



HAL
open science

L'inflammation génitale post-partum de la vache

Laure Deguillaume

► **To cite this version:**

Laure Deguillaume. L'inflammation génitale post-partum de la vache. Médecine vétérinaire et santé animale. AgroParisTech, 2010. Français. NNT : 2010AGPT0081 . pastel-00591104v2

HAL Id: pastel-00591104

<https://pastel.hal.science/pastel-00591104v2>

Submitted on 6 May 2011

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

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



Doctorat ParisTech

THÈSE

pour obtenir le grade de docteur délivré par

**L'Institut des Sciences et Industries
du Vivant et de l'Environnement**

(AgroParisTech)

Spécialité : Reproduction

présentée et soutenue publiquement par

Laure DEGUILLAUME

le 14 Décembre 2010

L'inflammation génitale post-partum de la vache

Directeur de thèse : **Pr. Sylvie CHASTANT-MAILLARD**

Jury

M. Jacques GUILLOT, Professeur, UMR 956, INRA-ANSES-Paris XII-ENVA
M. Stephen LEBLANC, Maître de Conférences, Université de Guelph, Canada
M. Geert OPSOMER, Professeur, Université de Gent, Belgique
Mme Claire PONSART, Docteur, UNCEIA, Maisons-Alfort
M. Jean-Paul RENARD, Directeur de Recherche, UMR 1198, INRA-ENVA

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur

*« La science ? Après tout, qu'est-elle,
sinon une longue et systématique curiosité ? »*

André Maurois

Terre promise [1946]

Remerciements

Ce travail de thèse est le fruit de multiples rencontres et collaborations. Son aboutissement a été rendu possible grâce à l'apport, le soutien moral et scientifique de toutes ces personnes.

Je tiens à remercier tout particulièrement le Professeur Sylvie Chastant-Maillard, directrice de cette thèse, qui m'a inspiré ce sujet et guidée dans ce travail. Depuis la naissance de ce projet au détour d'un Congrès en Décembre 2006, d'autres « discussions de couloir » se sont succédées, au sein de la joyeuse Unité de Reproduction de l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, toujours aussi vives que fructueuses. J'ai bénéficié de sa constante disponibilité, sa grande qualité d'écoute et sa remarquable pédagogie. Elle m'a transmis sa passion pour la recherche et m'a fait partager les joies de l'enseignement. Ces quatre années à ses côtés ont été une source permanente d'enrichissements aussi bien personnel que professionnel. Qu'elle trouve ici ma profonde reconnaissance et l'espérance que, bien que nos chemins se séparent géographiquement, nous serons amenés à maintenir des liens scientifiques et amicaux dans le futur.

J'adresse ma profonde gratitude au Docteur Stephen LeBlanc, de l'Université de Guelph, au Canada et au Professeur Geert Opsomer, de l'Université de Gent, en Belgique, qui ont chaleureusement accepté la lourde tâche de rapporteur. Je tiens également à remercier le Professeur Jacques Guillot, correspondant scientifique de l'Ecole Doctorale ABIES à l'ENVA, le Docteur Claire Ponsart, de l'UNCEIA et le Docteur Jean-Paul Renard, Directeur de Recherche dans l'UMR Biologie du Développement et Reproduction de l'INRA, qui ont accepté d'examiner ce travail avec bienveillance. La diversité des compétences scientifiques de ce jury de thèse contribuera, je l'espère, par la pertinence de ses commentaires, à enrichir ce travail de recherche.

Mes remerciements s'adressent ensuite au Docteur René Fournier, responsable technique de la gamme bovins du laboratoire Intervet, pour m'avoir permis de me familiariser avec le monde de la reproduction bovine. Depuis la naissance du projet au Congrès de Buiatrie à Nice, j'ai été touchée par son implication et sa confiance absolue dans notre travail. Je le remercie chaleureusement pour son efficacité, sa constante générosité et sa grande disponibilité.

Ce travail me donne aussi l'occasion de remercier tout particulièrement la joyeuse équipe de l'Unité de Reproduction de l'ENVA, à laquelle le laboratoire de Biologie du Développement et Reproduction y est scientifiquement et sentimentalement attaché. Tout d'abord, mes collègues de

reproduction bovine, qui m'ont accueillie et soutenue depuis ma thèse vétérinaire début 2007, jusqu'à ma thèse de Sciences et ont guidé mes premiers pas dans l'enseignement. Je voudrais exprimer toute ma reconnaissance à Fabienne Constant, pour sa grande confiance et la qualité de ses conseils ; Dominique Remy et Guillaume Belbis, pour leur humeur joviale, qui rend extrêmement agréable la profession au quotidien ; Isabelle Hansen, pour son dynamisme, sa grande efficacité et sa large contribution à l'ambiance musicale de l'Unité. Ensuite, Karine Reynaud pour sa disponibilité et la qualité de ses rapports humains ; Martine Chebrou, pour s'être éloignée régulièrement de sa paillasse pour s'intéresser aux problématiques des vétérinaires ruraux ; Sandra Thoumire et Christine Vornière, pour avoir tenté l'expérience et m'avoir accompagnée, même par des temps rigoureux, dans les élevages de la région parisienne ; enfin Sabine Halter et Zaïd Tahir, thésards du laboratoire, pour leurs encouragements autour du microscope. Je leur souhaite beaucoup de courage et de réussite dans la suite de leur travail. Cette recherche doit également fortement à la bienveillance du Docteur Marc Chodkiewicz, ex-enseignant de l'Unité de Reproduction. Ses compétences linguistiques, mais aussi sa conception de la pédagogie, la pertinence de son analyse et son ouverture d'esprit, m'ont particulièrement guidée dans ma réflexion. Qu'il trouve ici mon profond respect et mon entière reconnaissance. J'adresse aussi mes remerciements à nos homologues de reproduction canine, qui se mélangent spontanément à la bruyante troupe des enseignants bovins, ainsi que nos collègues de zootechnie, pathologie du bétail et de chirurgie, avec qui il a été stimulant et enrichissant de discuter et de travailler. Enfin, je souhaite remercier les animaliers Cathy, Francis et Mickaël, ainsi que notre duo de chauffeurs, Fernand et Malik, qui répondent toujours avec enthousiasme aux missions saugrenues de l'Unité de Reproduction. Je n'oublie pas la souriante et compétente équipe de la bibliothèque qui offre, par la grande qualité, diversité et disponibilité de ses ouvrages, un cadre idéal pour de fructueuses recherches bibliographiques. Les particularités, les compétences et les enseignements de chacun ont donc favorisé mon développement et mon épanouissement au sein de l'ENVA. Ce n'est en définitive que mon éternelle curiosité qui me conduit vers de nouveaux horizons.

