmann, 1974) permettant la mesure du comportement animal, nous avons utilisé une variante du *scan sampling* et nous pouvions également envisager d'effectuer du *focus sampling*, ce qui aurait permis l'élaboration d'un budget temps des animaux.

Les tests de préférence ont été effectués dans la seconde série d'analyse. La méthode utilisée répond à la définition du *scan sampling* puisqu'une série de photographies ( $n=12$ ) a été prise à intervalles réguliers, dans un même lieu et sur le même animal. La limite à cette méthode est constituée par la diffusion du produit testé. En effet, notre dispositif

expérimental de permettait pas une diffusion mécanique de MHUSA (ou du placebo), comme décrit par Schaal *et al.* (2003). Cet essai a été effectué en ultime position au niveau du calendrier. Il se voulait démonstratif quant à la réactivité des poussins à MHUSA en situation de nouveauté. Il constituait une suite logique au vu des résultats de deux essais : les leurres et la physiologie. Nous avons fait le choix de n'utiliser que des poussins naïfs, de même souche et surtout de même âge, car la période sensible se situe aux environs de quatre jours d'âge des poussins (Collias, 2000). La distribution sur site de poussins d'élevage n'étant possible qu'une fois par semaine, nous avons opté pour une journée de travail, considérant que tous les animaux étaient d'âge équivalent. Répliquer l'expérience (pour augmenter le nombre d'observations) nécessite de travailler avec un autre lot de poussins pouvant impliquer un défaut de reproductibilité des conditions, mêmes si ces dernières sont maîtrisées.

Buitenhuis *et al.* (2002) indiquent des corrélations entre la corticostérone et le *picage* ou entre la corticostérone et les restrictions. Même si tout laisse à penser que ce type de comportement aurait été visible dans nos essais, nous avons choisi de ne pas faire apparaître le *picage* dans nos items comportementaux pour son origine plurifactorielle. Les conclusions des nombreux travaux sur le sujet montrent une influence du sexe ou du sexe ratio (Oden *et al.*, 2005), du type de sol (Hocking *et al.*, 2005) ou de la densité (Spinu *et al.*, 2003).

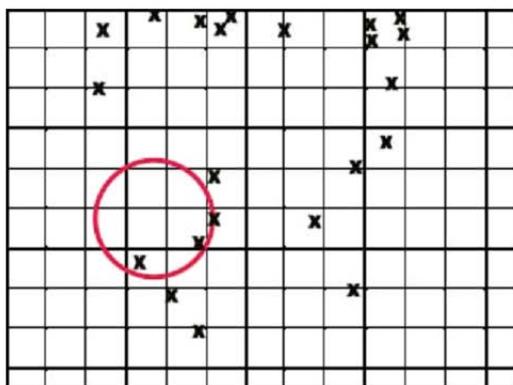
#### **4.3. Visualisation spatiale des poulets**

La répartition spatiale des oiseaux de rente est multifactorielle puisqu'elle dépend notamment de l'âge de l'animal et de l'événement auquel ce dernier est confronté (Channing *et al.*, 2001). Nous avons observé les mouvements des poulets suite à des événements imposés (*prédateur* et *visiteur*). Ensuite, par extension, la répartition spatiale des poulets permettait de corroborer les données issues des items comportementaux.

La taille d'une case de la grille avait été choisie pour permettre d'y inclure un poulet adulte. Augmenter leur taille aurait diminué la précision et la réduire aurait rendu trop fastidieuse la lecture. Il s'agissait juste de situer les animaux. Dans ce cadre, cette méthode peut être reconduite. Nous avons choisi d'effectuer cette séparation virtuelle des enclos (illustration 40). La zone neutre ne comprenait aucun objet pouvant attirer les poussins. Les résultats obtenus montrent que potentiellement cette zone pouvait servir de refuge, notamment lors de l'apparition du visiteur. En effet, ce dernier entrait par une porte se situant à l'opposé de la zone neutre. Toutefois, cette technique se retrouve dans les travaux de Woodcock *et al.* (2004) puisque ces auteurs permettent aussi aux poulets d'avoir accès à une zone similaire neutre. Le dispositif de visionnage gagnerait pourtant à être revu pour permettre un champ d'observation comprenant la totalité de l'enclos. Cette option aura toutefois le désavantage de diminuer la qualité de l'image et l'observation détaillée des poussins peut s'en trouver compliquée. Observer l'ensemble des zones pour pouvoir déterminer tous les comportements apparaît indispensable (Bizeray *et al.*, 2002). Cela a été le cas pour le tunnel de test, divisé en trois parties virtuellement distinctes et de taille identique (illustration 39). On peut penser que le gradient de concentration du produit diffusé (MHUSA ou placebo) va en diminuant quand on se rapproche du centre du tunnel. En introduisant le poussin au centre, il est placé dans les conditions expérimentales les moins avantageuses puisque dès lors il peut potentiellement percevoir MHUSA, et donc être « rassuré », il n'aurait alors aucun avantage à se diriger vers une zone de plus forte concentration en MHUSA. Néanmoins il semble que la source de diffusion de MHUSA influence le comportement. Cette méthode du « tunnel » apparaît dès lors intéressante pour étudier les doses efficaces de MHUSA.

#### Illustration 40 : exemple de grille de position

Les grilles de position ont été créées pour permettre d'avoir une situation géographique de chaque poulet dans son enclos.



- ⇒ Cercle rouge : alimentation
- ⇒ Chaque croix représente la tête d'un animal
- ⇒ Taille d'un carreau : 12cm x 20cm

#### 4.4. Utilisation des leurres

Nous avons utilisé deux types de leurres. Chacun avait des particularités et un objectif propre. Le *Prédateur* représente un outil de recherche fondamental et non appliqué car il reste rare en élevage. Le *visiteur* permet d'effectuer un parallèle avec l'éleveur ou le personnel d'élevage. Toutefois, nous avons opté pour le choix d'un visiteur inconnu des poulets (aucune ressemblance avec les animaliers).

#### 5. Particularité des paramètres sanguins

Pour notre première étude comportementale, nous avons pensé que le stress subi par les poulets était d'ordre chronique, c'est pourquoi nous n'avons pris en compte que le ratio hétérophiles/lymphocytes. Il aurait fallu effectuer des prises de sang après chaque événement (*prédateur* et *visiteur*) pour évaluer les taux de corticostérone (Clinchy *et al.*, 2004). Cela aurait représenté une manutention supplémentaire qui aurait entravé les fondements de l'essai. En effet, l'objectif de ce dernier était de laisser évoluer les poulets avec un minimum de contraintes, mis à part les événements. Pour les autres études, nous avons considéré que la contention suffisait à créer un stress à court terme (aigu) (Chamanza *et al.*, 1999), c'est pourquoi, en plus du ratio hétérophiles/lymphocytes, nous avons évalué les taux de corticostérone dans toutes les autres études.

#### SYNTHESE PARTIELLE

Les méthodes utilisées ont permis de mettre en évidence des effets de MHUSA. Ces dernières, inspirées d'études antérieures, ont nécessité des réajustements car la particularité de notre travail consistait en son caractère pionnier.

## Chapitre II : analyse des résultats

### 1. Aspects zootechniques

---

Les résultats zootechniques se présentent en quatre axes majeurs. D'abord, les animaux sont **plus lourds** s'ils sont élevés (depuis leur arrivée dans le bâtiment définitif) en présence de MHUSA. Ensuite, on constate que la variation qualitative de la viande n'est pas influencée par MHUSA : **couleur et quantité de gras ne varient pas** selon le traitement. Une troisième observation montre **une variation du pH de la viande moins importante** entre 24 heures et 6 jours *post mortem* si le poulet a reçu le traitement durant sa croissance. L'hypothèse majeure expliquant les différences de masse est une meilleure adaptation des animaux à leur environnement, sous MHUSA. Il est possible d'émettre ensuite des hypothèses secondaires. L'impact du stress semble réduit, comme montré par les résultats sanguins. L'organisation sociale et la hiérarchisation semblent moins perturbées sous MHUSA et les contraintes imposées par l'univers d'élevage ont moins de répercussions néfastes sur les animaux. Ces résultats sont en accord avec des observations effectuées dans des études similaires, testant l'influence d'un stress (par exemple Zuidhof, 2005 ou Campo *et al.*, 2005). Ainsi, les animaux sous MHUSA montrent une meilleure croissance dans tous les cas de figure et une qualité de viande identique pour les productions de type *Label*. Pour ces dernières, nous obtenons **un rendement carcasse plus intéressant** sous MHUSA, ce qui rejoint les conclusions de Mehaffey *et al.* (2006) indiquant, en plus de masses comparables, que la qualité de viande n'est pas corrélée avec le rendement en filet.

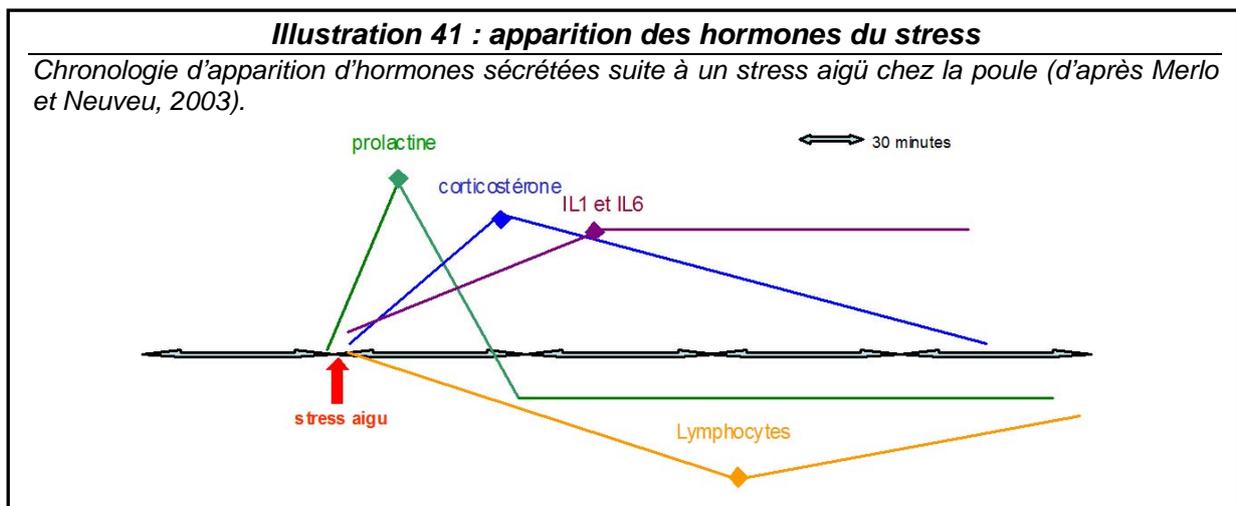
Testé en conditions maîtrisées, l'indice de consommation (IC) nous indique que si les poulets sont plus lourds (cas des *Standards*), ils **ne mangent pas plus** que les témoins. Toutefois, les animaux sous MHUSA sont plus lourds à un même âge, ce qui signifie que sur une année, il est possible de produire une quantité plus importante de viande si les animaux sont élevés avec MHUSA et abattus à un âge identique. Les résultats de Mc Glone et Anderson (2002) chez le porc montrent qu'une substance similaire à MHUSA (la phéromone apaisante maternelle de truie ou *Pig Appeasing Pheromone*) stimule la prise de nourriture et le gain de poids des porcelets. De plus, Bohus *et al.* (1987) montrent l'existence d'une relation entre le niveau de stress et la prise de nourriture chez certains mammifères, ce qui est repris et confirmé par Tachibana *et al.* (2007) pour la volaille, indiquant la corrélation positive entre le degré d'anorexie et le niveau de stress. Un poulet sous MHUSA est moins stressé et présente, si ce n'est une meilleure efficacité alimentaire (mesurée par l'IC), une meilleure conversion de l'aliment puisque ce dernier semble principalement utilisé pour l'anabolisme protéique. En effet, nous notons des niveaux de triglycérides sanguins similaires entre animaux traités et placebo, ce qui tend à montrer que le taux de matière grasse corporelle est similaire entre les deux traitements (Oh *et al.*, 2007). D'abord, cela rejoint les observations montrant des masses de gras abdominal similaires selon les traitements MHUSA ou placebo. Ensuite, les analyses de couleur de viande tendent à indiquer que les filets sont moins gras (car moins jaunes) si le poulet a été élevé sous MHUSA. On peut finalement conclure à une **qualité globale améliorée** avec l'utilisation de MHUSA, si l'on prend toutes les données mesurées en considération.

### 2. Aspects physiologiques et indicateurs sanguins

---

Nos résultats montrent que, dans une situation particulière de stress, la **stimulation des caractères immunitaires est moins importante** si les poulets évoluent sous MHUSA.

Nous observons aussi une **activation moindre de l'axe hypothalamo-hypophysaire** sous MHUSA (illustration 12). Les résultats obtenus en utilisant la technique du *Western Blot* sont révélateurs, au même titre que le ratio hétérophiles/lymphocytes et la mesure de la corticostéronémie. Ils montrent aussi que la durée de l'épreuve provoque une variation (augmentation) des taux circulants de corticostérone. D'après les observations de Schneider *et al.* (2001), cette augmentation peut être interprétée comme une conséquence de l'augmentation de la production d'interleukines. Cela signifie que la durée du test est suffisamment longue pour entraîner une surproduction d'interleukines. Le test, tel que nous l'avons utilisé, s'avère donc efficace par rapport à nos objectifs. Une compilation de données chez des mammifères sur les effets d'un stress aigu nous indique que la latence de sécrétion observée dans notre procédé expérimental diffère chez les volailles, mais que les ordres d'apparition sont chronologiquement comparables (Merlot et Neuveu, 2003 ; illustration 41).



Le ratio hétérophiles/lymphocytes ne montre pas de différence pour deux études sur les huit conduites, les taux de corticostérone sont toujours inférieurs sous MHUSA. Il semble donc que l'efficacité de MHUSA soit plus reproductible pour des stress aigus, comme la contention (Chamanza *et al.*, 1999). Néanmoins ces deux marqueurs fondamentaux indiquent que **MHUSA réduit l'impact du stress**. L'hypothèse selon laquelle la taille du groupe ne permet pas une hiérarchisation sociale, entraînant un stress (Bilcik et Keeling, 2000) n'est pas validée dans notre cadre d'étude. Il en est de même pour l'absence des bains de poussière, démontrée comme frustrante (Appleby *et al.*, 1993). En effet, les différences de systèmes d'élevage et d'expérimentation étaient trop prononcées pour y parvenir. L'incidence du stress sur les marqueurs sanguins semble moins prononcée pour les poulets *Label*, ce qui paraît logique étant donné leur mode d'élevage (illustration 4).

### 3. Aspects comportementaux

Suite à un stress, les réactions sont différentes selon que des poulets se trouvent ou non sous MHUSA. MHUSA semble pouvoir **diminuer la réponse au stress** symbolisé par un bruit (pour le poussin) ou un objet volant (chez l'adulte). La **peur est moins accentuée** si un poulet (ou poussin) est sous MHUSA. Globalement, les résultats montrent que les animaux sous MHUSA sont plus capables de s'approprier et de s'habituer à leur environnement. Leur bien-être apparaît amélioré, comme l'indique par ailleurs la meilleure croissance pondérale.

Les poussins mettent au moins quatre minutes à réagir et à effectuer le choix entre MHUSA, le placebo, ou à ne pas bouger. Passée cette limite, on commence à observer une différence (toutefois non significative) dans les choix (illustration 33), le plus souvent en faveur de MHUSA (attirance). Le résultat global du test de choix montre que les poussins sont **significativement plus attirés par MHUSA**. Cette observation est notamment vraie dans l'instant qui suit la situation stressante, puis une minute après cet événement. Ces résultats recourent ceux des situations mettant les poussins en présence du *prédateur* (surtout) et du *visiteur* (dans une moindre mesure). En effet, une situation stressante entraîne une réaction particulière de l'animal selon le traitement. Il a tendance à choisir un lieu lui rappelant sa fratrie. Cela se concrétise par une attirance vers MHUSA (test de choix) ou en formant des groupes (cas du placebo, test des leurres).

Ce n'est pas obligatoirement le diffuseur de MHUSA qui attire les poussins, mais ce peut être un objet qui deviendra l'**empreinte** (et/ou l'**attachement**). Le poulet, isolé et au stade poussin, se dirige vers le bloc MHUSA, alors qu'un poulet se regroupe avec d'autres poulets s'il en a l'opportunité. Cela peut signifier que l'empreinte est déjà établie dans le test sur poulets, alors qu'elle ne l'est pas encore pour les poussins (Collias, 2000). Ainsi l'être d'attachement pour le poulet peut devenir, par défaut, un poulet (un autre, quel qu'il soit) alors que le poussin naïf semble plus prompt à **se rapprocher d'une substance comparable à celle diffusée par la mère** (MHUSA), lorsqu'il est encore dans une phase sensible d'empreinte (Suge et Mc Cabe, 2004).

Les différents travaux effectués sur l'importance et l'influence de la taille des groupes sur le comportement des poulets (et par conséquent leurs performances quand il s'agit d'élevages) classent le plus souvent les groupes en fonction de leur taille. Les notions de « grand groupe » ou de « très grand groupe » définies par Bilcik *et al.* (1998) indiquent que nous nous rapprochons de ces notions dans les essais menés en élevage (4000 poulets au moins par bâtiment). De plus, des résultats montrent la relation entre la **taille du groupe** et la peur (Skinner-Noble *et al.*, 2003) ou les conflits (Bilcik *et al.*, 1998), et entre le **nombre d'entités** et les agressions (Cornetto *et al.*, 2001). Si l'on considère les dégradations observées sur les poulets *Lourd* (déclassement de carcasses à l'abattoir), on peut suggérer qu'il existe aussi une corrélation entre stress (sous le placebo), taille du groupe, nombre d'entités et agressions. Néanmoins, nous n'avons pas utilisé l'item « entité » dans nos tests. Parce qu'une entité se compose d'un harem (Hale, 1962), cela aurait été trop fastidieux en élevage et difficilement réalisable avec des effectifs de petite taille ne permettant pas la création d'entités (cas des tests en station : 40 poulets au maximum par enclos). Nous avons considéré le nombre de « regroupements » et non leur taille ou leur composition.

#### **4. Liaisons entre les résultats observés**

---

La corticostérone circulante et le ratio hétérophiles/lymphocytes ont été étudiés sur poulets adultes. Ils ont constitué le **fil rouge** de nos observations et permettent de définir l'état de stress des poulets. Les résultats entre les essais sont concordants et permettent d'établir des comparaisons. Les réponses comportementales observées nous permettent de cerner visuellement les effets directs de MHUSA comme la préférence pour celle-ci chez des poussins naïfs, alors que les résultats montrent aussi une réponse physiologique chez des adultes.

Le poids des animaux en fin de bande (ce qui intéresse finalement l'éleveur et l'industriel), montre un lien entre les masses observées et le comportement des poulets. En effet, les études comportementales montrent que les poulets sont plus lourds sans pour autant montrer une assiduité plus grande autour de la mangeoire. L'étude sur l'indice de

consommation laisse penser que des poulets sous MHUSA utilisent à meilleur escient chacune des visites à la mangeoire. Il semble qu'ils aient la capacité de mieux « gérer leur temps ». Il n'y a **pas de dépense superflue** incluant des allers et retours à la mangeoire et chaque visite devient efficace.

Nos avons observé des écarts de **qualité** du produit final. Nos résultats indiquent que la différence de masse n'est pas due à un surplus de gras et nous avons montré que les filets étaient plus lourds lorsque les poulets avaient été sous MHUSA durant leur croissance. Ainsi, les poulets optimisent-ils leur nourriture car ils ne sont pas en situation d'alerte permanente. Selon Rosales (1994) il existe une corrélation entre la corticostérone (CS), l'indice de consommation (IC) et la glycémie. L'auteur montre que des poulets stressés (CS élevée) ne peuvent être plus lourds en fin de bande que s'ils mangent plus (vérifiable par la mesure de la glycémie). Leur IC en devient plus haut (ou équivalent), donc moins intéressant (trop d'aliment ingéré pour le gain de poids observé). Cela est appuyé par le fait que CS et catabolisme sont positivement corrélés (Mumma *et al.*, 2006).

Evoquons ici l'hypothèse selon laquelle les poulets qui ont un meilleur IC sont plus actifs, plus peureux et déposent moins de gras (Skinner-Noble *et al.*, 2003). Nos résultats comportementaux montrent une plus grande activité des individus sous placebo (illustration 37), en face d'un stress susceptible d'engendrer la peur (*prédateur* et/ou *visiteur*). Comme le dépôt de gras et l'IC ne sont pas différents entre les groupes, les différences comportementales expliquent les différences des poids vifs, carcasses et filets. Cet enchaînement de réflexions corrobore ce que nous avons démontré en mesurant les triglycérides. Comme ces mesures reflètent la synthèse lipidique (Sanler et Yabanci, 2007) et que nous n'avons pas constaté de différences entre les deux groupes de traitement pour les triglycérides, une plus grande proportion de muscle expliquerait l'écart de poids. Cette observation va dans le sens d'une **utilisation de la nourriture pour l'anabolisme protéique**, expliquant les observations sur les poids de filet.

Nos résultats indiquent une situation de stress différente entre des densités de 11/m<sup>2</sup> (*Label*) et de 20/m<sup>2</sup> (*Standard*). Notons que les *Label* ont accès à un parcours, ce qui accentue potentiellement la différence de densité entre les deux types d'élevage. Partant du principe que la **densité constitue un stress** (observations de Hughes et Black, 1974 ; et plus récemment de Spinu *et al.*, 2003), nos résultats sont en accord avec ceux de Dozier *et al.* (2005) montrant une diminution du poids des poulets, sans variation du taux de matière grasse en fonction de la densité. Les auteurs concluent que pour différents critères de performance, une densité au-delà de 30 kg par m<sup>2</sup> est néfaste à la productivité. Comparativement à nos travaux, cela correspond à environ 15 têtes par m<sup>2</sup> ce qui peut expliquer la différence entre les résultats obtenus en *Standard* et en *Label* : l'impact de MHUSA est plus important en *Standard*. Cela rejoint également les conclusions de Berri *et al.* (2005), montrant qu'un stress de densité entraîne une variation des poids des filets. **Ainsi, MHUSA diminuerait l'importance du stress dû à la proxémie.** Si la taille du groupe et la densité ont une relation avec la peur, on ne connaît pas l'importance de l'une par rapport à l'autre. Il est difficile de savoir si l'on observe, comme montré par Thaxton *et al.* (2006), que la compétition pour l'accès à la nourriture entraîne une augmentation de la corticostérone car le groupe est trop important ou parce que la densité est trop forte.

Un diffuseur MHUSA pour 50m<sup>2</sup> avec une densité de 20 poulets par m<sup>2</sup>, est suffisant. Nous montrons des résultats similaires (croissance, indicateurs de stress) avec un diffuseur par enclos d'une dimension 25 fois inférieure. Il semble donc qu'il n'existe **pas d'effet de surdose** de MHUSA induisant un arrêt de la réponse, par analogie avec des travaux sur la température (Aksit *et al.*, 2006), la lumière (Campo et Davila, 2002a) ou la densité (Bilcik *et al.*, 1988). Nos observations rejoignent les conclusions de Dorhoi *et al.* (2008) sur

l'incidence d'extraits de plantes sur la réponse immunitaire chez la volaille (pas de surdosage).

Les différences observées entre les sexes ou les souches ne permettent pas de statuer sur l'effet de MHUSA. Des études montrent un effet sexe sur la réponse à la peur, selon le type de stress (Fluck *et al.*, 1996). On peut se poser la question de la différence entre les sexes au sujet du nombre d'animaux morts par étouffement observée dans notre étude sur les poulets *Lourd*.

## **5. Impact et hiérarchisation des facteurs étudiés**

---

Effectuer un classement des effets de MHUSA en fonction de la réponse est difficile, tant il semble que tout soit lié et que des clés d'interprétation nous manquent. Pourtant, nous pouvons avancer que le **gain de croissance** constitue le facteur le plus influencé par MHUSA. Si cette composante est primordiale pour le secteur de la production, il faut toutefois noter qu'il s'agit d'une réponse multifactorielle. Comme nous l'avons indiqué il existe un lien entre toutes les réponses à MHUSA. La croissance, caractérisée par le poids vif en fin de bande doit alors être perçue comme une combinaison de réactions que nous avons classées en trois thèmes distincts : physiologie, comportement et zootechnie.

La somme des stress perçus par le poulet depuis sa naissance a induit chez cet individu un cortège réactionnel. Celui-ci implique des répercussions physiologiques et comportementales permettant à l'animal de retrouver un état normal (homéostasie). Le fait que nous ayons travaillé sur des individus en croissance montre que l'énergie utilisée pour des **comportements anormaux** (agitations, stéréotypies...) n'est pas conservée pour la croissance, ce qui entraîne une altération du bénéfice de la prise alimentaire (cas des groupes témoins).

Il ressort de notre travail des facteurs discriminants. Les **critères sanguins** (corticostérone CS et ratio hétérophiles/lymphocytes HLR) sont de bons indicateurs pour des poulets élevés à forte densité (*Standard* et *Lourd*). Les critères de **qualité de viande** sont également à retenir, même s'ils ne sont représentatifs que d'un type de poulet (*Label*). On notera à ce sujet une ambiguïté : la différence entre MHUSA et placebo est observable sur la qualité de viande, mais pas sur HLR. On peut alors supposer que la qualité de viande est un critère plus sensible que HLR. D'autant plus que le nombre d'individus utilisés pour aboutir à nos résultats était plus faible pour les critères qualitatifs (n=80) que sanguins (n=220). Nous pouvons trouver un indice de réponse dans l'étude de Vleck *et al.* (2000), qui montre que chez des espèces sauvages (*Pygoscelis adeliae*), une contention, même répétée, ne fait pas varier significativement HLR, à cause d'une variation interindividuelle élevée, ce qui entraîne un fort écart-type. Cette notion, reprise par Mormède *et al.* (2007), évoque l'importance de la taille de l'échantillon pour les paramètres sanguins de stress.

Selon Mc Kee et Harrison (1995), la consommation d'aliment et l'efficacité de la ration diminuent proportionnellement au nombre de facteurs de stress. Plus ces derniers sont nombreux, plus la prise de poids est affectée. Les auteurs concluent sur l'existence d'un effet cumulatif du nombre de facteurs de stress. La **qualité et la quantité des facteurs de stress** doivent donc être prises en compte. Si l'accumulation de différents stress entraîne des conséquences remarquables chez le poulet, il semble aussi exister des **seuils** induisant des réactions spécifiques pour chacun de ces facteurs (Estevez, 2007). Il convient de prendre en compte chaque type de stress, son poids et ses valeurs seuils.

## **6. Importance des protocoles expérimentaux**

---

Ce travail sur MHUSA doit être compris comme **pionnier** dans l'analyse de l'action de ce sémi chimique chez *Gallus gallus*. Lorsque les protocoles expérimentaux ont été mis en place, les latitudes de variation sur les critères étudiés n'étaient que peu, voire pas connues. En effet, prévoir par exemple la différence de poids vif à 35 jours sur des poulets *Standard* était hypothétique. Nous avons donc travaillé sans données bibliographiques, *de novo*, avec la plupart des critères. Cela a eu une importance sur le choix de la taille des effectifs à tester. Des résultats, proches de la signification statistique, auraient potentiellement pu montrer une différence avec une multiplication des échantillons étudiés. Se posait le dilemme suivant : multiplier les essais (type multicentrique) ou étudier plus d'animaux sur un seul essai ? Nous avons fait le choix de travailler en monocentrique.

Les essais présentés ont principalement été menés sur des échantillons et les résultats obtenus ont fait l'objet d'un test de signification. Cela a permis de vérifier que les écarts constatés entre les deux traitements peuvent résulter de simples fluctuations d'échantillonnage. Dans les tests de signification, deux risques sont considérés. Le risque de première espèce (risque *alpha*) qui est le risque de conclure à une différence entre les deux traitements alors que cette différence n'existe pas, est toujours fixé à 5%. Le second risque pris en compte est le risque de deuxième espèce (risque *bêta*), ou défaut de puissance, qui consiste à considérer inactif un traitement en réalité actif. Nous en revenons à l'idée évoquée au paragraphe précédent : l'importance de **la taille des échantillons**, notamment par rapport au risque *bêta*. Si dans nos études nous avons fixé *alpha*=5%, nous n'avons jamais contrôlé le nombre de répétitions nécessaires pour avoir réellement *bêta*<5%. Ce calcul se révélerait nécessaire si nous voulions calculer un nombre d'échantillons nécessaire. Notre étude étant pionnière dans l'évaluation de l'effet d'un sémi chimique chez la volaille, nous avons utilisé des références existantes quant aux effectifs à considérer pour prouver un effet traitement. Les données de base n'existant pas, nous ne pouvons pas considérer un risque de deuxième espèce.

#### SYNTHESE PARTIELLE

Des poulets domestiques évoluant dans une atmosphère contenant MHUSA montrent des performances, une réaction immune et des comportements différents de leurs pendant sous placebo. Nous ne pouvons qu'émettre des hypothèses quant aux liens éventuels entre ces résultats.

# Chapitre III : extension du travail

## **1. Approfondir les résultats acquis**

---

### **1.1. Physiologie et paramètres sanguins**

Dans un prochain test, nous conserverons les mêmes critères d'évaluation en utilisant les trois situations décrites dans notre essai qui additionnait contention, transport et isolation, mais de manière indépendante. Nous pourrions mesurer l'importance de chaque situation par rapport aux autres et ainsi savoir si c'est la conjugaison des trois qui amène aux résultats obtenus, ou bien si une situation en particulier apporte un stress suffisamment important provoquant des perturbations endocriniennes. D'après les travaux effectués sur les trois types de stress (Nijdam *et al.*, 2004 ou Saito *et al.*, 2005, par exemple), l'isolement constitue un stress supérieur aux deux autres. Nous envisageons de commencer à travailler avec ce dernier et ensuite de réduire l'importance du stress.

Une contention prolongée du poulet aura des répercussions sur des paramètres observables à court terme, comme la corticostérone. Les dosages demandent des quantités de sang plus importantes que d'autres. Travailler sur divers paramètres pourrait alors, sinon devenir dangereux pour l'animal, agir du moins sur son métabolisme, notamment sur la pression osmotique. Ces notions sont à prendre en compte selon le type d'étude à pratiquer et son objectif, notamment si l'on utilise des animaux jeunes, donc avec un volume sanguin limité. Du prélèvement de sang on extraira le plasma que l'on aliquotera pour les différentes analyses. Un échantillon de 200µl suffit pour déterminer la concentration de l'indicateur recherché. En effet, les techniques d'analyse sont aujourd'hui assez fines et précises pour permettre une détection avec peu de matériel sanguin. La séparation du sang pour obtenir le plasma se fera par centrifugation comme nous l'avons effectué dans toutes nos expérimentations. Les aliquots serviront à dupliquer les résultats si besoin, ou alors de réserve. Pour approfondir les résultats sur les paramètres sanguins, nous effectuerons des prélèvements en quantité plus importante pour analyser des facteurs tels que les taux de cholestérol, de glucose ou de triglycérides. En effet, on montre que le stress, dans des conditions induites (Mumma *et al.*, 2006), de forte densité (Dozier *et al.*, 2005) ou de compétition pour les ressources (Thaxton *et al.*, 2006) entraîne des variations de ces paramètres, liées avec la corticostérone (CS) et le ratio hétérophiles/lymphocytes (HLR). Utiliser cette technique nécessite aussi d'avoir un volume de sang plus important avec des tubes à prélèvement de nature différente selon le paramètre à tester.

Les études prévues se basent uniquement sur des critères sanguins. La croissance (par exemple) ne rentrera pas en ligne de compte car elle peut être biaisée. On peut imaginer ne conserver que HLR, CS et un critère supplémentaire à chaque fois, afin de limiter les prises de sang et de se baser sur ce que nous avons déjà observé. Il peut aussi être envisagé de répliquer les groupes équivalents d'animaux, avec des prélèvements de HLR et CS pour tous les groupes, et un facteur supplémentaire, différent entre les groupes, toutes choses égales par ailleurs. Cette dernière méthode a le mérite de tout faire en parallèle, sachant qu'il faudra établir un paramètre principal. Les résultats encourageants décrits dans la partie expérimentale relative à la physiologie nous permettent aussi d'utiliser des *Acute Phase Proteins* (APP), notamment dans le cadre de l'étude des

conséquences du stress sur l'immunité, puisque des APP sont synthétisées parallèlement à des interleukines (Holt et Gast, 2002).

## **1.2. Présence étrangère**

Il semble indispensable d'observer les réactions des animaux vis-à-vis d'un visiteur connu. Cela permettra de se rapprocher des conditions habituellement retrouvées en élevage. Nous pouvons aussi approfondir les résultats plus fondamentaux sur le *prédateur* en testant la réponse à différentes formes de prédateurs. En effet, une étude récente, contrairement aux travaux historiques utilisés pour monter nos protocoles, montre que la réponse au passage du *prédateur* dépend de la forme de celui-ci (Palleroni *et al.*, 2005). Dans cette étude, il s'agit d'une réponse de poulets adultes au passage du *prédateur* en présence de la progéniture.

Le test d'Immobilité Tonique (TI) a été repris pour mesurer la réaction des volailles à un stress se rapprochant de celui représenté par un prédateur. Des comparaisons ont notamment été effectuées entre TI et HLR (Campo et Davila, 2002a). Elles montrent que TI est fonction de la peur, alors que HLR dépend du stress. De plus, il existe une forte variation inter souche pour TI, qui est plus corrélée avec les capacités locomotrices des poulets (Campo *et al.*, 2000). Si nous pouvons envisager de pratiquer des tests de TI, il convient de garder à l'esprit la lourdeur de la durée du test. Le score maximal est de 300 secondes, ajoutées aux 10 minutes initiales : 25 minutes au maximum par poulet. Ce travail peut s'avérer intéressant afin de mesurer des corrélations entre des valeurs comportementales issues de réactions de fuite (donc de peur), notamment dans le test en présence de leurres et dans le test d'immobilité tonique.

Les travaux de Lorenz sur le lien attachement incitent à pratiquer des tests fondamentaux visant à mesurer ce lien. Nous pouvons coupler la présence de MHUSA (lien d'attachement supposé) avec diverses situations. Nous suggérerons, selon les travaux existants, de travailler sur la couleur (Maekawa, 2006), le mouvement (Bolhuis et Honey, 1998), les formes (Vallortigara *et al.*, 2005), le son (Collias, 2000), ou encore l'odeur (Roper et Marples, 1997). Cette dernière notion reste particulière du fait du sémiochimique que nous utilisons dans nos travaux. En effet, les mécanismes mis en jeu sont probablement en relation avec le système olfactif. Ainsi, travailler avec des odeurs prend en compte cette observation mais peut permettre d'évoluer vers le statut attribué à MHUSA (sémiochimique, phéromone, odeur...).

## **1.3. Qualité de viande**

Les résultats zootechniques, MHUSA vs placebo, en conditions d'élevage, sont comparables entre *Label* et *Standard* (gain de poids). De plus, nous montrons une diminution de l'impact du stress sous MHUSA en *Standard* comparable à celle observée en *Label* (ratio hétérophiles/lymphocytes, corticostérone et croissance). Il est donc logique d'émettre l'hypothèse que l'impact de MHUSA sur la qualité de viande des poulets *Standard* est comparable à celle observée pour les *Label*. Nous pouvons le mesurer. Les paramètres de qualité de la viande ont vu leur technique évoluer suite à une demande provenant du secteur de production, lui-même sous influence des consommateurs. Le retour aux « bonnes choses » et au « manger sain » y a contribué. Ces techniques, associées aux recherches sur le BEA, ont permis d'établir des corrélations entre l'état physiologique du poulet et la qualité du produit final.

Nous pouvons tester l'influence de MHUSA en élevage et ensuite mesurer différents paramètres associés à la qualité, qui seront retenus comme paramètres principaux. Aksit

et al. (2006) évaluent par exemple la composition de la viande en nutriments : glycogène, collagène, teneur en eau, en protéines et minéraux. Les mêmes auteurs mettent dans la rubrique « qualité de viande » ce que nous avons évalué : pH et couleur. Les paramètres susceptibles d'être étudiés (en plus de ceux que nous avons énumérés dans nos travaux) demandent une technologie adaptée. Mesurer la teneur en glycogène des muscles ou la résistance des fibres musculaires ne peut en effet être effectué avec un matériel facile d'accès comme cela a été le cas pour le gras abdominal ou la couleur des filets, par exemple.