Je tiens particulièrement à remercier Anne Geffré, ingénieur de recherche dans le Service de Biochimie de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, pour sa proposition spontanée de participation à ce travail. D'une durée initiale d'un an, elle m'a finalement accompagnée tout au long de cette étude et m'a fait découvrir les beautés et les surprises de l'examen cytologique. Son énergie et sa détermination ont permis un encadrement efficace d'une succession de thésards vétérinaires et de fructueuses années de collaboration. J'ai également eu la chance de travailler

avec Loïc Desquilbet, enseignant en biostatistiques - épidémiologie analytique à l'ENVA, qui a chaleureusement accepté de contribuer à ce projet. Il a su brillamment transposer ses connaissances de santé publique vers une thématique purement vétérinaire, avec laquelle il n'était pas encore familiarisé. C'est avec un immense plaisir que j'ai bénéficié de sa grande disponibilité, apprécié sa curiosité d'esprit et partagé sa passion pour l'entropie, car « l'ordre est le plaisir de la raison : mais le désordre est le délice de l'imagination ¹ ».

Mes remerciements s'adressent également à tous les thésards vétérinaires et stagiaires agronomes qui ont contribué à ce travail. Ils ont été nombreux chaque année à accepter avec enthousiasme et détermination l'ambitieux projet d'une thèse expérimentale. Depuis Adèle et Charlotte qui ont opéré seules, de multiples équipes se sont succédées, dont Camille et Hannah, Claire et Alexandre, Hélène et Damien, Audrey et Arnaud, et Julie et Barbara, toujours aussi surprenantes d'efficacité et de complémentarité. J'espère avoir fait preuve de suffisamment de pédagogie et d'encadrement pour favoriser leur épanouissement. Qu'ils soient assurés du plaisir que j'ai éprouvé à travailler avec eux.

Ce projet doit également à la bienveillance des éleveurs des troupeaux bovins de la région parisienne et plus particulièrement à Sandra, David et Damien, qui m'ont ouvert leurs portes pendant plus de trois années et ont fait preuve d'une confiance absolue dans notre projet. Je tiens à les remercier pour leur investissement et leur enthousiasme permanent face aux nouvelles inventions de l'Ecole Vétérinaire. Merci aussi aux éleveurs français et vétérinaires praticiens qui m'ont donné goût à ce métier et qui ont contribué par la pertinence de leurs remarques à me faire progresser dans ma réflexion.

Pour finir, j'adresse mes sincères remerciements à mes parents, mon frère, ma famille, pour leur amour et leur soutien tout au long de mes études. Qu'ils trouvent ici mon entière reconnaissance et mon extrême affection. A mes amis, mes proches, qui par leur présence chaleureuse et leur réconfort ont su m'entourer dans les moments de doute. Enfin, à Antoine, « équipier » des premières heures de ma formation vétérinaire, pour tous ces moments que nous avons partagés ensemble et pour tous ceux qui restent à venir. Que ce travail soit le témoignage de mon profond attachement.

Un grand merci, enfin, à tous ceux qui le temps d'un regard ou l'espace d'un sourire, m'ont fait apprécier le métier d'enseignant-chercheur, mieux que ne l'aurait fait aucun manuel.

¹ Claudel P. [1929] *Le Soulier de satin ou le pire n'est pas toujours sûr*. Paris : Gallimard (1997), 592p.

Résumé

Les bovins se distinguent des autres espèces de mammifères par une contamination microbienne inévitable de l'utérus au moment du vêlage, à l'origine d'une mobilisation de l'immunité génitale de l'animal. Cependant, alors que l'inflammation utérine post-partum est systématique et physiologique, sa persistance au-delà de 21 jours post-partum (JPP) devient pathologique. Le but de ce travail était de décrire chez la vache Prim'Holstein, l'inflammation utérine et cervicale post-partum, physiologique et pathologique, en utilisant l'examen cytologique comme technique de référence.

Nous avons tout d'abord validé la fiabilité de lecture de cet examen par l'observation d'une bonne concordance inter- ($\alpha_c = 0,91$; IC95%, 0,89 – 0,94) et intra-opérateur ($\alpha_c = 0,88$; IC95%, 0,80 – 0,97). Des prélèvements réalisés en différents sites (col, corps utérin, corne droite et corne gauche) ont cependant montré l'hétérogénéité de l'inflammation au sein du tractus génital femelle. Le statut inflammatoire n'était pas non plus le reflet de la colonisation bactérienne de la lumière utérine, mise en évidence par les techniques de bactériologie conventionnelles. Les granulocytes neutrophiles constituant la sous-population leucocytaire dominante des frottis génitaux (médiane, 100% ; écart interquartile, 89% - 100%), le taux de neutrophiles (%N ; proportion de neutrophiles parmi les 200 cellules comptées) a donc été utilisé pour caractériser le statut inflammatoire cervical et utérin.

Nous avons ensuite défini l'inflammation pathologique : une proportion de neutrophiles endométriaux $\geq 6\%$ entre 21 et 35 JPP était associée à une diminution du taux de gestation dans les 300 JPP (RRa, 0,4 ; IC95%, 0,2 – 0,7 ; $P < 0,01$) ; moins de sept jours avant la mise à la reproduction, un %N $\geq 1\%$ était associé à une diminution du taux de réussite à l'insémination. Par ailleurs, l'inflammation du col était également associée à court terme (au seuil de 2%N dans les sept jours précédents l'insémination) et à long terme (au seuil de 5%N entre 21 et 35 JPP) à une réduction des performances de reproduction. Col et utérus sont apparus comme deux compartiments séparés, 31% des vaches qui présentaient une inflammation pathologique de l'utérus n'étaient en revanche pas affectées par une inflammation du col. L'inflammation pathologique était de forte prévalence, comprise entre 36 et 41% pour le col et entre 43 et 57% pour l'utérus, selon le moment du prélèvement. Les inflammations endocervicale et endométriale avaient un effet additif, leur présence simultanée avant 35 JPP étant plus délétère pour la fertilité que la présence de chacune d'elles séparément.

Nous nous sommes aussi intéressés à la cinétique d'évolution de l'inflammation génitale post-partum. Le schéma global d'évolution était une décroissance du %N en post-partum

précoce (diminution de près de 20%N entre 21 et 35 JPP), suivi d'une stabilisation du %N à un niveau basal jusqu'à la mise à la reproduction. Cependant, l'étude des profils individuels a révélé l'existence de pics de réactivation de l'inflammation (intenses et fugaces) au delà de 45 JPP. Les cinétiques d'évolution des %N endocervicaux et endométriaux sont apparus tout à fait similaires au cours du temps. Dans l'étude des facteurs associés à l'inflammation, il a été impossible de conclure quant à un impact des stéroïdes sexuels ou du statut énergétique de l'animal sur le %N génitaux.

Enfin, nous nous sommes intéressés au diagnostic des inflammations utérines sur le terrain par les vétérinaires et les éleveurs français. Les procédures couramment utilisées étaient la palpation transrectale, l'examen vaginal et l'échographie utérine. Or, par comparaison avec l'examen cytologique, nous avons montré que le seul critère fiable dans le diagnostic des inflammations génitales était l'observation de pus (sécrétions mucopurulentes à purulentes) suite à l'examen du contenu vaginal (Se = 56%, Sp = 88%, VPP = 85%, VPN = 63%). Cette méthode ne permettait cependant pas le diagnostic des formes subcliniques d'inflammation génitale, qui représentaient plus de 40% des vaches déclarées saines.

En conclusion, ce travail propose le concept d'inflammation génitale, correspondant à une atteinte de l'utérus et/ou du col, plutôt que celui d'inflammation utérine seule.

Mots clés

Cytologie ; utérus ; col ; immunité ; neutrophiles ; reproduction ; diagnostic ; endométrite ; vache.

Abstract

A routine bacterial contamination of the uterus at delivery is the rule in cattle, a unique feature among domesticated mammals. Calving stimulates activation of genital immunity in the cow. While post-partum inflammation can be regarded as physiological, its persistence beyond 21 days in milk (DIM) becomes pathological. The aim of this study was to describe in Holstein cows, uterine and cervical post-partum inflammation in a physiological and pathological context, using endometrial cytology as a gold standard.

The first step was to validate cytological examination, as a reliable parameter. We found good inter- ($\rho_c = 0.91$, 95%CI, 0.89 - 0.94) and intra-operator ($\rho_c = 0.88$, 95%CI, 0.80 - 0.97) concurrence. However, samples taken at different sites of the uterus (cervix, uterine body, left and right horns) revealed the uneven distribution of inflammation in the female genital tract. The inflammatory status was not a reliable index of the bacterial colonization in the uterine lumen, as evidenced by conventional bacteriological techniques. Since neutrophils represented the predominant leukocyte subpopulation in genital specimens (median, 100%, interquartile range, 89 - 100%), the rate of neutrophils (% N; proportion of neutrophils among 200 cells counted) was used to characterize the inflammatory status of the cervix. Inflammation was then defined as pathological whenever the proportion of neutrophils in endometrial smears between 21 and 35 DIM exceeded $\geq 6\%$, since it was associated with a decreased pregnancy rate within 300 DIM (aHRs, 0.4; 95%CI, 0.2 - 0.7 ; $P < 0.01$). Furthermore, a proportion of neutrophils $\geq 1\%$, seven days or less prior to insemination, was associated with a decreased rate of success. Inflammation of the cervix was also associated with short (2%N threshold, seven days prior to insemination) and long term (5%N threshold between 21 and 35 DIM) reduction of reproductive performance. Since no endocervical inflammation was found in 31% of cows with endometrial inflammation, the cervix and uterus appeared as two separate compartments. The prevalence of pathological inflammation was high, ranging from 36 to 41% for the cervix and from 43 to 57% for the uterus, depending on the time of sampling. Finally, endocervical and endometrial inflammation appeared to have additive effects, since combined inflammations within 35 DIM reduced more than inflammation of a single compartment.

We also investigated the kinetics of post-partum genital inflammation. The overall pattern is a decrease of %N in early post-partum (almost 20%N reduction between 21 and 35 DIM), followed by stabilization of the %N at a basal level until the breeding period. However, the study of individual profiles revealed peaks of inflammation (intense and fleeting) beyond 45 DIM. The kinetics of endometrial and endocervical %N appeared quite similar at any time. In the study of

factors associated with inflammation, we failed to record a significant impact of sex steroids nor of energy supply to the cow, on the proportion of neutrophils in genital smears.

The results of our cytological examinations were confronted with those of routine diagnostic techniques for endometritis commonly used: transrectal palpation, vaginal examination and uterine ultrasonography. Compared to cytological examination, the only reliable diagnostic criterion for genital inflammation was the observation of pus (mucopurulent or purulent discharge) following vaginal examination (Se = 56%, Sp = 88%, PPV = 85%, NPV = 63%). However, this method did not allow the diagnosis of subclinical forms, which represented over 40% of healthy looking cows.

In conclusion, we suggest dropping the usual designation of uterine inflammation and to substitute the concept of genital inflammation, covering both uterine and/or cervical inflammation.

Keywords

Cytology; uterus; cervix; immunity; neutrophils; reproduction; diagnosis; endometritis; cows.

Table des matières

REMERCIEMENTS	2
RESUME	5
ABSTRACT.....	7
LISTE DES ABREVIATIONS	13
AVANT PROPOS.....	14
ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE	16
I. INFLAMMATION UTERINE PHYSIOLOGIQUE POST-PARTUM.....	17
A. <i>Contamination bactérienne de l'utérus post-partum</i>	17
1. Conditions favorables réunies	17
2. Bactéries impliquées	18
B. <i>Mobilisation des défenses de l'hôte</i>	19
1. Reconnaissance des pathogènes	19
2. Activation de la cascade de signalisation	20
3. Activation du système de défense inné.....	23
4. Activation du système de défense acquis	26
5. Activation du système du complément.....	27
II. PERSISTANCE D'UNE INFLAMMATION UTERINE	30
A. <i>Dysfonctionnement du système immunitaire</i>	30
1. Déficience du système immunitaire.....	30
2. Exacerbation du système immunitaire	32
B. <i>Conséquences de la persistance de l'inflammation génitale</i>	33
C. <i>Caractérisation du statut inflammatoire utérin</i>	35
1. Examens utérin.....	35
2. Examens vaginaux.....	39
3. Examens sanguin.....	41
D. <i>Axes principaux du travail expérimental</i>	44
MATERIELS ET METHODES.....	46
I. ANIMAUX	47
A. <i>Etudes in vivo</i>	47
1. Echantillon d'étude.....	47
2. Gestion de la reproduction.....	47
B. <i>Etudes ex vivo</i>	48