Il existe une homogénéité de qualité de viande, en terme d'âge, de taille ou de sexe dans les résultats existants (Cavitt et al., 2005). Cela permet d'envisager de travailler sur un nombre restreint d'individus. Ainsi, nous diminuerons notre temps de travail et le coût des essais. Chez la volaille, la variabilité du pH ultime (à 24h *post mortem*) est plus faible que celle de la vitesse de chute du pH (estimée par une mesure précoce, à 15min *post-mortem*). Dans la mesure où la vitesse de chute du pH peut être à l'origine de l'apparition des viandes de type pisseuses, dites PSE (Berri et Jehl, 2001), la mesure précoce du pH est plus importante pour la qualité de la viande de volaille que celle du pH ultime. Comme, nous n'avons pas mesuré la vitesse de chute du pH, nous effectuerons celle-ci sur un lot complet à l'abattoir ou sur site sur un lot qui serait adapté, en effectif, aux mesures envisagées et aux différences recherchées.

Dans le contexte actuel des pays développés, il semble judicieux de coupler les résultats obtenus par des méthodes instrumentales avec des évaluations sensorielles. Cela permet d'évaluer la mesure de la couleur des viandes (par exemple). Cette analyse globale liera une approche subjective et une autre, analytique.

#### 1.4. Indice de consommation et rentabilité

En se plaçant dans une optique financière, tout porte à croire qu'en cas de stress la rentabilité de l'élevage est atteinte. L'indice de consommation (IC) est perturbé et la mortalité est accentuée (Buitenhuis et al., 2002). De plus, il existe une corrélation entre le Taux de Viande Maigre (TVM) et la vitesse de croissance (Alleman et al., 1999).

La rentabilité économique de MHUSA s'établit selon deux approches. En premier lieu elle doit tenir compte de ce que l'animal sous MHUSA atteint un poids identique en ingérant moins, ou autant, que son pendant non traité. La seconde approche est la suivante : le poids vif adulte (pré-fixé par l'industriel) est atteint plus rapidement, avec une quantité d'aliment ingérée identique. En effet, un PV final identique est consécutif à une ingestion d'aliment plus importante, et un indice de consommation identique peut correspondre à des poids finaux différents (illustration 42).

**Illustration 42 : calcul théorique d'un indice de consommation**

On observe la relation entre la croissance de l'animal et l'aliment consommé (Indice de Consommation : IC). Relativement aux quantités d'aliment, les valeurs de l'IC varient selon la masse prise par l'animal sur la durée d'élevage (fixée ici à 40 jours).

	PV J0-J40 <sup>1</sup>	Alim/J <sup>2</sup>	Alim J0-J40 <sup>3</sup>	IC <sup>4</sup>
	1800	80	3200	1,8
	2000	80	3200	1,6
	2200	80	3200	1,4
PV identiques	1800	100	4000	2,2
	2000	100	4000	2
	2200	100	4000	1,8
	1800	120	4800	2,7
	2000	120	4800	2,4
	2200	120	4800	2,2

IC identiques

<sup>1</sup>PV : gain de Poids Vif (g) de la naissance (J0) à l'abattage (J40) ; <sup>2</sup>Alim/J : Aliment consommé par jour (g) ; <sup>3</sup>Alim J0-J40 : quantité totale d'aliment consommée (g) de la naissance (J0) à l'abattage (J40) ; <sup>4</sup>IC : Indice de Consommation.

Travailler sur l'IC en élevage industriel est difficile dans le sens où les quantités d'aliment ingérées ne peuvent être mesurées à l'échelle de l'individu, car il existe le plus souvent un unique silo par bâtiment. Un calcul de rentabilité de l'action de MHUSA pourra être effectué lors d'un essai de type multicentrique (voir par ailleurs). Une seconde idée consiste à reprendre les résultats (expérimentaux) que nous avons obtenus comme base de travail et à voir si la rentabilité annuelle d'un élevage (théorique) est améliorée. Même avec des IC comparables, on peut penser que si les animaux atteignent leur poids d'abattage plus tôt, le nombre de bandes (rotations) par année sera supérieur. Cela aboutirait à une augmentation quantitative des ventes. Le calcul devra alors être fait pour connaître la rentabilité annuelle de l'élevage. Pour être positif, il faudra que les ventes supplémentaires dépassent financièrement les dépenses afférentes à l'élevage de ces poulets supplémentaires, en plus du coût de MHUSA.

Nous envisageons d'effectuer un essai en station expérimentale en prenant l'animal comme unité statistique, en utilisant des cages individuelles. Un premier inconvénient de cette méthode, plus précise, est son coût. Un second est son manque de crédibilité économique vis-à-vis des producteurs. Néanmoins, elle permet de faire une mesure de la quantité de protéine fixée par l'organisme. Nous pouvons à ce titre utiliser la technique décrite par Kalinowski *et al.* (2003), qui consiste en la récolte des excréta, leur mesure et à faire une différence entre apports et rejets.

### **1.5. Effectuer un suivi longitudinal**

Un suivi longitudinal peut être effectué à deux niveaux. Envisageons d'abord l'étude de variabilité individuelle : il doit être effectué à l'échelle de l'animal. On note à ce titre l'importance du développement précoce sur les performances futures. Si les poussins ingèrent plus et plus tôt, ils ont une meilleure croissance, un meilleur gain de poids moyen (GMQ) et une mortalité plus faible, ce qui est notamment reflété par la corrélation entre le poids vif à 21 jours et celui à 42 jours (Gonzales *et al.*, 2003). Effectuer un suivi sur des poulets de la naissance à l'abattage nous permettra de déterminer si MHUSA influence périodiquement, à des stades précis, dans des situations précises, ou de façon continue l'état des poussins.

Pour vérifier la présence ou l'absence de stress chronique dans l'élevage, l'étude d'une cinétique de la corticostéronémie sera intéressante (Post *et al.*, 2003). Elle apportera une information supplémentaire à la mesure de HLR. Dans les élevages, cela sera difficile pour des raisons pratiques. Il faudrait en effet prélever à chaque fois les mêmes animaux pour avoir un suivi longitudinal (car la variation interindividuelle est importante). De plus, les lésions engendrées correspondent à des critères de déclassement à l'abattoir. On peut envisager d'effectuer ce type de suivi sur site expérimental, avec un effectif restreint.

Effectuer un suivi longitudinal sur un même élevage, sur différentes bandes, en étudiant des critères non invasifs, constituera une ouverture pour une méta-analyse. Travailler sur l'IC, en conditions reproductibles, nous permettra d'effectuer la corrélation entre augmentation des agressions avec l'âge et taille du groupe (et/ou des entités) comme montré par Cornetto *et al.* (2001).

Dans les études (effectuées en élevages) présentées dans la partie expérimentale de ce travail, le traitement a été stoppé dès le ramassage des animaux pour les mettre dans les caisses, puis le camion de transport. Les blocs restaient dans le bâtiment au moment de l'enlèvement des volailles. L'efficacité de MHUSA n'a donc pas pu être testée vis-à-vis des stress que représentent le transport et l'arrivée à l'abattoir. Cela représente un paramètre supplémentaire qui fera l'objet d'une étude appropriée. Ce paramètre peut être la mortalité, les griffures ou encore le nombre de poulets morts étouffés. L'idée plus générale

de suivi longitudinal serait de suivre les poulets depuis leur éclosion, jusqu'aux études *post mortem*.

### **1.6. Mesurer l'effet sexe**

Nous avons mis en évidence un effet sexe pour le taux de corticostérone et pour le ratio hétérophiles/lymphocytes (HLR), qui semble physiologique. En effet, d'après les travaux de Hazard et Guéméné (2005), on ne peut pas exclure qu'il n'existe pas d'effet différentiel des hormones mâles et femelles sur la réponse de l'axe corticotrope à la contention des animaux. Par ailleurs, des variations de HLR apparaissent à l'approche de la maturité sexuelle, le niveau minimum étant observé juste avant ce moment. Ces observations sont en faveur d'une relation entre le HLR et les hormones sexuelles, les mâles ayant des valeurs plus élevées que les femelles pour ce paramètre (Campo et Davila, 2002). A J80, âge auquel ont été réalisés des prélèvements sanguins, les animaux étaient proches de leur maturité sexuelle, ce qui peut expliquer, dans ce cas, les résultats observés.

Nous effectuerons des tests sur un nombre total d'individus plus important afin de mettre en évidence d'éventuelles différences significatives sur les critères d'étude choisis. Les travaux effectués sur ce sujet indiquent que l'on n'observe pas d'effet sexe sur les critères de qualité comme le pH ou la luminosité de la viande (L\*) (Cavitt *et al.*, 2005). Fluck *et al.* (1996) montrent en revanche que le sexe influence la réponse à la peur dès la deuxième semaine de vie. Il est également évoqué un dimorphisme sexuel chez différentes espèces (dont les oiseaux) quant à la région du système olfactif accessoire permettant la capture des phéromones (Segovia *et al.*, 2006).

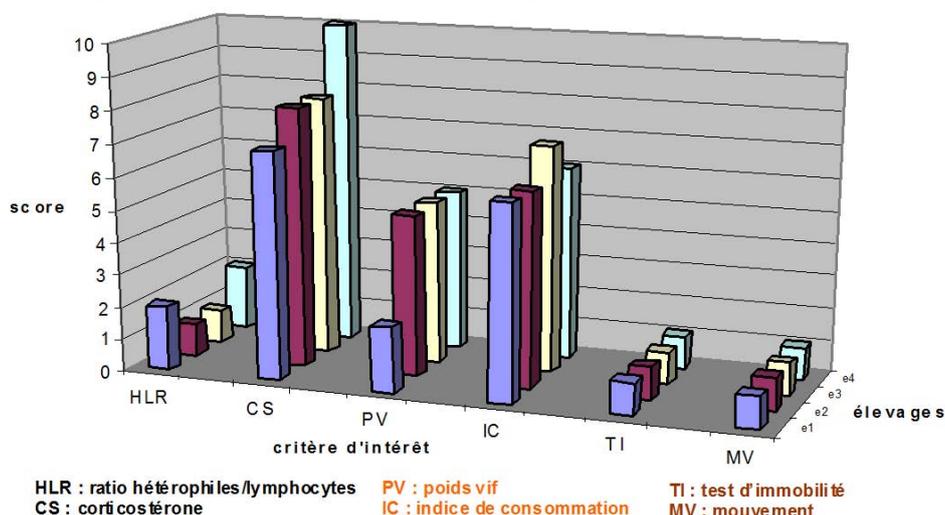
Ces observations nous permettent de penser qu'il existe des critères permettant d'affiner la détermination de l'action de MHUSA. L'étude du dimorphisme sexuel apparaît à ce titre comme une piste d'investigation intéressante.

### **1.7. Définir un modèle de travail**

Les conclusions issues des travaux de Puvadolpriod et Thaxton (2000b) serviront de base à une réflexion sur la création d'un modèle général (nommé modèle 1 ou M1) de mesure des paramètres de stress. Les auteurs ont en effet mesuré 42 paramètres de réponse adaptative à un stress induit. Ce dernier consistait en une diffusion constante d'hormone corticotrope (ACTH) dans l'organisme. Les données, après analyse et transformations statistiques, permettaient d'obtenir un score pour chacun des paramètres, comparativement à un groupe témoin. Cinq catégories ont permis de classer les 42 paramètres : morphologie, endocrinologie, métabolites sanguins, réponse endothéliale et digestion-métabolisme. Les auteurs montrent que les métabolites sanguins sont ceux qui subissent le plus de variations dues au stress. Cinq paramètres (HLR, CS, TRIGLY, CHOL, GLU) parmi les dix plus hauts scores sont issus de cette dernière catégorie. Le type de stress employé ne correspondait pas à notre logique de travail qui voulait utiliser les stress existants en conditions naturelles ou d'élevage. Nous découvrons que les répercussions engendrées par la diffusion d'ACTH dans l'organisme de l'animal sont similaires à ce que nous avons trouvé, notamment dans nos travaux sur la mesure de l'IC. Nous envisageons de créer un score pour chacune des réponses que nous avons testées, ce qui permettra éventuellement de lisser les différences dues aux souches (voire aux espèces), modes d'élevage et autres conditions de vie. Nos trois catégories pour classer les paramètres existent déjà : zootechnie, physiologie et comportement. Chacune d'entre elles reprendrait les indicateurs que nous avons évalués comme étant les plus déterminants (illustration 43).

### Illustration 43 : modélisation du stress en élevage

Modélisation à partir d'un suivi (théorique) sur quatre élevages. A partir de ces données peut s'extraire un modèle mathématique de caractérisation du stress. En abscisses figurent les critères d'intérêt retenus et répartis en trois familles (physiologie en noir, performance en orange et comportement en brun) selon nos observations. En ordonnées figure le score retenu pour chacun de ces critères. Par exemple, l'élevage n°4 (e4 en bleu ciel) présente un score maximal de 10 pour le critère physiologique « corticostérome » et un score global de  $2+10+5+6+1+1=25$ .



Un modèle mathématique plus large que le précédent (nommé modèle 2 ou M2) peut être envisagé dans le sens où l'on pourrait y inclure toutes les variables ayant une influence sur l'homéostasie du poulet. Si cette optique est retenue, la pertinence de cette méthode de mesure indirecte peut être approchée par le calcul de  $R^2$  (pouvoir prédictif). Ce dernier traduit le lien entre l'indicateur mesuré (HLR par exemple) et le paramètre étudié (stress). Plus les variations de l'indicateur expliquent une forte part des variations du stress (ou de la réponse au stress), plus l'indicateur sera pertinent. Insérer toutes les variables (indicateurs) possibles dans un modèle global aboutit à la création d'un modèle relatif à des conditions particulières. Il faut choisir les variables les plus pertinentes en fonction de la situation. Une multiplication des cas et des observations sera indispensable pour aboutir à ce modèle général M2 (même idée que l'illustration 43).

Le premier modèle (M1) est plus restrictif mais plus ciblé, avec des portes d'entrée selon ce que l'on veut voir ou étudier. Le second modèle (M2) est général puisqu'il reprend toutes variables susceptibles d'être à l'origine d'un stress détectable selon nos critères. Notre modèle final se voudra une construction abstraite ressemblant à l'objet modélisé (*Gallus gallus*). Dans ce cas, les variables incluses dans le modèle permettent de caractériser le poulet (voire l'élevage). L'intérêt réside dans sa capacité à apporter une réponse aux questions qu'on se pose : caractéristiques de l'animal en réponse au stress. Cela nous renvoie à l'objectif assigné au modèle qui doit précéder et orienter la conception et la construction du modèle (modèle finalisé). Ainsi, parmi les modèles envisageables, traduisant chacun une image de *Gallus gallus*, un modèle particulier, optimal, sera préféré aux autres.

#### 1.8. Particularités d'un essai multicentrique

Effectuer un essai multicentrique, avec un plan d'expérimentation comprenant plusieurs lieux, permet de considérer le bâtiment (et non plus le poulet) comme unité statistique. Cet essai sera similaire à ceux effectués, mais chaque centre aura la même souche génétique de poulets puisqu'elle a une importance dans la réponse au stress (Dennis et

*al.*, 2006). On tiendra compte des facteurs de variation au sein d'un groupe de production. Par exemple, la corticostéronémie diffère selon les saisons, le régime alimentaire, la température ou l'hygrométrie (Mormède *et al.*, 2007). Cette notion de variation répond à la légitime question de savoir pourquoi ne pas regrouper toutes les valeurs sur un même critère, pour pratiquer une méta-analyse. Par exemple, pourquoi ne pas étudier tous les ratios hétérophiles/lymphocytes, toutes productions confondues ?

Les variations de souches, l'âge, les conditions d'ambiance ou les poids observés selon nos essais représentent autant de facteurs de variabilité non contrôlés qui induiront un bruit de fond éventuellement supérieur à l'effet mesuré. Nous pouvons ici, d'une façon plus générale, approcher l'aspect purement statistique des prochains essais. Nous aurons la possibilité d'utiliser les résultats acquis par ce travail pour calculer le nombre de sujets nécessaire (risque *bêta*), permettant de mesurer les différences dues au traitement MHUSA. Si l'on s'intéresse à un seul critère (ou un critère principal et des critères secondaires), ce calcul sera facilité. Si l'on souhaite mesurer divers indicateurs, il faudra envisager d'effectuer des corrections statistiques (de type Bonferroni par exemple).

## **2. Comprendre le mode d'action**

---

### **2.1. Interpréter la perception de MHUSA**

Si MHUSA peut remplacer la mère, nous pouvons comparer son action à celle d'une mère, soit adoptive, soit vraie. Cela permettra de comprendre ce que la mère apporte de plus que MHUSA. On peut aussi introduire un placebo pour différencier l'apport de MHUSA par rapport au placebo et à la poule. On suppose des différences d'activités entre poussins couvés et non couvés, comme montré par Falt (1997). Les écarts comportementaux entre un groupe sous MHUSA et un groupe avec la mère peuvent aussi logiquement provenir des cris. Des sons émis par la mère sont susceptibles, comme MHUSA, d'entraîner une réponse innée et spécifique, puisqu'il existe des cris de la mère auxquels répondent les poussins sans apprentissage (Bailey, 1983).