II.	CARACTERISATION DE L'INFLAMMATION GENITALE	48
A.	<i>Palpation transrectale</i>	48
B.	<i>Echographie transrectale</i>	49
C.	<i>Examen du contenu vaginal</i>	49
1.	Matériel	49
2.	Méthode	49
3.	Classification des sécrétions	50
D.	<i>Examen bactériologique</i>	51
1.	Matériel	51
2.	Méthode	51
3.	Culture et identification des souches bactériennes	51
E.	<i>Examen cytologique</i>	52
1.	Matériel	52
2.	Méthode	53
3.	Réalisation des frottis	54
4.	Coloration et lecture des frottis	54
III.	DETERMINATION DE LA PHASE DU CYCLE GESTRAL	55
A.	<i>Echographie ovarienne</i>	55
B.	<i>Dosage des stéroïdes sexuels</i>	56
IV.	ANALYSES STATISTIQUES	56
A.	<i>Epidémiologie descriptive</i>	56
B.	<i>Analyse de survie à partir de données longitudinales</i>	57
C.	<i>Analyse par une fonction polynôme</i>	59
	RESULTATS	61
I.	L'INFLAMMATION GENITALE EVALUEE PAR L'EXAMEN CYTOLOGIQUE	62
A.	<i>Description des populations cellulaires présentes sur les frottis génitaux</i>	64
1.	Protocole	65
2.	Résultats	65
3.	Discussion	68
B.	<i>Variabilité des résultats de lecture des frottis génitaux</i>	71
1.	Variabilité inter-opérateur	72
2.	Variabilité intra-opérateur	73
3.	Discussion	74
C.	<i>Variabilité liée au site de prélèvement</i>	76
1.	Etude <i>ex vivo</i>	77
2.	Etude <i>in vivo</i>	78
3.	Discussion	79

D.	<i>Correspondance entre les examens bactériologique et cytologique</i>	<i>81</i>
1.	Protocole.....	82
2.	Résultats	82
3.	Discussion.....	84
II.	IMPACT DE L'INFLAMMATION GENITALE SUR LA FERTILITE.....	86
A.	<i>Impact à long terme de l'inflammation génitale</i>	<i>88</i>
1.	Protocole.....	89
2.	Résultats	89
3.	Discussion.....	90
B.	<i>Impact à court terme de l'inflammation génitale.....</i>	<i>93</i>
1.	Protocole.....	94
2.	Résultats	95
3.	Discussion.....	97
III.	EVOLUTION DE L'INFLAMMATION GENITALE SUR LA FERTILITE	100
A.	<i>Au cours du post-partum.....</i>	<i>102</i>
1.	Protocole.....	103
2.	Résultats	104
3.	Discussion.....	107
B.	<i>Au cours du cycle œstral</i>	<i>111</i>
1.	Protocole.....	112
2.	Résultats	114
3.	Discussion.....	116
C.	<i>Facteurs favorisant l'inflammation génitale</i>	<i>119</i>
1.	Protocole.....	120
2.	Résultats	121
3.	Discussion.....	122
IV.	EXPRESSION CLINIQUE ET DIAGNOSTIC DES INFLAMMATIONS GENITALES	125
A.	<i>Valeurs diagnostiques des techniques</i>	<i>127</i>
1.	Valeurs diagnostiques des techniques macroscopiques	128
2.	Influence de la palpation transrectale.....	134
3.	Caractère pathologique des sécrétions vaginales.....	138
B.	<i>Diagnostic des inflammations génitales sur le terrain en France</i>	<i>142</i>
1.	Enquête auprès des vétérinaires français	143
2.	Enquête auprès des éleveurs français	147
3.	Discussion.....	149
	DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES	154

CONCLUSIONS	176
ANNEXES.....	179
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	187
PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS	203

Liste des abréviations

- ✓ %N : Taux de neutrophiles
- ✓ AMP : Peptide antimicrobien
- ✓ APP : Protéine de phase aiguë
- ✓ ASAT : Aspartate aminotransférase
- ✓ BoHV4 : Herpès virus bovin de type 4
- ✓ CPK : Créatinine phosphokinase
- ✓ E2 : Œstradiolémie
- ✓ EIQ : Ecart interquartile
- ✓ IA : Insémination artificielle
- ✓ IC95% : Intervalle de confiance à 95%
- ✓ Ig : Immunoglobuline
- ✓ IGF1 : Insulin growth factor 1
- ✓ IVIF : Intervalle vêlage–insémination fécondante
- ✓ JPP : Jours post-partum
- ✓ LPS : Lipopolysaccharide
- ✓ MGG : May-Grünwald-Giemsa
- ✓ NEC : Note d'état corporel
- ✓ OR : Odd ratio
- ✓ P4 : Progestéronémie
- ✓ PAMP : Pathogen-associated molecular pattern
- ✓ PGE : Prostaglandine E
- ✓ PGF : Prostaglandine F
- ✓ PL : Production laitière
- ✓ PMN : Polymorphonucléaire
- ✓ RIA : Radio-immuno-assay
- ✓ RR : Risque relatif
- ✓ TB : Taux butyreux
- ✓ TLR : Toll like receptor
- ✓ TP : Taux protéique

AVANT PROPOS

L'objectif global de la gestion de la reproduction en élevage bovin laitier est d'obtenir un intervalle de temps rentable entre deux vêlages, à adapter aux contraintes de conduite de chaque élevage. La santé de l'utérus est un des facteurs limitant en matière de reproduction bovine : les infections utérines post-partum (métrite, endométrite) ont un impact économique majeur sur cette filière, estimé à 1,4 billions d'euros par an en Europe et 650 millions de dollars aux Etats-Unis [1]. Plus de 500 essais ont été réalisés au cours des 40 dernières années [2], ce qui témoigne de l'importance de la prise en compte de ces affections dans la littérature scientifique. Cependant, la synthèse de cette riche bibliographie est rendue difficile par la grande hétérogénéité des significations données aux mots « métrite » et « endométrite ». Ce n'est qu'en 2006 que Sheldon [3] a proposé des définitions, afin d'obtenir un consensus international et une clarification de la terminologie. Le terme d'« endométrite subclinique » a ainsi été défini comme une inflammation superficielle de la muqueuse utérine au-delà de 21 jours post partum, malgré l'absence de signes extérieurs, étant à l'origine d'une détérioration des performances de reproduction. Après les travaux fondateurs de Kasimanickam *et al.* [4], l'évaluation de la santé utérine repose désormais sur l'examen cytologique de l'endomètre.

Néanmoins, dans la grande majorité des études, cette évaluation cytologique a été focalisée sur l'inflammation vers 21 - 35 jours post-partum. L'évolution naturelle de l'inflammation entre le vêlage et la mise à la reproduction est inconnue, non plus que l'influence du cycle œstral. L'impact de l'inflammation peu avant l'insémination reste aussi inexploré. La littérature fournit également une variété de critères de lecture pour différencier une inflammation pathologique (*i.e.*, ayant un impact sur les performances de la reproduction) d'une inflammation physiologique (*i.e.*, ne perturbant pas les différentes étapes de la reproduction, et donc « tolérable » par la vache). Enfin, toute l'attention se porte sur la santé de l'utérus, en négligeant le compartiment cervical. Notre travail expérimental s'est donc attaché à décrire l'inflammation utérine et cervicale dans les axes inexplorés cités ci-dessus. Nos résultats seront décrits après la présentation d'une synthèse des phénomènes immunitaires et inflammatoires mis en œuvre dans l'élimination de la contamination bactérienne au moment du vêlage.

ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

**L'utérus post-partum :
d'une inflammation physiologique transitoire
à une inflammation pathologique persistante**

I. Inflammation utérine physiologique post-partum

Dans toutes les espèces, la lumière utérine est considérée comme un milieu stérile jusqu'à la mise bas [5]. Si une contamination bactérienne intervient, elle engendre une résorption du fœtus ou un avortement. Mais la vache se distingue des autres femelles mammifères par une contamination microbienne presque systématique de l'utérus au moment ou peu après la parturition. Le retour de l'utérus à son état prégravidique après le part –ou phénomène d'involution utérine- essentiel pour une nouvelle gestation, est donc chez la vache un processus physiologiquement septique [6]. La réponse immunitaire de l'animal est alors très rapidement engagée. Elle repose sur la reconnaissance des contaminants, l'activation de la réponse innée et de l'immunité acquise. La mobilisation des défenses de l'hôte aboutit généralement à l'élimination progressive de la colonisation initiale. Si la contamination bactérienne prend le dessus sur les capacités de défense de l'hôte, la contamination physiologique se transforme en une infection pathologique.

A. Contamination bactérienne de l'utérus post-partum

1. Conditions favorables réunies

Au moment du vêlage, alors que le col se dilate pour permettre le passage du veau, les barrières anatomiques naturelles composées de la vulve, du vagin et du col sont abolies [6-8], favorisant la colonisation des voies génitales par des bactéries en provenance de l'environnement, de la région périnéale, de la peau et des fèces de l'animal.

La colonisation nécessite l'adhérence des bactéries à la muqueuse utérine, ainsi que leur pénétration dans l'épithélium [2]. Or, l'endomètre (figure 1 ; [7,9,10]) est le siège de remaniements histologiques importants après la parturition [11]. L'effacement complet de la lumière des vaisseaux sanguins à la base des caroncules conduit à la nécrose de l'endomètre, laissant place à une surface vive, dont les vaisseaux sanguins s'ouvrent directement dans la lumière utérine. De plus, peu après la parturition, la lumière utérine se remplit de lochies, constituées par une partie des liquides de gestation, du sang (en provenance des hémorragies capillaires des sites de nécrose des caroncules) et des débris tissulaires (desquamation de l'endomètre). Dans l'utérus post-

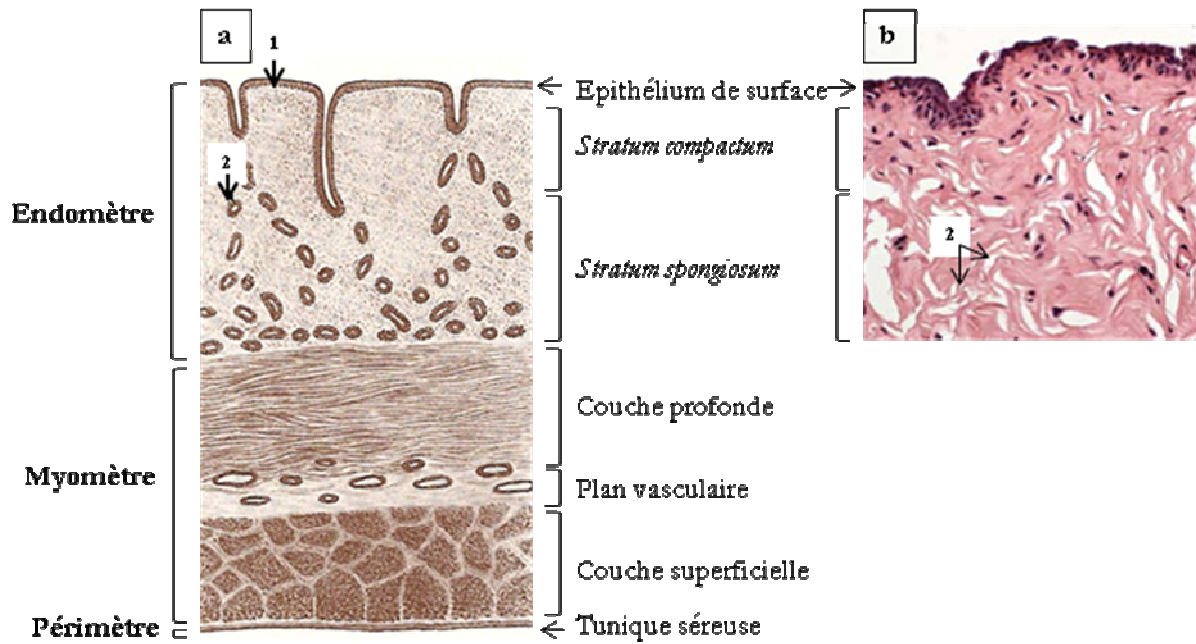
Figure 1 : Histologie de l'utérus non gravide de la vache.

a. Aspect schématisé (d'après Pavaux, [9])

b. Coupe histologique d'endomètre bovin après biopsie utérine (5 à 8 µm d'épaisseur) colorée à l'hématoxyline – éosine (d'après Chapwanya *et al.*, [10])

1. Membrane basale

2. Glandes utérines



partum, les remaniements histologiques de la muqueuse favorisent donc la pénétration des contaminants et la multiplication bactérienne, alors même que les lochies créent un milieu de culture très favorable à la croissance des germes anaérobies [12,13]. La prolifération des bactéries et leur pénétration dans la muqueuse peuvent être encore plus importantes après un vêlage dystocique (colonisation bactérienne accrue, endommagement de la muqueuse) ou lors de rétention placentaire (persistance de débris tissulaires dans les voies génitales) [1,6,13].

Après la mise-bas, en raison des conditions favorables décrites, l'utérus bovin est envahi par une variété de bactéries. On estime en moyenne qu'au cours des vêlages normaux, 90% des utérus sont contaminés spontanément dans les 15 premiers JPP [14,15].

2. Bactéries impliquées

La flore bactérienne intra-utérine post-partum se compose de germes saprophytes et pathogènes, Gram-positifs et -négatifs en quantités équivalentes [13], aéro- et anaérobies [14-16]. La composition de la flore est donc variée et propre à chaque animal, mais elle est dominée par *Escherichia coli* au moins dans les premiers jours suivant la parturition [12]. Les autres bactéries les plus fréquemment identifiées sont *Arcanobacterium pyogenes* et les *Enterobacteriaceae*, suivies de quelques bactéries anaérobies, telles que *Fusobacterium sp.* et *Bacteroides sp.* [12].

Dans la lumière utérine, ces bactéries sont généralement associées [7]. L'isolement d'*A. pyogenes* est généralement combiné avec celui d'*Escherichia coli* ou de bactéries anaérobies, telles que *F. necrophorum* ou *Bacteroides sp.* [12]. Il a été montré que les germes aéro- et anaérobies agissent de façon synergique pour favoriser la croissance et/ou la pathogénicité d'autres bactéries [6]. *A. pyogenes* produit un facteur de croissance pour *F. necrophorum* et inversement, la croissance de germes anaérobies peut promouvoir la colonisation de la muqueuse par *A. pyogenes*.