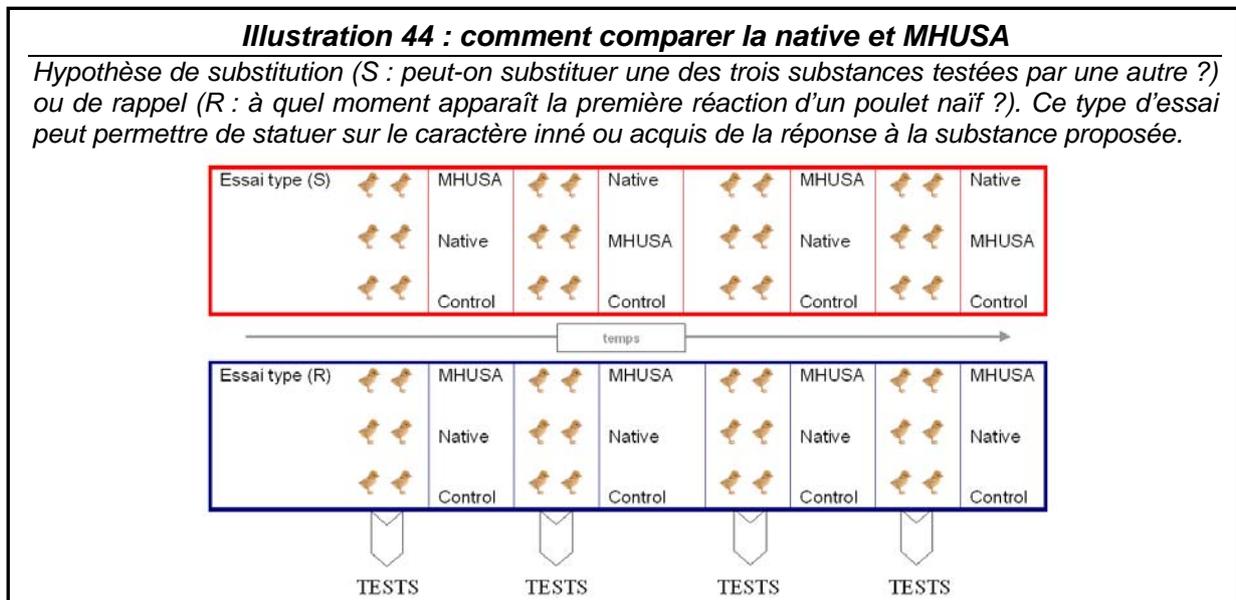
Nos travaux montrent que MHUSA permet le déclenchement d'une réponse inconditionnelle, probablement automatique. Les travaux de Schaal *et al.* (2003) sur le lapereau mettent en évidence que ce type de mécanisme possède la propriété d'imposer au jeune animal l'acquisition de tout odorant qui lui est associé. Ainsi, une odeur sans signification biologique, associée à un sémiochimique mammaire, devient capable de déclencher les mêmes réponses s'il est ultérieurement présenté sans le sémiochimique. Cette remarque nous permet de programmer des tests couplant MHUSA à des odeurs. Cela permettra de comprendre si un apprentissage dépend réellement de la présence de MHUSA, ou si l'état d'activation déclenché permet la mise en place de l'empreinte. Si nous associons parallèlement MHUSA à un événement (son, objet...) nous pourrions observer des différences d'imprégnation aux objets présentés (aux poussins) en présence ou en absence de MHUSA.

Cette étape permettra d'avancer dans la compréhension de la mise en place de l'empreinte, quelle que soit l'espèce. En effet, on peut supposer que l'objet (ou l'être) d'attachement le devienne suite à un processus nécessitant, de façon idéale, un ensemble comportant une *forme*, un *mouvement*, une *couleur*, un *son* et une *odeur* (ou un *odorant*). Ces termes peuvent être déclinés au singulier comme au pluriel et être actifs les uns sans les autres. L'addition de tous permet l'imprégnation de l'être d'attachement. La *forme*, le *volume*, l'*intensité*, la *quantité*, représentent aussi des paramètres qui peuvent influencer la réponse de l'animal.

La quantité nécessaire (dose) de MHUSA perçue par l'animal pour être efficace constitue une étape indispensable dans la compréhension du mécanisme. Si nos résultats n'indiquent aucun effet de « surdose » de MHUSA, nous devons néanmoins envisager un effet du sous-dosage de MHUSA, en testant par exemple à quelle distance du diffuseur MHUSA est encore perceptible par les poulets. Nous pouvons utiliser les indicateurs de la norme américaine NIOSH (*National Institute for Occupational Safety and Health*), et placer des « pièges » permettant de capter les composants de MHUSA à des distances connues et de plus en plus grandes du diffuseur. Par une technique d'adsorption/désorption (sur charbons par exemple) il est possible de savoir à la fois combien de temps diffuse MHUSA et à quelle distance. Cela se rapproche d'une étude de stabilité, qui est aussi envisagée.

## 2.2. Comparer MHUSA et la substance native

En utilisant MHUSA et la sécrétion native, nous proposons de savoir d'abord si l'une se substitue à l'autre (S), et ensuite si l'une rappelle l'autre (R). Dans ce type de test, nous ne prenons pas en compte l'importance d'un éventuel stimulus visuel ou auditif. La première idée consiste en la mise en situation de poussins issus de la même couvée, que l'on sépare en trois groupes identiques (Native, MHUSA, Placebo). Ces derniers subissent une batterie de tests qu'il convient de définir. La seconde idée permettrait de mesurer le rôle des substances dans l'empreinte. Pour les deux types de test, répéter les mesures est essentiel dans le sens où l'on croise (R) avec l'idée du suivi longitudinal et que les traitements sont interchangeables pour (S). Ainsi, comme présenté sur l'illustration 44, (R) permet de déterminer le moment du « déclic » et (S) permet de savoir si MHUSA et la native sont susceptibles d'engendrer les mêmes réactions.



Pour ce type d'étude, des tests comportementaux sont les plus appropriés. Nous partons du principe que la présence d'un stimulus visuel est montrée dans le phénomène d'empreinte et de l'hypothèse qu'une empreinte olfactive existe (Bolhuis et Honey, 1994, 1998). Cela permettra de statuer sur l'aspect filial ou de prédisposition quant à la réponse aux sémiochimiques testés. Le suivi longitudinal de (R) permettra aussi de déterminer la fin de la période sensible, pour répondre au questionnement de Parsons et Rogers (1997), selon qui elle devrait être due soit à une peur soit à une maturation endogène. Les

premiers tests qui permettront de préparer cet essentiel travail de compréhension seront effectués sur poussins naïfs, plus susceptibles de s'imprégner d'un sémiocimique (Vallortigara *et al.*, 2005).

### **3. Travailler sur des productions connexes**

---

#### **3.1. Les poules pondeuses**

MHUSA pourrait être utilisé en atelier de poules pondeuses. Hester (2005) montre l'augmentation du stress en cas d'introduction d'une poule « étrangère », d'absence de cage ou d'autres situations amenant à une compétition alimentaire. Dans le cadre des nouvelles normes de BEA, ou la perspective de celles-ci, ce type de situation devrait être de plus en plus courant, introduisant des situations de stress. Les souches à viande s'adaptent mieux à un nouvel environnement que les pondeuses, chez qui l'isolation provoque aussi un stress (Saito *et al.*, 2005).

Les marqueurs ne sont pas autant révélateurs de l'état de stress chez les pondeuses que chez les poulets de chair. La réponse adaptative des poules pondeuses diffère dans le sens où la corticostérone n'est pas reconnue comme marqueur de stress. En revanche, le poids augmente avec le stress et des animaux stressés stockent moins de protéines (Mumma *et al.*, 2006). Le taux d'interleukines est directement lié à la production d'œufs puisqu'il réduit l'activité de la  $3\beta$  dehydrogenase ( $3\beta$  HSD) des cellules de la granulosa (Alodan et Beck, 2002).

#### **3.2. Le secteur de la sélection génétique**

Les lignées parentales sont aujourd'hui sélectionnées pour leurs aptitudes à donner une descendance la plus productive possible. Le génie génétique associé à la statistique définit des secteurs du génome comme des locus. Un locus à effets quantitatifs (QTL ou *Quantitative Trait Locus*) est un locus pour lequel la variation allélique est associée à la variation d'un caractère quantitatif. Des QTL sont aussi des locus présentant un intérêt économique (ETL ou *Economic Trait Locus*) car ayant une influence sur un caractère et contribuant au revenu du producteur.

La génétique permet de sélectionner des gènes à intérêt. Il devient alors intéressant de noter que le ratio hétérophilies/lymphocytes (HLR) est un objectif dans la sélection génétique. Divers avantages sont attribués à un HLR bas : une meilleure croissance, un taux de ponte plus important, des œufs de masse moyenne plus élevée, qui éclosent plus vite et sont plus fertiles et une proportion plus faible d'embryons morts (El-Murrani *et al.*, 2006). Ce seul exemple montre tout l'intérêt que MHUSA pourrait avoir dans le cadre d'une utilisation en routine. Nous notons en effet que les QTL n'indiquent pas si un seul gène code pour HLR, d'où la difficulté de la mise en place d'un schéma de sélection sur ce critère. Il peut aussi s'agir de deux gènes géographiquement proches. Il s'agit d'un travail mené avec le secteur de la sélection génétique et non dans ce dernier.

#### **3.3. Les autres productions de rente**

Toutes les espèces d'oiseaux domestiques (exception faite des *struthioniformes*), appartiennent aux Ordres des *Galliformes* (poule), *Columbiformes* (pigeon, tourterelle...) ou *Anseriformes* (canard, oie...). Si les premiers essais à envisager doivent être effectués sur des *Galliformes*, et les derniers sur des *struthioniformes*, nous pouvons émettre des hypothèses quant à l'action de MHUSA sur les *Columbiformes* ou les *Anseriformes*. Soit

MHUSA a un spectre d'action suffisamment large et les tests montrent des résultats comparables pour ces deux Ordres, soit il convient de reprendre le raisonnement à la base : effectuer et analyser des prélèvements de glandes uropygiales. Cette dernière hypothèse, la plus probable, aurait l'avantage de nous montrer la différence entre les Ordres. Une corrélation pourrait être effectuée avec les écarts taxinomiques.

Au sein des *Anseriformes*, la dinde est une viande de plus en plus consommée car elle répond à la demande des consommateurs, désireux d'avoir des viandes maigres et bon marché. Il existe des références quant à la réponse au stress de la dinde. Il est par exemple confirmé que les lignées à croissance rapide résistent moins au stress. Ceci est mesuré par des paramètres que nous connaissons, tel que le ratio hétérophiles/lymphocytes (Huff *et al.*, 2005).

La pintade, même si sa production reste plus marginale, est aussi une espèce de rente à prendre en considération puisque l'on montre aussi sa sensibilité au stress (Nahashon *et al.*, 2006). Le stress diminue également la qualité de carcasse en augmentant la production d'acide lactique engendrant des viandes pâles et pisseuses, type PSE (Alvarado et Sams, 2002).

La production de foie gras, plus anecdotique mais controversée, peut aussi permettre de mesurer l'impact de MHUSA. En revanche, il semble que le stress engendré par le gavage ne puisse être réduit par la présence d'un sémiocchimique apaisant. D'une part parce que les marqueurs classiques de stress ne montrent pas de variation et que les différentes techniques de gavage utilisées n'ont pour objectif que de rentabiliser la qualité organoleptique du foie (Molee *et al.*, 2005).

### **3.4. Les animaux de compagnie**

Qu'on les range dans les Nouveau Animaux de Compagnie (NAC) ou non, les *Psittacidae* pourraient répondre favorablement à la diffusion de MHUSA. Les résultats préliminaires d'une étude (non décrite dans ce document) indiquent en effet qu'il existe une corrélation entre les troubles comportementaux et le ratio hétérophiles/lymphocytes chez les perroquets. D'une manière plus générale, les oiseaux sont très présents comme animaux de compagnie. On leur prête notamment des vertus thérapeutiques. Des études *a posteriori* montrent les effets bénéfiques des animaux de compagnie sur le comportement et la physiologie chez l'Homme, incluant l'utilisation d'animaux dans l'univers carcéral (Edney, 1992). Si l'oiseau doit être utilisé pour réduire le stress de son acquéreur, il doit aussi, en retour, subir un minimum de stress et donc être en situation de faible stress. Enfin, les troubles comportementaux chez des oiseaux de compagnie ont été référencés et démontrés comme allant à l'encontre du BEA (Pageat, 2006).

## **4. Catégoriser MHUSA**

---

Il est envisageable de définir les récepteurs spécifiques à MHUSA. On peut émettre l'hypothèse d'un transport incluant des protéines porteuses permettant le passage au travers d'une muqueuse (Guiraudie *et al.*, 2003). Il peut aussi exister une continuité moléculaire entre la mère et les poussins durant la période d'incubation, voir de couvainon. Il y aurait alors une similarité avec les mammifères (continuité intra-utérine via le placenta) comme montré chez le porc (Guiraudie-Capraz *et al.*, 2005) ou le lapin (Schaal *et al.*, 2003). Il est possible de mesurer l'activation de l'IHVM par la mesure quantitative des récepteurs dits NMDA (récepteurs à glutamate spécifiques) ou par la mesure du fos. Comme l'IHVM n'a pas d'action sur les réactions de prédisposition (Bolhuis, 1999), Il devient possible de statuer sur le fait que la réponse à MHUSA est spécifique (ou non) et

innée (ou non), puisque l'on oppose l'apprentissage à la prédisposition. Une autre catégorie de récepteurs, les *Trace Amine Associate Receptors* (TAARs), chimiosensibles, existe dans l'épithélium olfactif (Buck, 2006). Ils reconnaissent une phéromone (chez l'Homme) et pourraient aussi être impliqués dans la détection d'autres types de composés permettant une communication « sociale ». A travers ces exemples, on montre que des récepteurs spécifiques à des molécules (ou bouquet de molécules) permettent de définir un cadre amenant à catégoriser MHUSA.

Une autre voix d'étude, à plus long terme toutefois, est la génétique. Dans le cadre de l'empreinte filiale, on détaille par exemple l'expression d'un gène connu pour son rôle dans l'apprentissage précoce (Bock *et al.*, 2005).

Il convient aussi de définir MHUSA selon sa composition. En effet, MHUSA n'est pas, comme la phéromone d'allaitement découverte chez le lapin par Schaal *et al.* (2003), un composé unique, puisque MHUSA comporte quatre éléments. Il ne semble pas qu'un unique composé de MHUSA soit capable d'une action similaire : MHUSA n'est pas « sécable ». Divers documents (Novotny *et al.*, 1995, 1999 ; Cavaggioni *et al.*, 2003) indiquent que la forme spatiale des composants, la synergie et des vecteurs associés font que la substance est active ou non. Cela signifie qu'il peut y avoir plusieurs composants qui induisent cette activité. Les types de réactions (zootechniques, physiologiques et comportementales) observées et décrites dans notre travail nous indiquent que sa composition entraîne des réactions comparables à celles qu'induirait une phéromone (illustration 45).

#### SYNTHESE PARTIELLE

Les résultats obtenus avec MHUSA sur des poulets domestiques permettent d'envisager de continuer son étude chez *Gallus gallus*, mais aussi d'élargir l'audience de la démarche sur d'autres genres ou d'autres espèces. Plusieurs secteurs de la recherche peuvent à ce titre être mis à contribution pour des travaux de collaboration.

# **Conclusion**

Le but de ce travail était de tester les incidences d'un bouquet de composants maternels potentiellement apaisant (*Mother Hens' Uropygial Secretion Analogue* ou MHUSA) sur des poulets de chair naïfs en situation de stress. Dans ce cadre, nos résultats montrent des conséquences à plusieurs niveaux. Sur un plan zootechnique, la croissance des poulets sous MHUSA est améliorée sans que la qualité de viande, mesurée via différents indicateurs, ne soit perturbée. La physiologie de l'animal est influencée puisque le taux de corticostérone, le ratio hétérophiles/lymphocytes et la production de cytokines sont différents selon que le traitement est présent ou non. Les indicateurs comportementaux complètent la démonstration et fournissent des indices pour catégoriser MHUSA.

Soumis à différents stress (*prédateur*, contention, isolement, déplacement), des poulets sont moins perturbés sous MHUSA que sous placebo. Les expérimentations menées à divers régimes montrent que MHUSA induit des réponses comportementales invariables, confirmées par les indicateurs sanguins du stress.

Dans un univers olfactif complexe comme celui des élevages industriels, on note une réaction sélective à MHUSA puisque l'on observe des réponses différentes des poussins soumis à l'expérimentation comparant deux bâtiments alors que seul ce composé les discrimine.

La nature même de l'élevage industriel moderne implique l'absence de lien maternel entre la poule et ses poussins (incubation et éclosion artificielles). Toutes nos observations ont donc été effectuées sur des oiseaux naïfs vis-à-vis de MHUSA. Soumis à un test de choix (MHUSA vs placebo vs neutre), des poussins sont plus attirés par la zone de diffusion de MHUSA. Cela indique que la réponse est sélective et ne nécessite pas d'apprentissage.

L'efficacité de MHUSA ne semble pas affectée par la variation génétique des poulets. En effet, représentatif de deux morphotypes de poules sur les quatre existants (selon la classification du GKSU, 2004), MHUSA a été testé sur différentes souches d'un troisième morphotype.

Ainsi MHUSA entraîne-t-il une réponse univoque, de fonction évidente, sélective et sans apprentissage nécessaire. Même si elle ne peut être rigoureusement définie comme caractéristique de l'espèce, elle induit des réactions équivalentes quelle que soit la souche testée. Nous avons là quatre des cinq éléments qui semblent attester du fait que MHUSA est une phéromone (telle que proposée par Schaal *et al.*, 2005).

MHUSA est formé de quatre éléments volatiles efficaces aux ratios testés. La synergie entre ces éléments semble indispensable dans notre cas, comme dans celui des travaux de Novotny *et al.* (1999), sur une phéromone d'ovulation chez la souris. Cela indique la simplicité de la composition chimique et valide la cinquième étape de la définition d'une phéromone.

Si MHUSA est une phéromone, comment la définir selon la classification actuelle (Preti *et al.*, 2003) ? Peut-elle être qualifiée de *releaser*, de *primer*, de *signaler* ou encore de *modulator* (Brennann et Zufall, 2006) ? Il semble que MHUSA possède une action à spectre large puisque les conséquences de sa diffusion sont visibles sur le plan comportemental, endocrinien, informatif et humoral, ce qui indique qu'il manque des clés d'interprétation pour franchir cette étape de catégorisation. Elles pourront être connues avec les expérimentations envisagées dans ce que nous avons présenté comme l'extension de ce travail.

Les conclusions de notre étude préparent les prochains travaux sur MHUSA selon deux logiques complémentaires. Nous envisageons d'abord de participer à la recherche de solutions concrètes aux problèmes du bien-être des poulets en élevage. Ensuite, nous élargirons nos travaux à la recherche fondamentale liée à MHUSA et à ses effets. Nous avons des objectifs à diverses échéances pour l'utilisation et l'étude de MHUSA. Il apparaît important de hiérarchiser les perspectives. Les premières applications sont

immédiates pour répondre aux demandes, les secondes relèvent d'un cadre moins urgent et de la volonté de satisfaire la curiosité nous amenant à la description des phénomènes observés.

Les objectifs à court terme découlent directement des attentes du public, représenté par les producteurs, les distributeurs et les consommateurs. Les performances d'élevage doivent permettre de satisfaire les besoins des protagonistes de ces trois échelons. Cette démarche ne se restreint pas à *Gallus gallus* et élargir l'audience de celle-ci fait aussi partie d'un développement à court terme. Les indicateurs de performance existent pour toutes les productions avicoles que nous envisageons d'étudier : dinde, pintade, canard... Mesurer l'impact de MHUSA (ou d'une substance de même nature mais caractéristique de l'espèce étudiée) sur ces derniers permettra de statuer sur ses indications d'utilisation. Nous avancerons aussi dans la caractérisation de MHUSA : son efficacité inter-espèces permet-elle de la qualifier de phéromone ?

Les objectifs à moyen, puis à long terme relèvent d'une démarche d'ordre fondamental. Contrairement à l'idée précédente, concrète, nous travaillerons ici avec des hypothèses qui devront nous amener à la compréhension du mécanisme global. Partant du constat que la substance MHUSA agit sur l'espèce *Gallus gallus*, nous pouvons émettre l'hypothèse (reprise dans l'illustration 44) d'une « continuité olfactive » permettant aux poulets de retrouver dans MHUSA un signal identique à celui de leur fratrie. Cette idée n'est pas incompatible avec la notion de phéromone, surtout chez les oiseaux qui ne possèdent pas d'organe voméronasal. La phéromone MHUSA peut être active *via* l'organe olfactif du poulet, comme c'est le cas pour d'autres phéromones, chez d'autres espèces (Meredith, 2001). Des études de connections neuronales et d'imagerie cérébrale permettront de statuer définitivement sur le caractère phéromonale de MHUSA.

Pour conclure sur ce travail, évoquons l'ambitieux projet de la compréhension des mécanismes d'interrelation entre la mère et sa descendance. S'il existe une notion de connectique lors de l'empreinte et de l'attachement, qui peut être influencée par une sécrétion maternelle, la porte est ouverte à des travaux complémentaires. Ces derniers s'inscriront obligatoirement au sein d'une démarche qui considère l'Animal comme le point central d'étude pour permettre l'harmonisation de ses besoins et de ceux de l'Homme. Notre travail s'inscrit ainsi dans une logique plus large visant à interpréter des mécanismes physiologiques au sens large, qui devront amener à la compréhension des stratégies de communication du vivant.

# **Bibliographie**

AERNI, V., EL-LETHEY, H., WECHSLER, B. 2000. Effect of foraging material and food form on feather pecking in laying hens. *British Poultry Science*, 41, 16-21.

AKSIT, M., YALCIN, S., OZKAN, S., METIN, K., OZDEMIR, D. 2006. Effects of temperature during rearing and crating on stress parameters and meat quality of broilers. *Poultry Science*, 85, 1867-1874.

ALLEMAN, F., BORDAS, A., CAFFIN, J.P., DAVAL, S., DIOT, C., DOUAIRE, M., FRASLIN, J.M., LAGARRIGUE, S., LECLERCQ, B. 1999. L'engraissement chez le poulet : aspects métaboliques et génétiques. *Productions Animales*, 12, 257-264.

AL-MURRANI, W.K., AL-RAWI, A.J., AL-HADITHI, M.F., AL-TIKRITI, B. 2006. Association between heterophil/lymphocyte ratio, a marker of 'resistance' to stress, and some production and fitness traits in chickens. *British Poultry Science*, 47, 443-448.

ALODAN, M.A., BECK, M.M. 2002. Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) reduces the activity of 3 $\beta$  dehydrogenase (3 $\beta$  HSD) in granulosa cells of laying hens. *Journal of Animal Science*, 84, supplement.

ALTMAN, J. 1974. Observational study of behavior: sampling methods. *Behavior*, 49, 227-267.

ALVARADO, C.Z., SAMS, A.R. 2002. The role of carcass chilling rate in the development of pale, exudative turkey pectoralis. *Poultry Science*, 81, 1365-1370.

APPLEBY, M.C., MENCH, J.A., HUGHES, B.O. 2004. Industry. *Poultry Behaviour and Welfare*, CAB International, Wallingford, UK, 176-193.

APPLEBY, M.C., SMITH, S.F., HUGHES, B.O. 1993. Nesting, dust bathing and perching by laying hens in cages: effects of design on behaviour and welfare. *British Poultry Science*, 34, 835-847.

ARNOULD, C. 2003. Le bien-être des poulets de chairs : problèmes et solutions. *Sciences et Techniques Avicoles*, Hors-série 2003, 17-21.

ASNANI, M.V., RAMCHANDRAN, A.V. 1993. Roles of adrenal and gonadal steroids and season in uropygial gland function in male pigeons, *Columba livia*. *Genetic and Comparative Endocrinology*, 2, 213-224.

BAILEY, E.D. 1983. Influence of incubation calls on post hatching responses of pheasant chicks. *The Condor*, 85, 43-49.

BALTHAZART, J., SCHOFFENIELS, E. 1979. Pheromones are involved in the control of sexual behaviour in birds. *Naturwissenschaften*, 66, 55-56.

BANDYOPADHYAY, A., DEADHIKARI, H., RANJIT, M., BHATTACHARYYA, S.P. 1990. Adrenocortical influence on histokinetics and lipid components of uropygial gland of immature chick. *Indian Journal of Experimental Biology*, 28, 915-919.

BANDYOPADHYAY, A., BHATTACHARYYA, S.P. 1996. Influence of fowl uropygial gland and its secretory lipid components on growth of skin surface bacteria of fowl. *Indian Journal of Experimental Biology*, 34, 48-52.

- BANDYOPADHYAY, A., BHATTACHARYYA, S.P. 1999. Influence of fowl uropygial gland and its secretory lipid components on the growth of skin surface fungi of fowl. *Indian Journal of Experimental Biology*, 37, 1218-1222.
- BANG, B.G. 1971. Funcional anatomy of the olfactory system in 23 orders of birds. In *Acta Anatomica*, Karger Ed., London, 79, 32 , 62-68.
- BARNARD, C.J., BURCK, T. 1979. Dominance hierarchies and the evolution of individual recognition. *Journal of theoretical biology*, 81, 65-73.
- BATESON, P.P.G., HORN, G., McCABE, B.J. 1977. Imprinting and the incorporation of uracil in the chick brain: a radio autographic study. *Journal of Physiology*, 275, 70.
- BAXI, K.N., DORRIES, K.M., EISTHEN, H.L. 2006. Is the vomeronasal system really specialized for detecting pheromones? *Trends In Neuroscience*, 29, 1-7.
- BEAUCHAMP, G.K., DOTY, R.L., MOULTON, D.G., MUGFORD, R.A. 1976. The pheromone concept in mammalian chemical communication: a critique. *Mammalian Olfaction, Reproductive Process, and behaviour*, Doty Ed., New York, 143-160.
- BELLUSCIO, L., KOENTGES, G., AXEL, R., DULAC, C. 1999. A map of pheromone receptor activation in the mammalian brain. *Cell*, 97, 209-220.
- BERCHIERIE, A., TURCO, W.C., PAIVA, J.B., OLIVEIRA, G.H., STERZO, E.V. 2006. Evaluation of isopathic treatment of Salmonella enteritidis in poultry. *Homeopathy*, 95, 94-97.
- BERRI, C., JEHL, N. 2001. Facteurs de variation de la qualité technologique et organoleptique des viandes de poulets. *Quatrièmes journées de la recherche avicole*, Nantes, France, 245-252.
- BERRI, C., RELANDEAU, C., le BELLEGO, L., PICARD, M. 2005. Effets de la teneur en lysine de l'aliment sur les performances, le pH ultime et les pertes en eau des filets du poulet de chair. *6<sup>e</sup> Journée de la Recherche Avicole*, St Malo, France, 234-237.
- BESSEI, W. 1992. Das verhalten von broilern unter intensiven haltungsbedingungen. *Archives Fur Gellugelk*, 56, 1-7.
- BEUVING, C., VONDER, G.M.A. 1986. Comparison of the adrenal sensitivity to ACTH of laying hens with immobilisation and plasma baseline levels of corticosterone. *Comparative Haematology International*, 8, 94-101.
- BILCIK, B., KEELING, L.J. 2000. Relationship between feather pecking and ground pecking in laying hens and the effect of group. *Applied Animal Behaviour Science*, 68, 55-66.
- BILCIK, B., KEELING, L.J., NEWBERRY, R.C. 1998. Effect of group size on tonic immobility in laying hens. *Behavioural Processes*, 43, 53-59.
- BIZERAY, D., ESTEVEZ, I., LETERRIER, C., FAURE, J.M. 2002. Influence of increased environmental complexity on leg condition, performance, and level of fearfulness in broilers. *Poultry Science*, 81, 767-773.

- BOCK, J., THODE, C., HANNEMANN, O., BRAUN, K., DARLISON, M.G. 2005. Early socio-emotional experience induces expression of the immediate-early gene *Arc/arg 3.1* (activity-regulated cytoskeleton-associated protein/activity-regulated gene) in learning-relevant brain regions of the newborn chick. *Neuroscience*, 133, 625-633.
- BOHNET, S., ROGERS, L., SASAKI, G., KOLATTUKUDY, P.E. 1991. Estradiol induces proliferation of peroxisome-like microbodies and the production of 3-hydroxy fatty acid diesters, the female pheromones, in the uropygial glands of male and female mallards. *Journal of Biological Chemistry*, 266, 9795-9804.
- BOHUS, B., BENUS, R.F., FOKKEMA, D.S., KOOLHASS, J.M., NYAKAS, C., van OOTMERSENG, A., PRINS, A.J.A., de RUITER, A.J.H., SCHEURINK, A.J.W., STEFFENS, A.B. 1987. Neuroendocrine states and behavioral and physiological stress responses. *Progress in Brain Research*, 72, 57-70.
- BOLHUIS, J.J., HONEY, R.C. 1994. Within-event learning during filial imprinting. *Journal of Experimental Psychology, Animal Behavior Process*, 20, 240-248.
- BOLHUIS, J.J., HONEY, R.C. 1998. Imprinting, learning and development: from behaviour to brain and back. *Trends in Neuroscience*, 21, 306-311.
- BOLHUIS, J.J. 1999. The development of animal behaviour: from Lorenz to neural nets. *Wissenschaften*, 86, 101-111.
- BONADONNA, F., VIILAFANE, M., BAJZAK, C., JOUVENTIN, P. 2004. Recognition of burrow's olfactory signature in blue petrels, *Halobaena caerulea*: an efficient discrimination mechanism in the dark. *Animal Behaviour*, 67, 893-898.
- BOUGLIER, J., GALLOUIN, F. 2002. Cannibalism, Picage, Stress. In: MAZOYER, M. *Larousse Agricole*, Larousse Ed., Paris, 131, 478, 594.
- BRADSHAW, R.H., FIRKDEN, R.D., BROOM, D.M. 2002. A review of the aetiology and pathology of leg weakness in broilers in relation to welfare. *Avian and Poultry Biology Reviews*, 13, 45-103.
- BRENNAN, A., ZUFALL, F. 2006. Pheromonal communication in vertebrates. *Nature*, 444, 308-315.
- BRIGANDT, I. 2005. The Instinct Concept of the early Konrad Lorenz. *The Journal of the History of Biology*, 38, 571-608.
- BROOM, D.M. 2006. Adaptation. *Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift*, 119, 1-6.
- BUCK, L.B. 2006. Deconstructing smell. VIIth Annual Meeting of the European Chemoreception Research Organisation. *Chemical Senses*, 31, E1-E99.
- BUITENHUIS, A.J., RODENBURG, T.B., van HIERDEN, Y.M., ASK, B., SIWEK, M., CORNELISSEN, S.J.B., NIEUWLAND, M.G.B., de GROOT, P., KORTE, S.M., KOENE, P., BOVENHUIS, H., van der PEOL, J.J. 2002. Feather pecking behaviour and stress response in laying hens : a QTL analysis. *7th WCGALP*, Montpellier-France, 14-06.
- BURKHARDT, R.W. 2004. Patterns of Behavior: Konrad Lorenz, Niko Tinbergen, and the founding of ethology. *University of Chicago Press Ed.*

- BURNE, T.H., ROGERS, L.J. 1995. Odors, volatiles and approach-avoidance behavior of the domestic chick. *International Journal of Comparative Psychology*, 8, 99-114.
- BURNE, T.H., ROGERS, L.J. 1996. Responses to odorant by the domestic chicks. *Physiology and Behavior*, 60, 1441-1447.
- BUYS, N., BUYSE, J., HASSANZADEH-LADMAKHI, M., DECUYPERE, E. 1998. Intermittent lighting reduces the incidence of ascites in broilers : an interaction with protein content of feed on performance and endocrine system. *Poultry Science*, 77, 54-61.
- CAIN, J.R., WEBER, J.M., LOOCKAMY, T.A., GREGER, C.R. 1984. Grower diets and bird density effects on growth and cannibalism in ring-necked pheasants. *Poultry Science*, 63, 450-457.
- CAMPO, J.L., DAVILA, S.G. 2002a. Effect of photoperiod on heterophil to lymphocyte ratio and tonic immobility duration of chickens. *Poultry Science*, 81, 1637-1639.
- CAMPO, J.L., DAVILA, S.G. 2002b. Estimation of heritability for heterophil: lymphocyte ratio in chickens by restricted maximum likelihood. Effect of age, sex and crossing. *Poultry Science*, 81, 1448-1453.
- CAMPO, J.L., GIL, M.G., MUNOZ, I., ALONSO, M. 2000. Relationship between bilateral asymmetry and tonic immobility reaction or heterophil to lymphocyte ratio in five breeds of chickens. *Poultry Science*, 79, 453-459.
- CAMPO, J.L., GIL, M.G., TORRES, O., DAVILA, S.G. 2001. Association between plumage condition and fear and stress levels in five breeds of chickens. *Poultry Science*, 80, 549-552.
- CANNON, W.B. 1927. The James-Lange theory of emotions: a critical examination and an alternative theory. *American Journal of Psychology*, 39, 106-124.
- CAPORALE, V., ALESSANDRINI, B., DALLA VILLA, P., del PAPA, S. 2005. Perspectives mondiales en matière de bien-être animal : Europe. *Revue scientifique et Technique Officielle de l'OIE*, 24, 567-577.
- CAVITT, L.C., MEULLENET, J.F., GANDHAPUNENI, R.K., YOUM, G.W., OWENS, C.M. 2005. Rigor development and Meat quality of large and small broilers and the use of allo Kramer shear needle puncture, and razor blade shear to measure texture. *Poultry Science*, 83, 113-118.
- CHAMANZA, R., van VEEN, L., TIVAPASI, M.T., TOUSSAINT, M.J.M. 1999. Acute phase proteins in the domestic fowl. *World Poultry Science Journal*, 55, 61-71.
- CHANNING, C.E., HUGHES, B.O., WALKER, A.W. 2001. Spatial distribution and behaviour of laying hens housed in an alternative system. *Applied Animal Behaviour Science*, 72, 335-345.
- CHARTRIN, P., QUENTIN, M., BERRI, C., LEBIHAN-DUVAL, E., BAEZA, E. 2003. Incidence du mode de production sur la teneur en lipides et la composition en acides gras du filet et du blanc de poulet. 5<sup>e</sup> Journées de la Recherche Avicole, Tours, France.

CHATELAIN, E. 1992. L'anatomie des oiseaux. *Manuel de pathologie aviaire*, Brugère-Picoux et Silim, ENV Maison-Alfort Ed., 93pp.

CLARK, L., SMERASKI, C.A. 1990. Seasonal shifts in odor acuity by starlings. *The Journal of Experimental Zoology*, 255, 22-29.

CLARKE, R. 1961. Claude Bernard et la médecine expérimentale. *coll. "Savants du monde entier"*, Seghers Ed., Paris, 222pp.

CLINCHY, M., ZANETTE, L., BOONSTRA, R., WINGFIELD, J.C., SMITH, J.N. 2004. Balancing food and predator pressure induces chronic stress in songbirds. *Proceedings, Biological Sciences, the Royal Society*, 271, 2473-2479.

COLLIAS, N.E. 2000. Filial imprinting and leadership among chicks in family integration of the domestic fowl. *Behaviour*, 137, 197-211.

CORNETTO, T., ESTEVEZ, I., DOUGLAS, L.W. 2001. Using artificial cover to reduce aggression and disturbances in domestic fowl. *Applied Animal Behaviour Science*, 75, 325-336.

CRAIG, J.V., MUIR, W.M. 1996. Group selection for adaptation to multiple-hen cages : behavioural responses. *Poultry Sciences*, 75, 1145-1155.

CRANSBERG, P.H., HEMSWORTH, P.H., COLEMAN, G.J. 2000. Human factors affecting the behaviour and productivity of commercial broiler chickens. *British Poultry Science*, 41, 272-279.

DANTZER, R. 2001. Stress, emotions and health: where do we stand? *Social Science Information*, Maison des Sciences de l'Homme, SAGE Publications Ed., 40, n°1, 61-78.

DAVIS, G.S., ANDERSON, K.E., JONES, D.R. 2004. The effects of different beak trimming techniques on plasma corticosterone and performance criteria in single comb white leghorn hens. *Poultry Science*, 83, 1624-1628.

DAWKINS, M.S., DONELLY, C.A., JONES, T.A. 2004. Chicken welfare is influenced more by housing conditions than by stocking density. *Nature*, 427, 342-344.

De JONG, I.C., Van VOORST, S., EHLARDT, D.A., BLOKHUIS, H.J. 2002. Effects of restricted feeding on physiological stress parameters in growing broiler breeders. *British Poultry Science*, 43, 157-168.