La plupart des bactéries impliquées dans la colonisation de la muqueuse utérine sont des hôtes non pathogènes du tractus digestif bovin, mais qui peuvent cependant développer des propriétés invasives [13]. *F. necrophorum* produit ainsi une grande variété de produits extracellulaires, tels que leucotoxines, hémolysines, hémagglutinines, facteurs plaquettaires d'adhésion et d'aggrégation, protéases et DNases, probablement responsables de sa virulence [12]. *Bacteroides sp.* libère des substances empêchant la phagocytose bactérienne. La pathogénicité d'*E. coli* repose sur son adhésion aux cellules épithéliales, la motilité assurée par le flagelle et la libération de toxines telles que la shigatoxine et le lipopolysaccharide (LPS) [17]. Parallèlement au

soutien de la croissance bactérienne, les endotoxines bactériennes (LPS) stimulent la réplication virale d'un contaminant de haut tropisme pour les cellules endométriales, l'herpesvirus bovin de type 4 (BoHV-4). Quant à *A. pyogenes*, qui cause des lésions sévères et persistantes de l'endomètre [7], sa pathogénicité repose sur la sécrétion de facteurs de virulence plutôt que sur une interaction directe avec les cellules de l'hôte. Les souches d' *A. pyogenes* isolées de l'utérus post-partum expriment toutes le gène *plo* qui code pour une cytotoxine appelée pyolysine, responsable de leur virulence. Les molécules de cytotoxine s'associent dans la membrane cellulaire pour former un pore, conduisant à la mort des cellules épithéliales de l'endomètre *in vitro* [1].

B. Mobilisation des défenses de l'hôte

Cette intrusion bactérienne déclenche une réaction immunitaire. La première ligne de défense de l'endomètre contre la colonisation bactérienne est le système de défense inné. Celui-ci repose sur les récepteurs Toll-like (TLRs), les peptides antimicrobiens et les protéines de phase aiguë [18]. Des cytokines activent la réponse immunitaire, en favorisant principalement l'afflux de neutrophiles vers la lumière utérine. La réponse immunitaire innée est aussi soutenue par la mobilisation du système immunitaire acquis et l'activation de la voie du complément.

1. Reconnaissance des pathogènes

Les cellules épithéliales de l'endomètre constituent une barrière protectrice efficace contre la pénétration des bactéries dans les couches profondes de la muqueuse utérine après la parturition. Chez la femme, les épithéliums du vagin, du col, de l'utérus et des oviductes protègent l'hôte des potentiels pathogènes bactériens et viraux [19]. La barrière physique que constitue l'endomètre n'est pas uniquement dépendante de l'intégrité des cellules épithéliales, mais aussi d'un maintien des jonctions serrées [19].

Au-delà de leur fonction de barrière physique, les cellules endométriales possèdent un rôle immunitaire primordial dans la reconnaissance et la réponse aux contaminants chez les humains, les rongeurs et les bovins. La détection des bactéries fait intervenir des récepteurs de l'immunité innée, groupe clé des TLRs, qui reconnaissent chez les pathogènes des séquences conservées connues sous le nom de PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) [1,20]. Les ligands PAMPs sont présents dans une grande variété de pathogènes tels que les bactéries, les champignons et les virus.

1.1. Expression des TLRs par l'endomètre

La structure des TLRs est hautement conservée d'une espèce à une autre [19]. Dix membres de la famille des TLRs sont codés dans le génome des mammifères. L'endomètre bovin des vaches non gestantes exprime les différents membres de cette famille, du TLR1 au TLR10 [21]. Avant et après le vêlage, les TLR2, TLR3, TLR4 et TLR9 sont exprimés dans l'endomètre caronculaire et intercaronculaire. Chez la vache, comme chez la souris, une inflammation utérine conduit à l'augmentation de l'expression du récepteur TLR4 par les cellules épithéliales [19,22].

1.2. Fonctions des TLRs

Les TLRs interviennent dans la reconnaissance des pathogènes. Les études dans l'espèce bovine ont, en majorité, examiné l'effet d'*E. coli* ou de son ligand LPS sur la fonction de l'endomètre et se sont donc principalement intéressées au récepteur TLR4. Or, le système TLR reconnaît aussi des molécules associées à d'autres pathogènes, telles que la pyolysine d'*A. pyogenes*, le virus BoHV-4, l'ADN et les lipides bactériens : les récepteurs TLR1, TLR2 et TLR6 reconnaissent les lipides bactériens (acide lipotéichoïque) ; les TLR3, TLR7, TLR8 et TLR9 reconnaissent les acides nucléiques, principalement ceux des virus ; le TLR4 se lie au lipopolysaccharide des bactéries Gram-négatifs tel que *E. coli*, avec la formation d'un complexe entre le LPS, TLR4 et deux molécules accessoires CD14 et MD2 [8,17] ; le TLR5 se lie à la flagelline et le TLR9 reconnaît l'ADN bactérien. Le ligand spécifique du TLR10 n'est pas encore connu [1,19].

La multitude de récepteurs de la famille des TLRs conduit à une variété de combinaisons dans la cascade de signalisation [19].

2. Activation de la cascade de signalisation

L'activation du système TLR a pour conséquence la production de médiateurs pro-inflammatoires guidant la réponse immunitaire innée.

2.1. Production de cytokines par les cellules épithéliales

En réponse à la contamination bactérienne identifiée par les TLRs, les cellules épithéliales de l'endomètre produisent un grand nombre de cytokines, notamment les interleukines (IL ; de IL1 à IL10) et les molécules de la famille du TNF (Tumor Necrosis Factor) [19]. Les cytokines

sont impliquées dans la communication intercellulaire et agissent à distance pour réguler l'activité et la fonction d'autres cellules. Elles modulent notamment la réponse immunitaire. L'activation des récepteurs TLRs favorise ainsi la synthèse du TNF α et de cytokines pro-inflammatoires (principalement IL1 et IL6). L'activation des récepteurs TLRs provoque également la synthèse d'oxyde nitrique.

Les fonctions des interleukines sont multiples. L'IL1 favorise l'augmentation de calcium plasmatique qui stimule la contraction du myomètre et l'expulsion des débris tissulaires de la lumière utérine. Elle stimule également la synthèse de prostaglandines qui contribuent à la vidange de l'utérus post-partum [23]. Mais l'action des interleukines porte essentiellement sur le recrutement des lymphocytes sanguins et la sécrétion de protéines de phase aiguë (APPs) et de peptides antimicrobiens (AMPs) [1,19]. L'IL6 participe à la maturation des band cells (*i.e.*, formes immatures de neutrophiles), à l'activation des neutrophiles et à la différenciation des monocytes en macrophages matures. Elle joue donc un rôle primordial dans l'activation de la fonction phagocytaire des cellules immunitaires [24,25]. Enfin, la production de TNF α et d'oxyde nitrique stimule la synthèse de protéines de phase aiguë par le foie [8].

2.2. Sécrétion de prostaglandines par les cellules épithéliales

L'interaction des produits bactériens avec l'endomètre, par l'intermédiaire de la famille des TLRs, déclenche la production de plusieurs classes de prostaglandines par la muqueuse [12,26]. On note, en présence du LPS d'*E. coli*, de la pyolysine d'*A. pyogenes*, du BoHV-4, d'ADN ou de lipides bactériens, une augmentation de la transcription de l'endopéroxyde-prostaglandine synthase 2 (PTGS2 ; anciennement connue sous le nom de cyclo-oxygénase 2, COX-2) et de la sécrétion de prostaglandines E (PGE) et F (PGF) [20,21,27]. En retour, les récepteurs TLRs restent fonctionnels tant que les cellules épithéliales sécrètent des prostaglandines E en présence de bactéries [1].

Consécutivement à l'action du LPS, la synthèse endométriale de prostanoides est davantage orientée vers la production de PGE que vers celle de PGF [20,27]. Ce phénomène semble apparaître précocement dans la voie de synthèse des prostanoides, qui débute par la libération d'acide arachidonique de la membrane cellulaire de l'endomètre bovin, par les enzymes phospholipases A2 de groupe IV et VI (PLA2G4 et PLA2G6). L'acide arachidonique est ensuite converti par la lipoxigénase en leucotriène B4 et par la cycloxygénase en PGE ou PGF (grâce aux enzymes de synthèse PGES et PGFS, respectivement) [12]. Le traitement de cellules épithéliales avec du LPS ne modifie pas la concentration en enzymes PGES, PGFS, ni PLA2G4, mais, à

l'inverse, augmente la concentration cellulaire de la protéine PLA2G6. Le LPS agit donc très en amont de la synthèse des prostaglandines [27].

La reconnaissance des pathogènes conduit donc à une augmentation de la production de prostaglandines à la fois de la famille F et de la famille E. Même s'il était classiquement attribué aux PGE un rôle anti-inflammatoire et aux PGF une fonction pro-inflammatoire, des essais utilisant des souris knock-out pour les récepteurs aux prostaglandines ont montré que chacun de ces prostanoides exerçait les deux types de fonction [28]. Le PGE, avec d'autres prostanoides, peut moduler la réponse immunitaire et coordonner des voies pro- et anti-inflammatoires [28]. Le PGE d'origine endométriale agit en partie de façon paracrine via deux récepteurs exprimés sur l'endomètre bovin (PTGER2 et PTGER4) [27].

2.3. Régulation de la réponse immunitaire

La reconnaissance de bactéries par la famille des TLRs induit la production de cytokines et la sécrétion de prostanoides par les cellules épithéliales. Mais la réponse immunitaire endométriale induite par les produits bactériens fait l'objet de régulations locales ou générales.

Les stéroïdes sexuels régulent la sécrétion de prostanoides par les cellules épithéliales et stromales en réponse au LPS. L'œstradiol et, principalement, la progestérone inhibent la production de PGE et PGF en réponse à l'infection bactérienne [20]. En ce qui concerne les TLRs, bien qu'un gradient de progestérone s'établisse dans l'utérus, avec des concentrations plus élevées à l'extrémité de la corne ipsilatérale au corps jaune et des valeurs moins élevées dans la corne controlatérale, Davies *et al.* [21] n'ont pas mis en évidence de variation dans l'expression des TLRs entre les différents sites de l'utérus. Par ailleurs, parmi les régulations générales, l'axe somatotrope régule l'immunité utérine via l'Insulin-Like Growth Factor 1 (IGF1), qui possède des propriétés immunomodulatrices chez les mammifères [1].

A l'échelle locale, on constate que plusieurs protéines de l'endomètre bovin influencent directement la réponse innée ou affectent la voie IGF1 dans les cellules endométriales. Les serpines utérines appartiennent à la famille des inhibiteurs des sérines protéinases qui, au moins chez les ovins, inhibent la prolifération lymphocytaire. La galectine 3, exprimée dans l'utérus et le col chez la vache, module l'adhésion des lymphocytes T aux cellules endothéliales et celle entre les lymphocytes T et les cellules dendritiques ou macrophages [1]. Enfin, le contrôle de la réponse inflammatoire est dépendant de cytokines anti-inflammatoires (IL10) qui inhibent l'activité des cellules Natural Killers et des macrophages [29].

3. Activation du système de défense inné

Les cellules endométriales jouent donc un rôle immunitaire en reconnaissant les contaminants, mais aussi en stimulant et en régulant les différents médiateurs de la réponse inflammatoire de l'hôte. L'activation de cette cascade de signalisation est à l'origine de la synthèse de médiateurs pro-inflammatoires, déclenchant la réponse immunitaire innée et principalement la phagocytose.

3.1. Activation des lymphocytes

L'afflux des lymphocytes dans la lumière utérine et leur activité phagocytaire représentent l'essentiel de la mobilisation et de l'activation des cellules immunitaires dans l'utérus bovin.

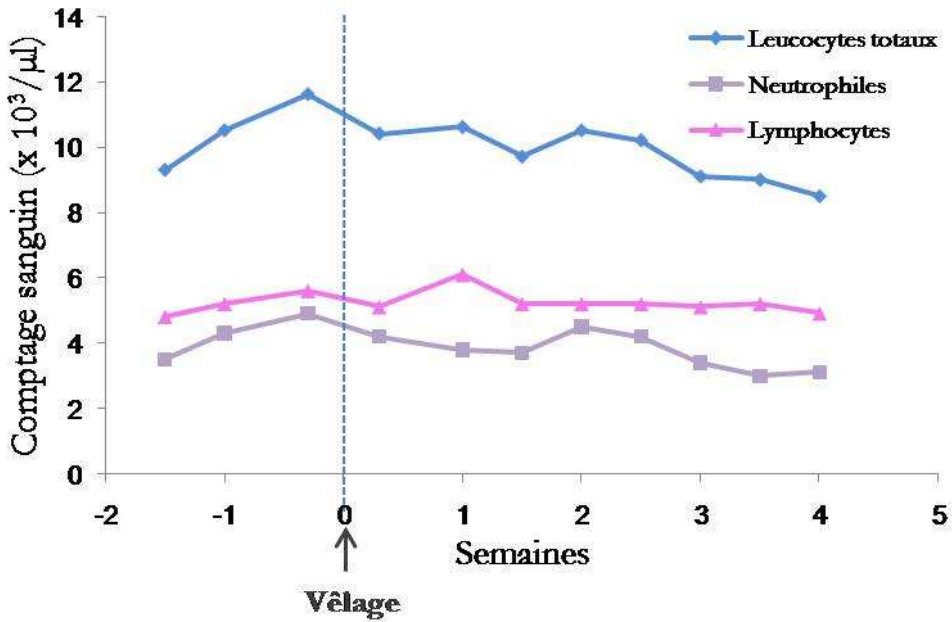
3.1.1. Recrutement des lymphocytes

Au moment du vêlage et en post-partum immédiat, les lymphocytes sont recrutés à partir de la moelle osseuse et de la circulation sanguine et dirigés vers le site de colonisation bactérienne qu'est l'utérus. L'essentiel de la population phagocytaire qui afflue alors vers la lumière utérine est constitué par les granulocytes neutrophiles [30].