DEBUT, M., BERRI, C., BAEZA, E., SELIER, N., ARNOULD, C., GUEMENE, D., JEHL, N., BOUTTEN, B., JEGOS, Y., BEAUMONT, C., le BIHAN-DUVAL, E. 2003. Variation of chicken technological meat quality in relation to genotype and pre-slaughter stress conditions. *Poultry Science*, 82, 1829-1838.

DENNIS, R.L., MUIR, W.M., CHENG, H.M. 2006. Effects of raclopride on aggression and stress in diversely selected chicken lines. *Behavioral and Brain Research*, 175, 104-111.

DEFROGES, M.F., WOOD-GUSH, D.G.M. 1975a. A behavioural comparison of mallard and domestic duck. Habituation and flight reaction. *Animal Behaviour*, 23, 692-697.

DEFROGES, M.F., WOOD-GUSH, D.G.M. 1975b. A behavioural comparison of mallard and domestic duck. Spatial relations in small flocks. *Animal Behaviour*, 23, 698-705.

- DESPORTES, J.P., VLOEBERGH, A. 1979. La recherche en éthologie. *Desportes et Vloebergh*, Paris, Seuil Ed., 5.
- DICKE, M., SABELIS, M.W. 1988. Info-chemical terminology: based on cost-benefit analysis rather than origin of compounds? *Functional Ecology*, 2, 131-139.
- DOHMS, J.E., METZ, A. 1991. Stress – mechanisms of immunosuppression. *Veterinary Immunology Immunopathology*, 30, 89-109.
- DORHOI, A., DOBREAN, V., ZAHAN, M., VIRAG, P. 2006. Modulatory effects of several herbal extracts on avian peripheral blood cell immune responses. *Phytotherapy Research*, 20, 352-358.
- DORRIES, K.M., ADKINS-REGAN, E., HALPERN, B.P. 1995. Olfactory sensitivity to the pheromone, androstenone, is sexually dimorphic in the pig. *Physiology and Behavior*, 57, 255-259.
- DOZIER, W.A., THAXTON, J.P., BRANTON, S.L., MORGAN, G.W., MILES, D.M., ROUSH, W.D., LOTT, B.D., VIZZIER-THAXTON, Y. 2005. Stocking density effects on growth performance and processing yields of heavy broilers. *Poultry Science*, 84, 1332-1338.
- DUNCAN, I.J.H., FRASER, D. 1997. Understanding animal welfare. *Animal welfare*, CAB International, Wallingford, UK, 19-31.
- DUNCAN, I.J.H., SLEE, S. G., KETTLEWELL, P., BERRY, P., CARLISLE, A.J. 1986. Comparison of the stressfulness of harvesting broiler chickens by machine and by hand. *British Poultry Science*, 27, 109-114.
- EDNEY, A.T. 1992. Companion animals and human health. *Veterinary Records*, 4, 285-287.
- EINSTHEN, H.L. 2004. The goldfish knows: olfactory receptor cell morphology predicts receptor genes expression. *Journal of Comparative Neurology*, 477, 341-346.
- ELDER, W.H. 1953. The oil gland of birds. *Publication du département de zoologie*, Université du Missouri, 3 mars 1953.
- EL-LETHEY, H., AERNI, V., JUNGI, T.W., WECHSLER, B. 2000. Stress and feather pecking in laying hens in relation to housing conditions. *British Poultry Science*, 41, 22-28.
- EL-LETHEY, H., JUNGI, T.W., HUBER-EICHER, B. 2001. Effects of feeding, corticosterone and housing conditions on feather pecking in laying hens (*Gallus gallus domesticus*). *Physiology and Behavior*, 73, 243-251.
- ESTEVEZ, I. 2007. Density allowances for broilers: where to set the limits? *Poultry Science*, 86, 1265-1272. Review.
- EWING, S.A., LAY, D.C., VON BORELL, E. 1999. Farm animal well-being: stress physiology, animal behaviour and environmental design. *Prentice-Hall Ed.*, Hardcover, 357pp.

- FALEWEE, C., GAULTIER, E., LAFONT, C., BOUGRAT, L., PAGEAT, P. 2006. Effect of a synthetic equine pheromone during a controlled fear-eliciting situation. *Applied Animal Behaviour Science*, 101,144-153.
- FALT, B. 1997. Differences in aggressiveness between brooded and non brooded domestic chicks. *Applied Animal Behaviour Science*, 4, 211-221.
- FANATICO, A.C., CAVITT, L.C., PILLAI, P.B., EMMERT, J.L., OWENS, C.M. 2005. Evaluation of slower growing broiler genotypes grown with and without outdoor access : meat quality. *Poultry Science*, 84, 1785-1790.
- FELTENSTEIN, M.W., SUFKA, K.J. 2005. Screening antidepressants in the chick separation-stress paradigm. *Psychopharmacology*, 191, 153-159.
- FLETCHER, D.L. 2002. Poultry meat quality. *World's Poultry Science Journal*, 58, 131-145.
- FLUCK, E., HOGG, S., MABBUTT, P.S., FILE, S.E. 1996. Behavioural and neurochemical responses of male and female chicks to cat odour. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 54, 85-91.
- FORSTER, S.P., DENHOLM, I., THOMPSON, R., POPPY, G.M., POWELL, W. 2005. Reduced response of insecticide-resistant aphids and attraction of parasitoids to aphid alarm pheromone; a potential fitness trade-off. *Bulletin of Entomology Research*, 95, 37-46.
- FORT, J.C., ROSPARS, J.P. 1992. Modelling qualitative discrimination of odours in the first two neuronal layers of the olfactory system by the Jutten and Héroult algorithm. *Comptes rendus de l'Académie des sciences*, 315, 331-336.
- FREIRE, R., VanDORT, S., ROGERS, L.J. 2006. Pre- and post-hatching effects of corticosterone treatment on behavior of the domestic chick. *Hormones and Behavior*, 49, 157-165.
- GABE, M., SAINT GIRON, H. 1976. Contribution à la morphologie comparée des fosses nasales et de leurs annexes chez les lépidosriens. *Museum d'Histoire Naturelle, Annales du Museum Ed., Paris*, A98, 01-87.
- GALLUP, G.G. 1979. Tonic immobility as a measure of fear in domestic fowl. *Animal Behaviour*, 27, 316-317.
- GAULTIER, E., BONNAFOUS, L., BOUGRAT, L., LAFONT, C., PAGEAT, P. 2005. Comparison of the efficacy of a synthetic dog-appeasing pheromone with clomipramine for the treatment of separation-related disorders in dogs. *The Veterinary Record*, 156, 533-538.
- GAYON, J. 2005. De la biologie comme science historique. *Les temps modernes*, 630, 55-67.
- GKSW global consortium. 2004. A genetic variation map for chickens with 2.8 million single nucleotide polymorphisms. *Nature*, 432, 715-722.

GONZALES, E., KONDO, N., SALDANHA, E.S., LODDY, M.M., CAREGHI, C., DECUYPERE, E. 2003. Performance and physiological parameters of broiler chickens subjected to fasting on the neonatal period. *Poultry Science*, 82, 1250-1256.

GROSS, W.B. 1990. Effect of exposure to a short duration sound on the stress response of chickens. *Avian Diseases*, 34, 759-761.

GROSS, W.B., SIEGEL, H.S. 1983a. Evaluation of the heterophil/lymphocyte ratio as a measure of stress in chickens. *Avian Diseases*, 27, 972-979.

GROSS, W.B., SIEGEL, H.S. 1983b. Socialization as a factor in resistance to infection, feed efficiency, and response to antigen. *American Journal of Veterinary Research*, 11, 2010-2012.

GRUSS, M., BOCK, J., BRAUN, K. 2003. Haloperidol impairs auditory filial imprinting and modulates monoaminergic neurotransmission in an imprinting-relevant forebrain area of the domestic chick. *Journal of Neurochemistry*, 87, 686-696.

GUEMENE, D., DEBUT, M., COUTY, M., GARREAU-MILLS, M., BERRI, C., SELLIER, N., JEHL, Y., JEGO, C., BEAUMONT, C., LE BIHAN-DUVAL, E. 2005. Réponses à différents stress chez des poulets de génotype a croissance rapide ou lente. 6<sup>e</sup> Journées de la Recherche Avicole, St Malo, France, 529-533.

GUIRAUDIE, G., PAGEAT, P., CAIN, A.H., MADEC, I., NAGNAN-le MEILLOUR, P. 2003. Functional characterization of olfactory binding proteins for appeasing compounds and molecular cloning in the vomeronasal organ of pre-pubertal pigs. *Chemical Senses*, 28, 609-619.

GUIRAUDIE-CAPRAZ, G., SLOMIANNY, M.C., PAGEAT, P., MALOSSE, C., CAIN, A.H., ORGEUR, P., NAGNAN-LE MEILLOUR, P. 2005. Biochemical and chemical supports for a transnatal olfactory continuity through sow maternal fluids. *Chemical Senses*, 30, 241-251.

HALE, E.B. 1962. Domestication and the evolution of behaviour. *The behaviour of domestic animals*, Hafez Ed., Ballière Tindall London, 21-53.

HALPERN, M., HALPERN, J., ERICHSEN, E., BORGHID, S. 1997. The role of nasal chemical senses in garter snake response to airborne odor cues from prey. *Journal of Comparative Psychology*, 111, 251-260.

HALPERN, M., MARTINEZ-MARCOS, A. 2003. Structure and function of the vomeronasal system: an update. *Progress in Neurobiology*, 70, 245-318.

HARRISON, R. 1964. Animal Machines. *Vincent Stuart Ed.*, London, UK.

HAZARD, D., GUÉMÉNÉ, D. 2005. Les réponses de stress chez les oiseaux : quelle interprétation donner aux mesures de corticostéronémie? 6<sup>e</sup> JRA, St Malo, France, 549-553.

HEALY, S.D. 2006. Seeing food and eating it. *Current Biology*, 16, 501-502.

HENNING, S.J. 1980. Maternal factors as determinants of food intake during the suckling period. *International Journal of obesity*, 4, 329-332.

- HESTER, P.Y. 2005. Impact of science and management on the welfare of egg laying strains of hens. *Poultry Science*, 84, 687-696.
- HIRCH, S.M., BOLLES, R.C. 1980. On the ability of prey to recognize predators. *Verlag Paul Parey*, Berlin and Hamburg.
- HOCKING, P.M., HUGHES, B.O., KEER-KEER, S. 1997. Comparison of food intake, rate of consumption, pecking activity and behaviour in layer and broiler breeder males. *British Poultry Science*, 38, 237-240.
- HOCKING, P.M., JONES, E.K.M., PICARD, M. 2005. Assessing the welfare consequences of providing litter for feed restricted broiler breeders. *British Poultry Science*, 46, 545-552.
- HOLT, P.S., GAST, R.K. 2002. Comparison of the effects of infection with *Salmonella enteritidis*, in combination with an induced molt, on serum levels of the acute phase protein,  $\alpha_1$  acid glycoprotein, in hens. *Poultry Science*, 81, 1295-1300.
- HOLY, E., DULAC, C., MEISTER, M. 2000. Responses of vomeronasal neurons to natural stimuli. *Science*, 289, 1569-1572.
- HONAKER, C.F., RUSZLER, P.L. 2004. The effect of claw and beak reduction on growth parameters and fearfulness of two leghorn strains. *Poultry Science*, 83, 873-881.
- HORGAN, R., GAVINELLI, A. 2006. The expanding role of animal welfare with in EU legislation and beyond. *Livestock Sciences*, 103, 303-307.
- HUANG, G.Z., WANG, D., MASON, R.T., HALPERN, M. 2006. Female snake pheromone induces membrane responses in vomeronasal sensory neurons of male snakes. *Chemical Senses*, 31, 521-529.
- HUBER-EICHER, B., WECHSLER, B. 1997. Feather pecking in domestic chicks: its relation to dust bathing and foraging. *Animal Behavior*, 54, 757-768.
- HUFF, G.R., HUFF, W.E., BALOG, J.M., RATH, N.C., ANTHONY, N.B., NESTOR, K.E. 2005. Stress response differences and disease susceptibility reflected by heterophil to lymphocyte ratio in turkey selected for increased body weight. *Poultry Science*, 84, 709-717.
- HUGHES, B.O., BLACK, A.J. 1974. The effect of environmental factors on activity, selected behaviour patterns and fear of fowls in cages and pens. *British Poultry Science*, 15, 375-380.
- HUGHES, B.O., DUNCAN, I.J.H. 1972. The influence of strain and environmental factors upon feather pecking and cannibalism in fowls. *British Poultry Science*, 13, 525-547.
- JACCOBY, S., KOIKE, T.I., CORNETT, L.E. 1999. c-fos expression in the forebrain and brainstem of White Leghorn hens following osmotic and cardiovascular challenges. *Cell and Tissue Research*, 297, 229-239.
- JOHNSTON, R.E. 2000. Chemical communication and pheromones. *The Neurobiology of taste and smell*. Finger, Silver & Restrepo Ed., New York, 101-127.

- JOHNSTON, R.E., PENG, M. 2000. The vomeronasal organ is involved in discrimination of individual odors by males but not by females in golden hamsters. *Physiology and Behavior*, 70, 537-549.
- JONES, R.B. 1987. Social and environment aspects of fear in the domestic fowl. In: *Cognitive aspects of social behavior in the domestic fowl*, Zayan & Ducan Ed., Elsevier, 82-149.
- JONES, R.B., FACCHINI, L., McCORQUODALE, C. 2002. Social dispersal by domestic chicks in a novel: reassuring properties of a familiar odourant. *Animal Behavior*, 63, 659-666.
- JONES, R.B., ROPER, T.J. 1997. Olfaction in the domestic fowl: a critical review. *Physiology and Behavior*, 62, 1009-1018.
- KALINOWSKI, A., MORAN, E.T., WYATT, C.L. 2003. Methionine and cystine requirements of slow and fast-feathering broiler males from three to six weeks of age. *Poultry Science*, 82, 1428-1437.
- KARLSON, P., LUESCHER, M. 1959. "Pheromones": a new term for a class of biologically active substances. *Nature*, 183, 55-56.
- KIKUYAMA, S., YAZAWA, T., YAMAMOTO, K., IWATA, T., HOSHI, K., HASUNUMA, I., MOSCONI, G., POLZONETTI-MAGNI, A.M. 2000. Newt prolocatin and its involvement in reproduction. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 78, 984-993.
- KIYOKAWA, Y., KIKUSUI, T., TAKEUSHI, Y., MORI, Y. 2004. Alarm pheromones with different functions are released from different regions of the body surface of male rats. *Chemical Senses*, 29, 35-40.
- KIYOKAWA, Y., KIKUSUI, T., TAKEUSHI, Y., MORI, Y. 2005a. Mapping the neural circuit activated by alarm pheromone perception by c-fos immunohistochemistry. *Brain Research*, 1043, 145-154.
- KIYOKAWA, Y., SHIMOZURU, M., KIKUSUI, T., TAKEUCHI, Y., MORI, Y. 2005b. Alarm pheromone increases defensive and risk assessment behavior in male rats. *Physiology and Behavior*, 28, 383-387.
- KOCH, R.B., SMITH, S., GLICK, B. 1991. Research note: effects of several selected odorants on the sodium and potassium dependent adenosine triphosphate activities of two different chicken olfactory turbinals. *Poultry Science*, 70, 1269-1272.
- KOORI, M., YONEZAWA, T., KIKUSUI, T., STAFFORD, K., PAGEAT, P., MORI, Y. 2005. Synthetic pig appeasing pheromone relieves agonistic stress in adult female pigs. *39<sup>th</sup> International Society of Applied Ethology- Kanagawa, Japon, Kusunose & Shuske Ed.*, 70, 16 .
- KOSSMANN, R. 1871. Ueber die Talgdrüsen der Vögel. *Z.wiss.Nat.*, 21, 568-599.
- LATSHAW, J.D., MORISHITA, T.Y., SARVER, C.F., THILSTED, J. 2004. Selenium toxicity in breeding ring-necked pheasants (*Phasianus colchicus*). *Avian Diseases*, 48, 935-939.
- LAY, D.C., WILSON, M.E. 2002. Development of the chicken as a model for prenatal stress. *Journal of Animal Science*, 80, 1954-1961.

- LEINDERS-ZUFALL, T., LANE, A.P., PUCHE, A.C., MA, W., NOVOTNY, M.V., SHIPLEY, M.T., ZUFALL, F. 2000. Ultra-sensitive pheromone detection by mammalian vomeronasal neurons. *Nature*, 405, 792-796.
- LEONARD, M.L., HORN, A.G. 1995. Crowing in relation to status in roosters. *Animal Behaviour*, 49, 1283-1290.
- LEROY, Y. 1987. L'univers odorant de l'animal. *Ed. Boulbee*, Paris – France, 375pp.
- LEVINE, S. 2005. Developmental determinants of sensitivity and resistance to stress. *Psychoneuroendocrinology*, 30, 939-946.
- LORENZ, K. 1937. The companion in the bird's world. *Auk*, 54, 245-273.
- LUCAS, A.M., STETTENHEIM, P.R. 1972. Avian anatomy Integument Part II. *Agriculture Handbook 362*, USDA, Washington DC, 613-626.
- LUESCHER, A.U., SHEEHAN, K. 2005. Rearing environment and behavioural development in psittacine birds. Current issues and research in veterinary medicine. 5<sup>th</sup> *International Veterinary Behavior Meeting*- Minneapolis, USA, 82-84.
- MABAYO, R.T., OKUMURA, J.I., HIRAO, A., SUGITA, S., SUGAHARA, K., FURUSE, M. 1996. The role of olfaction in oil preference in the chicken. *Physiology and behavior*, 59, 1185-1188.
- MADEC, I., GAULTIER, E., PAGEAT, P. 2001. Assessment of the effect of bovine appeasing pheromone on veal calves. 35<sup>th</sup> *International Society of Applied Ethology*- Davis, USA, Garner, Mench & Sue Ed., 78.
- MAEKAWA, F., KOMINE, O., SATO, K., KANAMATSU, T., UCHIMURA, M., TANAKA, K., OHKI-HAMAZAKI, H. 2006. Imprinting modulates processing of visual information in the visual wulst of chicks. *BMC Neuroscience*, 7, 75.
- MARTIN, P., BATESON, P. 1986. Measuring Behaviour, an introductory guide. *Cambridge University Press Ed.*, UK, 242pp.
- MARTIN-PLATERO, A.M., VALDIVIA, E., RUIZ-RODRIGUEZ, M., SOLER, J.J., MARTIN-VIVALDI, M., MAQUEDA, M., MARTINEZ-BUENO, M. 2006. Characterization of antimicrobial substances produced by *Enterococcus faecalis* MRR 10-3, isolated from the uropygial gland of the hoopoe (*Upupa epops*). *Applied Environmental Microbiology*, 72, 4245-4249.
- MASON, J.R., CLARCK, L. 2000. The chemical senses in birds. *Strukie's Avian Physiology*, 5<sup>th</sup> Edition, Whittow Ed., Academic Press, New York, 39-56.
- MATHIEU, R., THIBODEAU, L. 1995. Anatomie et physiologie animales. Campbell, N.A., *Biologie Campbell 3<sup>ième</sup> édition*, De Boeck Université Ed., Bruxelles, 778-1047.
- MAULE, A.G., VANDERKOOI, S.V. 1999. Stress-induced immune-endocrine interactions. *Stress Physiology in Animals*, P. Balm Ed., Sheffield Academic Press, Sheffield, UK, 205-245.

MAXWELL, M.H. 1993. Avian blood leukocyte responses to stress. *World's Poultry Science Journal*, 49, 34-43.

MAXWELL, M.H., ROBERTSON, G.W., SPENCE, S., McCORQUODALE, C.C. 1990. Comparison of haematological values in restricted and ad libitum fed domestic fowls: white blood cells and thrombocytes. *British Poultry Science*, 31, 399-405.

Mc ARTHUR, J.A., POTTER, M., HARDING, E. 2006. The welfare implications of animal breeding technologies in commercial agriculture. *Livestock Science*, 103, 270-281.

Mc DONALD, D.W., BROWN, R.E. 1985. The pheromone concept in mammalian chemical communication. "Social odours in mammals", Brown & Mcdonald Ed., Oxford University Press, UK. 1-18.

Mc GLONE, J.J., ANDERSON, D.L. 2002. Synthetic maternal pheromone stimulates feeding behaviour and weight gain in weaned pigs. *Journal of Animal Science*, 80, 3179-3183.

Mc KEE, J.S., HARRISON, P.C. 1995. Effects of supplemental ascorbic acid on the performance of broiler chickens exposed to multiple concurrent stressors. *Poultry Science*, 74, 1772-1785.

MEHAFFEY, J.M., PRADHAN, S.P., MEULLENET, J.F., EMMERT, J.L., McKEE, S.R., Owens, C.M. 2006. Meat quality evaluation of minimally aged broiler breast fillets from five commercial genetic strains. *Poultry Science*, 85, 902-908.

MEREDITH, M. 2001. Human vomeronasal organ function: a critical review of best and worst cases. *Chemical Senses*, 26, 433-445.

MERLOT, E., MOZE, E., BARTOLOMUCCI, L., DANTZER, R., NEVEU, P.J. 2004. The rank assessed in a food competition test influences subsequent reactivity to immuneresponse. *Brain, Behavior and Immunity*, 18, 468-475.

MERLOT, E., NEVEU, P.J. 2003. Perturbations biologiques au cours du stress : que mesurer ? Comment mesurer ? "Stress, pathologies et immunité", Thurin & Baumann Ed., Flammarion, 110-118.

MILLER, D.B., BLAICH, C.F. 1988. Alarm call responsiveness of mallard ducklings: VII. Auditory experience maintains freezing. *Developmental Psychobiology*, 21, 523-533.

MITLOHONER, F.M., MORROW-TESCH, J.L., WILSON, S.C., DAILEY, J.W., McGlone, J.J. 2001. Behavioral sampling techniques for feedlot cattle. *Journal of Animal Science*, 79, 1189-1193.

MOLEE, W., BOUILLIER-OU DOT, M., AUVERGNE, A., BABILE, R. 2005. Changes in lipid composition of hepatocyte plasma membrane induced by overfeeding in ducks. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 141, 437-444.

MOLLER, A.P., SANOTRA, G.S., VESTERGAARD, K.S. 1995. Development stability in relation to population density and breed of chickens. *Poultry Science*, 74, 1761-1771.

MOLONY, V., KENT, J.E. 1997. Assessment of acute pain in farm animals using behavioral and physiological measurement. *Journal of Animal Science*, 75, 266-272.

- MORMEDE, P., ANDANSON, S., AUPERIN, B., BEERDA, B., GUEMENE, D., MALMKVIST, J., MANTECA, X., MANTEUFFEL, G., PRUNET, P., VAN REENEN, C.G., RICHARD, S., VEISSIER, I. 2007. Exploration of the hypothalamic-pituitary-adrenal function as a tool to evaluate animal welfare. *Physiology and Behavior*, 92, 317-319.
- MORRIS, F.O. 1836. The question of the office of the gland upon the rump of birds. *Magazine of Natural History*, 9, 159-164, 269-271, 434-443.
- MORROW-TESCH, J., Mc GLONE, J.J. 1990. Sources of maternal odors and the development of odor preferences in baby pigs. *Journal of Animal Sciences*, 68, 3563-3571.
- MUMMA, J., THANXTON, J.P., VIZZIER-THAXTON, Y., DOSDON, W.L. 2006. Physiological stress in laying hens. *Poultry Science*, 85, 761-769.
- MUNDY, N.I. 2006. Genetic basis of olfactory communication in primates. *American Journal of Primatology*, 68, 559-567.
- NAHASHON, S.N., ADEFOPE, N.A., AMENYENU, A., WRIGHT, D. 2006. Laying performance of pearl grey guinea fowl hens as affected by caging density. *Poultry Science*, 85, 1682-1689.
- NAKAMURA, K., MITARAL, Y., YOSHIOKA, M., KOIZUMI, N., SHIBAHARA, T., NAKAJIMA, Y. 1998. Serum levels of interleukin-6, alpha-1acid glycoprotein, and corticosterone in two week old chickens inoculated with escherichia coli lipopolysaccharide. *Poultry Science*, 77, 908-911.
- NEVITT, G.A., VEIT, R.R., KAREIVA, P. 1995. Dimethyl sulphide as a foraging cue for antarctic procellariiform seabirds. *Nature*, 376, 680-682.
- NICOL, C.J. 2004. Development, direction, and damage limitation: social learning in domestic fowl. *Learning and Behavior*, 32, 72-81.
- NIJDAM, E., ARENS, P., LAMBOOJI, E., DECUYPERE, E., STEGEMAN, J.A. 2004. Factors influencing bruises and mortality of broilers during catching, transport and lairage. *Poultry Science*, 83, 1610-1615.
- NOVOTNY, M.V., XIE, T.M., HARVEY, S., WIESLER, D., JEMIOLO, B., CARMACK M. 1995. Stereoselectivity in mammalian chemical communication: male mouse pheromones. *Experientia*, 14, 738-743.
- NOVOTNY, M.V., MA, W., WIESLER, D., ZÍDEK, L. 1999. Positive identification of the puberty-accelerating pheromone of the house mouse: the volatile ligands associating with the major urinary protein. *Proceedings, Biological Sciences*, 266, 2017-2022.
- ODEN, K., GUNNARSON, S., BERG, C., ALGERS, B. 2005. Effects of sex composition on fear measured as tonic immobility and vigilance behaviour in large flocks of laying hens. *Applied Animal Behaviour Science*, 95, 89-102.
- OFFICE INTERNATIONALE des EPIZOOTIES. 2000. *Third Strategic Plan*, at the 68th General Session in May 2000. <http://ec.europa.eu/food/animal/welfare/international>
- OH, K.S., KIM, E.Y., YOON, M., LEE, C.M. 2007. Swim training improves leptin receptor deficiency-induced obesity and lipid disorder by activating uncoupling proteins. *Experimental and Molecular Medicine*, 39, 385-389.

- PAGEAT, P. 2006. A biological approach to assessing behavior. *49<sup>th</sup> Annual BSAVA*, Birmingham, U.K., 319-320.
- PAGEAT, P., GAULTIER, E. 2003. Current research in canine and feline pheromones. *The Veterinary Clinics*, 33, 187-211.
- PAGEAT, P. 2002. Avian appeasing pheromones to decrease stress, anxiety and aggressiveness. US Patent 60/389,768.
- PALLERONI, A., HAUSER, M., MARLER, P. 2005. Do responses of galliform birds vary adaptively with predator size? *Animal Cognition*, 8, 200-210.
- PARSONS, C.H., ROGERS, L.J. 1997. Pharmacological extension of the sensitive period for imprinting in gallus domesticus. *Physiology and Behavior*, 62, 1303-1310.
- PAUSE, B.M. 2006. Human Pheromones ? VI<sup>th</sup> Annual Meeting of the European Chemoreception Research Organisation. *Chemical Senses*, 31, E1-E99,
- PETERSEN, H.H., NIELSEN, J.P., HEEGAARD, P.M. 2003. Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. *Veterinary Research*, 35, 163-187.
- PETRACCI, M., BETTI, M., BIANCHI, M., CAVANI, C. 2004. Color variation and characterization of broiler breast meat during processing in Italy. *Poultry Science*, 83, 2086-2092.
- PETTIT-RILEZ, R., ESTEVEZ, I. 2001. Effects of density on perching behaviour of broiler chickens. *Applied Animal Behaviour Sciences*, 71, 127-140.
- PICARD, M.L., FAURE, J.M. 1997. Comportement : scan ou focal, faut-il choisir ? *Deuxièmes Journées de la Recherche Avicole*, Tours, France, 213-216.
- PORTER, R.H., PICARD, M., ARNOULD, C., TALLET, C. 2002. Chemosensory deficit are associated with reduced weight gain in newly hatched chicken. *Animal Research*, 51, 337-345.
- POST, J., REBEL, J.M.J., Ter HUURNE, A.A.H.M. 2003a. Automated blood cell count: a sensitive and reliable method to study corticosterone-related stress in broilers. *Poultry Science*, 82, 591-595.
- POST, J., REBEL, J.M.J., Ter HUURNE, A.A.H.M. 2003b. Physiological effects of elevated plasma corticosterone concentrations in broiler chickens. An alternative means by which to assess the physiological effects of stress. *Poultry Science*, 82, 1313-1318.
- PRETI, G., WYSOCKI, C.J., BARNHART, K.T., SONDEHEIMER, S.J., LEYDEN, J.J. 2003. Male axillary extracts contain pheromones that affect pulsatile secretion of luteinizing hormone and mood in women recipients. *Biology of Reproduction*, 68, 2107-2113.
- PUVADOLPRIOD, S., THAXTON, J.P. 2000a. Model of physiological stress in chickens, response parameters. *Poultry Science*, 79, 370-376.
- PUVADOLPRIOD, S., THAXTON, J.P. 2000b. Model of physiological stress in chickens, quantitative evaluation. *Poultry Science*, 79, 391-395.

RENEERKENS, J., PIERSMA, T., DAMSTE, J.S. 2005. Switch to diester preen waxes may reduce avian nest predation by mammalian predators using olfactory cues. *Journal of Experimental Biology*, 208, 4199-4202.

RESTREPO, D., ARELLANO, J., OLIVA, A.M., SCHAEFER, M.L., LIN, W. 2004. Emerging views on the distinct but related roles of the main and accessory olfactory systems in responsiveness to chemosensory signals in mice. *Hormones and Behavior*, 46, 247-256.

RICHARD-YRIS, M.A., GARNER, D.H., le BOUCHER, G. 1983. Induction of maternal behaviour and some hormonal and physiological correlates in the domestic hen. *Hormones and Behavior*, 17, 345-355.

ROBINSON, B., SNAPIR, N., PEREK, M. 1977. Removal of the olfactory bulbs in chickens: consequent changes in food intake and thyroid activity. *Brain Research Bulletin*, 4, 263-271.

RODEN, C., WECHSLER, B. 1997. A comparison of the behaviour of domestic chicks reared with or without a hen in enriched pens. *Applied Animal Behaviour Science*, 55, 317-326.

RODENBURG, T.B., Van HIERDEN, Y.M., BUITENHUIS, A.J., RIEDSTRA, B., KOENE, P., KORTE, S.M., Van Der POEL, J.J., GROOTHUIS, T.G.G., BLOKHUIS, H.J. 2005. Feather pecking in laying hens: new insights and directions for research. *Applied Animal Behaviour Science*, 86, 291-298.

RODIC, V., PERIC, I., VUKELIC, N., MILOSEVIC, N. 2006. Consumer's attitudes towards chicken meat produced in extensive systems. *XII European Poultry Conference*, Vérone, Italie, 186-187.

ROPER, T.J. 1999. Olfaction in birds. *Advances in the Study of behavior*, 28, 247-332.

ROPER, T.J., MARPLE, N.M. 1997. Odour and colour as cues for taste-avoidance learning in domestic chicks. *Animal behaviour*, 53, 1241-1250.

ROSALES, A.G. 1994. Managing stress in broiler breeders: a review. *Journal of Applied Poultry Research*, 3, 199-207.

ROWE, C., GUILFORD, T. 1999. Novelty effects in a multimodal warning signal. *Animal Behavior*, 57, 341-346.

RUSHEN, J. 2000. Some issues in the interpretation of behaviour responses to stress. "The biology of animal stress", Moberg & Mench Ed., CABI publishing, 23-39.

SADANANDA, M., BISCHOF, H.J. 2006. c-fos induction in forebrain areas of two different visual pathways during consolidation of sexual imprinting in the zebra finch (*Taeniopygia guttata*). *Behavioural Brain Research*, 173, 262-267.

SAITO, S., TACHIBANA, T., CHOI, Y.H., FURUSE, M. 2005. ICV CRF and isolation stress differentially enhance plasma Corticosterone concentration in layer and meat type neonatal chicks. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 141, 305-309.

SAM, M., VORA, S., MALNIC, B., MA, W., NOVOTNY, M.V., BUCK, L.B. 2001. Odorants may arouse instinctive behaviours. *Nature*, 412, 142.

- SANDERCOCK, D.A., HUNTER, R.R., MITCHELL, M.A., HOCKING, P.M. 2006. Thermoregulatory capacity and muscle membrane integrity are compromised in broilers compared with layers at the same age or body weight. *British Poultry Science*, 47, 322-329.
- SANLIER, N., YABANCI, N. 2007. Relationship between body mass index, lipids and homocysteine levels in university students. *Journal of Pakistan Medical Association*, 57, 491-495.
- SAVORY, C.J., MANN, J.S. 1997. Behavioural development in groups of pen-housed pullets in relation to genetic strain, age and food form. *British Poultry Science*, 38, 38-47.
- SEGOVIA, S., GARCIA-FALGUERAS, A., CARILLO, B., COLLADO, P., PINOS, H., PEREZ-LASO, C., VINADER-CAEROLS, C., BEYER, C., GUILLAMON, A. 2006. Sexual dimorphism in the vomeronasal system of the rabbit. *Brain Research*, 1102, 52-62.
- SCHAAL, B., COURREAUD, G., LANGLOIS, D., GINIES, C., SEMON, E., PERRIER, G. 2003. Chemical and behavioural characterization of the rabbit mammary pheromone. *Nature*, 424, 68-72.
- SCHAAL, B., COUREAUD, G., LANGLOIS, D. 2005. De quelques étapes méthodologiques dans l'analyse de la communication chimique chez les mammifères. *La communication. De l'éthologie à la pathologie, des neurosciences à la thérapie*, Zoopsy Ed.. Marseille, 91-101.
- SCHAAL, B., DOUCET, S., SAGOT, P., HERTLING, E., SOUSSIGNAN, R. 2006. Human breast areolae as scent organs: morphological data and possible involvement in maternal-neonatal coadaptation. *Developmental Psychobiology*, 48, 100-110.
- SCHLEIDT, V.W.M. 1961. Reaktionen von truthuhnern auf fliegende raubvogel und versuche zur analyse ihrer AAP's. Ouvrage du *Max-Planck-Institut für Verhaltensphysiologie*, 534-559.
- SCHNEIDER, K., KLAAS, R., KASPERS, B., STAEHELLI, P. 2001. Chicken Interleukin- 6. cDNA structure and biological properties. *European Journal of Biochemistry*, 268, 4200-4206.
- SCHWERIN, M., KANITE, M., TUCHSCHERER, K.P., BRUSSOW, G., NURNBERG, G., OTTEN, W. 2005. Stress related gene expression in brain and adrenal gland of porcine foetuses and neonates. *Theriogenology*, 63, 1220-1234.
- SHANE, S. 2003. Evaluating consumer acceptance performance enhancers. *World Poultry*, 19, 32-33.
- SICARD, G., CHASTRETTE, M., GODINOT, N. 1997. Des représentations de l'espace olfactif: des récepteurs à la perception. *Intellectica*, 24, 85-107.
- SIEGEL, H.S. 1995. Stress, strains and resistance. *British Poultry Science*, 36, 03-22.
- SIGNORET, J.P., LEVY, F., NOWAK, R., ORGEUR, P., SCHAAL, B. 1997. Le rôle de l'odorat dans les relations interindividuelles des animaux d'élevage. *INRA Productions Animales*, 5, 339-348.

SILIM, A., REKIK, R.M. 1992. Immunologie des oiseaux. *Manuel de pathologie aviaire*, Brugère-Picoux et Silim, ENV Maison-Alfort Ed., 93pp.

SKINNER-NOBLE, D.O., JONES, R.B., TEETER, R.G. 2003. Components of feed efficiency in broiler breeding stock: is improved feed conversion associated with increased docility and lethargy in broilers? *Poultry Science*, 82, 532-537.

SMIDT, D. 1983. Advantages and problems of using integrated systems of indicators as compared to single traits. *Indicators relevant to farm animal welfare*, The Netherlands Martinus Nijhoff Ed., 201-207.

SNEDDON, P.J., HADDEN, R., HEPPEL, P.G. 1998. Chemiosensory learning in the chick embryo. *Physiology and Behavior*, 64, 133-139.

SOMES, R.G. 1991. Recessive inherited doubling of the chicken's uropygial gland papilla. *Journal of Heredity*, 82, 69-71.

SPEEDY, A.W. 2003. Global production and consumption of animal source foods. *Journal of Nutrition*, 133, 4048-4053.

SPINU, M., BENVENESTE, S., DEGEN, A.A. 2003. Effect of density and seasons on stress and behaviour in broiler breeder hens. *British Poultry Science*, 44, 170-174.

SPINU, M., DEGEN, A.A. 1993. Effect of cold stress on performance and immune responses of Bedouin and white leghorn hens. *British Poultry Science*, 34, 177-185.

STEFFENS, A.B., de BOER, S.F. 1999. Impact of stress on animal intermediate metabolism. *Stress Physiology in Animals*, P. Balm Ed., Sheffield Academic Press, Sheffield, UK.

STEIN, M., MILLER, A.H. 1993. Stress, the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, and immune function. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 335, 1-5.

SUGE, R., McCABE, J. 2004. Early stages of memory formation in filial imprinting: fos-like immunoreactivity and behavior in the domestic chick. *Neuroscience*, 123, 847-856.

Tachibana, T., Oikawa, D., Takahashi, H., Boswell, T., Furuse, M. 2007. The anorexic effect of alpha-melanocyte-stimulating hormone is mediated by corticotrophin-releasing factor in chicks. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 147, 173-178.

TANKSON, J.D., VIZZIER-THAXTON, Y., THAXTON, J.P., MAY, J.D., CAMERON, A. 2001. Stress and nutritional quality of broilers. *Poultry Science*, 80, 1384-1389.

Thaxton, J.P., Dozier, A., Branton, S.L., Morgan, W., Miles, D.W., Roush, W.B., Lott, B.D., Vizzier-Thaxton, Y. 2006. Stoking density and physiological adaptive responses of broilers. *Poultry Science*, 85, 819-824.

TIERNEY, K.B., TAYLOR, A.L., ROSS, P.S., KENNEDY, C.J. 2006. The alarm reaction of coho salmon parr is impaired by the carbamate fungicide IPBC. *Aquatic Toxicology*, 79, 149-157.

TOLHURST, B.E., VINCE, M.A. 1976. Sensitivity to odours in the embryo of the domestic fowl. *Animal Behavior*, 24, 772-779.

TOPAL, S., KOCACALISKAN, I., ARSLAN, O. 2006. Herbicidal potential of catechol as an allelochemical. *Journal of Biosciences*, 61, 69-73.

TUCKER, D. 1965. Electrophysiological evidence for olfactory function in birds. *Nature*, 207, 34-36.

TUDGE, C. 2005. Feeding people is easy: but we have to re-think the world from first principles. *Public Health and Nutrition*, 8, 716-723.

TURNER, C.A., YANG, M.C., LEWIS, M.H. 2002. Environmental enrichment: effects on stereotyped behaviour and regional neuronal metabolic activity. *Brain Research*, 938, 15-21.

TURRO, I., PORTER, R.H., PICARD, M. 1994. Olfactory cues mediate food selection by young chicks. *Physiology and Behavior*, 55, 761-767.

UNION EUROPEENNE. 1976. Convention européenne sur la protection des animaux dans les élevages. *STCE*, 087.

VALLORTIGARA, G.L., REGOLIN, L., MARCONATO, F. 2005. Visually inexperienced chicks exhibit spontaneous preference for biological motion patterns. *Plos Biology*, 3, 1312-1316.

VAN der SLUIS, W. 2003. Weighing broiler breeders accurately. *World Poultry*, 19, 23-24.

VAN HOEK, C.S., KING, C.E. 1997. Causation and influence of environmental enrichment on feather picking of the crimson-bellied conure. *Zoology and Biology*, 16, 161-172.

VANDENBERGH, J.G. 1969. Male odor accelerates female sexual maturation in mice. *Endocrinology*, 84, 658-660.

VILLATE, D. 2001. Maladies des volailles. *Ed. France Agricole*, Paris, 399 pp.

VLECK, C.M., VERTICALINO, N., VLECK, D., BUCHER, L. 2000. Stress, Corticosterone and heterophil to lymphocyte ratios in free living adelic penguins. *The Condor*, 102, 392-400.

WAGNER, R.C., BOORD, R.L. 1975. Cytological differentiation in the uropygial gland. *Journal of Morphology*, 46, 395-413.

WALDVOGEL, J.A. 1989. Olfactory orientation by birds. *Current Ornithology*, 6, 269-321.

WANG, R., MILLAM, J.R., KLASING, K.C. 2003. Distribution of interleukin-1 receptor in chicken and quail brains. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 136, 663-671.

WEBSTER, A.B. 2000. Behavior of white leghorn laying hens after withdrawal of feed. *Poultry Science*, 79, 192-200.

WEINING, K.C., SICK, C., KASPER, B., STAEHELI, P. 1998. A chicken homolog of mammalian interleukin 1 beta: cDNA cloning and purification of active recombinant protein. *European Journal of Biochemistry*, 258, 994-1000.

WEST, B., ZHOU, B.X. 1988. Did chickens go north. New evidence for domestication. *Journal of Archeological Sciences*, 15, 515-533.

- WILKINS, L.J., BROWN, S.N., PHILLIPS, A.J., WARRISS, P.D. 2003. Cleanliness of broilers when they arrive at the poultry processing plant. *The Veterinary Record*, 153, 701-703.
- WILTSCSKO, R. 1996. The function of the olfactory input in pigeon orientation: does it provide navigational information or play another role? *Journal of experimental Biology*, 199, 113-119.
- WINBERG, J., PORTER, R.H. 1998. Olfaction and human neonatal behaviour: clinical implication. *Acta Paediatrica*, 87, 6-10.
- WINGFIELD, J.C., BREUNER, C., JACOB, J. 1997. Corticosterone and behavioural responses to unpredictable events. *Journal of Endocrinology*, 267-278.
- WITT, M., HUMMEL, T. 2006. Vomeronasal versus olfactory epithelium: is there a cellular basis for human vomeronasal perception? *International Review of Cytology*, 248, 208-259.
- WITT, M., WOOZNIAK, W. 2006. Structure and function of the vomeronasal organ. *Advance in Otorhinolaryngology*, 63, 70-83.
- WOELFEL, R.L., OWENS, C.M., HIRSCHLER, E.M., SAMS, A.R. 2002. The incidence and characterization of pale, soft and exudative chicken meat in a commercial plant. *Poultry Science*, 81, 579-584.
- WOODCOCK, E.A., PAJOR, E.A., LATOUR, M.A. 2004. The effects of hen vocalizations on chicks' feeding behavior. *Poultry Science*, 83, 1940-1943.
- WYSOCKI, C.J., PRETI, G. 2004. Facts, fears, and frustration with human pheromones. *The Anatomical Record Part A: Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology*, 281, 1201-1211.
- YOSHIMURA, T., YASUO, S., WATANABE, M., IIGO, M., YAMAMURA, T., HIRUNAGI, K., EBIHARA, S. 2003. Light-induced hormone conversion of T4 to T3 regulates photoperiodic response of gonads in birds. *Nature*, 426, 178-181.
- ZUIDHOF, M.J. 2005. Mathematical characterization of broiler carcass yield dynamics. *Poultry Science*, 84, 1108-1122.
- ZULKIFLI, I., GILBERT, J., LIEW, P.K., GINSOS, J. 2002. The effects of regular visual contact with human beings on fear, stress, antibody and growth responses in broiler chickens. *Applied Animal Behaviour Science*, 79, 103-112.

# TABLE DES MATIERES

Liste des publications .....	5
Liste des sigles et des abréviations.....	7
Liste des illustrations .....	8
<b>Introduction.....</b>	<b>10</b>
<b>PARTIE I : CONTEXTE DE L'ETUDE .....</b>	<b>13</b>
<b>Chapitre I : le poulet domestique.....</b>	<b>14</b>
1. Ses origines zoologiques.....	14
2. Les étapes de sa domestication.....	14
3. Ethologie du poulet domestique .....	16
3.1. <i>Expérience, empreinte et attachement</i> .....	16
3.2. <i>Les comportements déviants</i> .....	18
4. La production de poulets de chair aujourd'hui.....	20
4.1. <i>Les techniques d'élevage</i> .....	20
4.2. <i>Le cycle de vie du poulet</i> .....	21
5. Améliorer les conditions d'élevage.....	24
5.1. <i>Questionnements éthiques</i> .....	24
5.2. <i>Interventions du législateur</i> .....	25
5.3. <i>Réponses de la profession</i> .....	26
<b>Chapitre II : le stress .....</b>	<b>29</b>
1. Définitions.....	29
2. Les causes .....	29
3. Les modulateurs .....	30
4. Conséquences et méthodes de mesure.....	31
4.1. <i>Performances zootechniques</i> .....	31
4.2. <i>Physiologie</i> .....	32
4.3. <i>Incidences comportementales</i> .....	35
<b>Chapitre III : l'olfaction et son rôle dans la communication chez les oiseaux .....</b>	<b>38</b>
1. Mise en évidence de la perception des odeurs .....	38
2. Anatomie de l'organe récepteur .....	39
3. Physiologie de l'olfaction .....	40
4. Les médiateurs de la communication chimique.....	41

5. Les phéromones : production et perception .....	43
6. La communication olfactive mère-jeune .....	46
<b>PARTIE II : OBJECTIFS DE TRAVAIL ET RESULTATS .....</b>	<b>48</b>
<b>Chapitre I : objectifs et moyens mis en oeuvre .....</b>	<b>49</b>
1. Notre hypothèse de travail.....	49
2. Description de MHUSA.....	49
3. Objectifs et méthode générale.....	51
4. Moyens mis en oeuvre .....	51
<b>Chapitre II : les effets de MHUSA, bilan .....</b>	<b>54</b>
1. Critères zootechniques .....	54
2. Critères physiologiques .....	55
3. Critères comportementaux .....	57
<b>Chapitre III : les effets de MHUSA, résultats expérimentaux .....</b>	<b>60</b>
1. Essais en élevage n°1 : poulet <i>Lourd</i> .....	60
1.1. <i>Type de communication et résumé</i> .....	60
1.2. <i>Texte original de la communication</i> .....	61
2. Essai en élevage n°2 : poulet <i>Standard</i> .....	69
2.1. <i>Type de communication et résumé</i> .....	69
2.2. <i>Texte original de la communication</i> .....	70
3. Essai en élevage n°3 : poulet <i>Label</i> .....	77
3.1. <i>Type de communication et résumé</i> .....	77
3.2. <i>Texte original de la communication</i> .....	78
4. Essai en élevage n°4 : qualité de la viande.....	85
4.1. <i>Type de communication et résumé</i> .....	85
4.2. <i>Texte original de la communication</i> .....	86
5. Essai en station n°1 : mesure de l'indice de consommation .....	96
5.1. <i>Type de communication et résumé</i> .....	96
5.2. <i>Texte original de la communication</i> .....	97
6. Essai en station n°2 : physiologie et production de cytokines .....	105
6.1. <i>Type de communication et résumé</i> .....	105
6.2. <i>Texte original de la communication</i> .....	106
7. Essai en station n°3 : évolution comportementale du poulet en croissance.....	122
7.1. <i>Type de communication et résumé</i> .....	122
7.2. <i>Texte original de la communication</i> .....	123
8. Essai en station n°4 : peur et réactions comportementales .....	126
8.1. <i>Type de communication et résumé</i> .....	126
8.2. <i>Texte original de la communication</i> .....	127

9. Essai en station n°5 : test de préférence.....	134
9.1. Type de communication et résumé .....	134
9.2. Texte original de la communication.....	135
<b>PARTIE III : DISCUSSION GENERALE.....</b>	<b>142</b>
<b>Chapitre I : analyse des méthodes utilisées .....</b>	<b>143</b>
1. Validation de MHUSA.....	143
2. Composante zootechnique.....	143
2.1. Lieux d'étude .....	143
2.2. Taille des effectifs et analyse des échantillons .....	144
3. Composante physiologique .....	144
3.1. Lieux d'étude et stress .....	144
3.2. Protocole expérimental et analyse statistique.....	145
3.3. Technique d'analyse.....	146
4. Composante comportementale .....	146
4.1. Lieux d'étude .....	146
4.2. Echantillonnage .....	147
4.3. Visualisation spatiale des poulets .....	148
4.4. Utilisation des leurres .....	149
5. Particularité des paramètres sanguins .....	149
<b>Chapitre II : analyse des résultats .....</b>	<b>150</b>
1. Aspects zootechniques.....	150
2. Aspects physiologiques et indicateurs sanguins .....	150
3. Aspects comportementaux.....	151
4. Liaisons entre les résultats observés .....	152
5. Impact et hiérarchisation des facteurs étudiés .....	154
6. Importance des protocoles expérimentaux.....	154
<b>Chapitre III : extension du travail .....</b>	<b>156</b>
1. Approfondir les résultats acquis .....	156
1.1. Physiologie et paramètres sanguins .....	156
1.2. Présence étrangère.....	157
1.3. Qualité de viande.....	157
1.4. Indice de consommation et rentabilité.....	158
1.5. Effectuer un suivi longitudinal.....	159
1.6. Mesurer l'effet sexe .....	160
1.7. Définir un modèle de travail.....	160
1.8. Particularités d'un essai multicentrique.....	161
2. Comprendre le mode d'action .....	162

2.1. <i>Interpréter la perception de MHUSA</i> .....	162
2.2. <i>Comparer MHUSA et la substance native</i> .....	163
3. <i>Travailler sur des productions connexes</i> .....	164
3.1. <i>Les poules pondeuses</i> .....	164
3.2. <i>Le secteur de la sélection génétique</i> .....	164
3.3. <i>Les autres productions de rente</i> .....	164
3.4. <i>Les animaux de compagnie</i> .....	165
4. <i>Catégoriser MHUSA</i> .....	165
<b>Conclusion</b> .....	<b>167</b>
Bibliographie.....	170

***Effets du sémiachimique MHUSA (Mother Hens' Uropygial Secretion Analogue) sur le stress des poulets de chair : approches zootechnique, physiologique et comportementale.***

**Résumé**

**Constats et hypothèses** L'Homme a détourné, et donc faussé, l'importance des relations mère/jeune. Les techniques de production actuelles sont telles que les poussins sont introduits dans des bâtiments d'élevage âgés d'un jour. Ils y sont élevés par lots homogènes jusqu'à leur abattage. A partir de la ponte, le contact avec la mère n'existe plus, ce qui peut modifier l'empreinte et le lien d'attachement. Certains comportements originels, issus de l'ancêtre du poulet actuel, sont encore fonctionnels, alors que d'autres sont déviants. Le stress, qui peut être caractérisé par différents indicateurs, a des conséquences mesurables sur les performances, la physiologie et le comportement du poulet. Ce dernier est capable de détecter et reconnaître des odeurs, notamment celle de son nid. Quant à la mère suitée, elle sécrète, par la glande uropygiale, un bouquet odorant caractéristique de son état. Partant de ces constats nous avons voulu tester les effets de la diffusion d'un analogue de cette sécrétion (MHUSA ou *Mother Hens' Semiochemical Analogue*) sur la réponse au stress chez le poulet domestique (*Gallus gallus*).

**Résultats zootechniques** Les poids vifs finaux et intermédiaires sont plus élevés pour les poulets élevés sous MHUSA. La qualité du produit final est aussi améliorée : poids de carcasse supérieur avec une masse de filet plus importante sans être plus grasse et une couleur de viande plus uniforme sous MHUSA. L'indice de consommation n'est pas significativement influencé par MHUSA.

**Résultats physiologiques** Les indicateurs de référence (ratio Hétérophiles/Lymphocytes ou corticostérone) montrent des niveaux de stress inférieurs sous MHUSA. Comme conséquence, on montre notamment que la production de certaines cytokines (et donc la réaction immunitaire) est influencée par une exposition à MHUSA (IFN $\gamma$  et IL6).

**Résultats comportementaux** Après une période d'adaptation, un poussin isolé se dirige dans une zone plus concentrée en MHUSA. Des poulets en croissance sous MHUSA s'adaptent mieux à leur environnement et montrent des réactions de peur moins prononcées.

**Conclusion** L'ensemble de nos travaux montre que des poulets domestiques évoluant dans une atmosphère chargée en MHUSA, comparativement à des animaux non traités, ont des performances supérieures et une réponse au stress diminuée, à la fois au niveau physiologique et comportemental. Il semble que ces réactions ne nécessitent pas d'apprentissage de la part du poulet.

**Mots clés :** Poulet, Stress, Performances, Physiologie, Comportement, MHUSA

---

***Effects of the semiochemical MHUSA (Mother Hens' Uropygial Secretion Analogue) on stress in broiler chickens: performances, physiological and behavioural approach.***

**Abstract**

**Records and hypothesis** In modern husbandries, chicks are raised in buildings with hundreds of counterparts, from hatching to slaughter. During its whole life, the chicken will never know its own mother. Human has thus modified and side tracked the mother-young relationship, which could modify both imprinting and attachment link. Thereby, some original behaviours (from domestic chicken ancestor) are still active for birds, while others are not. Stresses, which may be assessed through several indicators, have detrimental effects on performances, physiology and behaviour. Chicks and chickens are able to detect odours, among which odours from their own nest. Meanwhile, during its motherhood, the hen secretes odorant molecules from its uropygial gland. Knowing this, we attempted to assess the effects of an analogue of this particular secretion (MHUSA or *Mother Hens' Semiochemical Analogue*) on stress response in the domestic chicken (*Gallus gallus*).

**Results on performances** Several indicators indicate a positive influence of MHUSA. Chickens are heavier, at intermediate and final weightings. The final product is of better quality since carcass weight is increased without an increase in fat content, and the colour of the meat is more homogenous. Nevertheless, feed to gain ratio is not significantly affected by the treatment.

**Results on physiology** Usual stress parameters (Heterophil/Lymphocyte ratio as well as corticosterone) are always lower under MHUSA, further indicating lower stress. As a consequence, we show that some cytokine (IFN $\gamma$  and IL6). production patterns (thus immune reaction) are also under MHUSA's influence.

**Results on behaviour** After an adaptation sequence, an isolated chick directs himself towards an area where MHUSA is more diffused. Growing chickens under MHUSA better cope with their surroundings and show less specific fear reactions.

**Conclusion** Our results show that domestic chickens, under a MHUSA treated atmosphere have lower responses to stressors. This is assessed through performances, physiology and behaviour. MHUSA seems both to play a role in the chicken's reaction to a stressful situation and to have an attractant-like effect. These responses may be innate and not learned.

**Key words:** Broiler, Stress, Performances, Physiology, Behaviour, MHUSA