L'afflux de neutrophiles et leur diapédèse vers la lumière utérine sont stimulés par les cytokines libérées par l'endomètre sous l'effet de la contamination bactérienne. L'augmentation de la concentration sérique en IL1 favorise la vasodilatation utérine [23]. La dégranulation par les mastocytes d'histamine, de sérotonine, d'héparine et de phosphatases acides et alcalines augmente la perméabilité vasculaire et favorise le passage des neutrophiles vers l'espace extra-vasculaire [7]. Enfin, via l'action d'IL8, ces neutrophiles sont recrutés sur le site de l'infection par création d'un gradient chimiotactique : les cellules phagocytaires, portant les récepteurs à cette cytokine, affluent alors dans la lumière utérine [23]. Ces facteurs chimiotactiques, qui dirigent les neutrophiles vers les pathogènes, comprennent les interleukines, le système du complément, les métabolites de l'acide arachidonique et les TNF [31]. Des récepteurs pour ces ligands sont présents à la surface des cellules phagocytaires. Suite à la liaison d'un facteur chimiotactique à son récepteur, la formation de microtubules et de microfilaments dans la cellule phagocytaire va autoriser sa migration [24].

D'une façon générale, le moment du vêlage est associé à une augmentation du comptage cytologique total et différentiel des leucocytes sanguins [30]. Les concentrations des différentes sous-populations leucocytaires (principalement neutrophiles et lymphocytes) augmentent au

Figure 2 : Evolution du comptage total et différentiel des leucocytes sanguins en fonction des semaines péri-partum (n = 35 ; d'après Cai *et al.*, [32]).



cours de la semaine précédant le vêlage, puis diminuent une semaine post-partum, avant d'accroître à nouveau vers la troisième semaine post-partum (figure 2 ; [30,32-34]). Cette leucocytose pré-partum est liée à la hausse de la concentration en cortisol avant le vêlage, alors que la décroissance au cours de la première semaine post-partum est la conséquence du processus de migration massive des cellules du compartiment sanguin vers la lumière utérine et la glande mammaire [34].

3.1.2. Activité de phagocytose

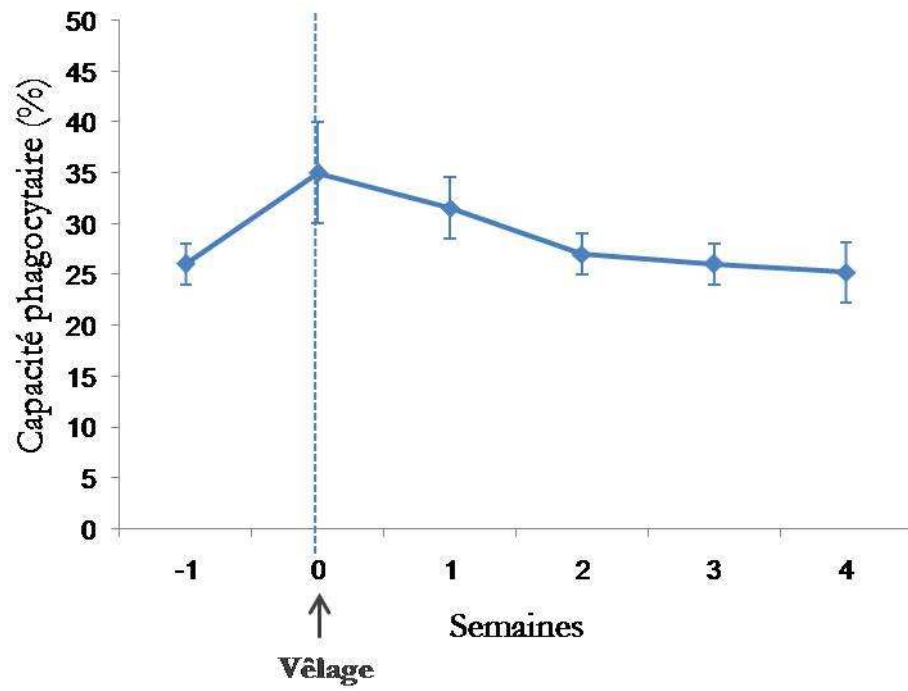
Le principal mécanisme de défense non spécifique exercé par les granulocytes neutrophiles après leur migration vers l'utérus est la phagocytose. Non seulement les cellules phagocytaires ingèrent et détruisent les agents pathogènes, mais elles participent à l'élimination du foyer inflammatoire par ingestion et digestion des débris tissulaires, des complexes antigène-anticorps et des toxines bactériennes [7].

La phagocytose se déroule en trois étapes : l'adhérence, l'ingestion et la digestion. L'adhérence du neutrophile requiert l'opsonisation préalable du micro-organisme. Dans les conditions physiologiques, les neutrophiles et les bactéries sont tous deux chargés négativement à leur surface. L'opsonine est une protéine chargée positivement (généralement un anticorps ou un fragment du complément) qui se fixe à la surface bactérienne (opsonisation) : la charge négative de la surface bactérienne se trouve ainsi neutralisée, permettant de supprimer la répulsion entre la bactérie et le neutrophile de même charge [31]. L'opsonisation active également le système du complément (se reporter au I.B.5.) qui renforce en retour la phagocytose.

L'ingestion a lieu lorsque la cellule lie, à sa surface, la bactérie et internalise, par émission de pseudopodes, la partie de la membrane cellulaire à laquelle est attachée la particule. Elle emprisonne à l'intérieur de son cytoplasme la vacuole phagocyttaire, appelée phagosome [24,31].

Enfin, la digestion du micro-organisme a lieu grâce à une dégranulation intracellulaire d'enzymes lysosomales (lysozyme et lactoferrine). Le lysozyme lyse les bactéries par son action sur l'acide muramique, composant essentiel des glycoprotéines membranaires des bactéries. La lactoferrine exerce son activité bactéricide en captant le fer libre du milieu (élément indispensable à la multiplication des bactéries) ou par action directe sur la paroi bactérienne (après leur digestion partielle par le lysozyme) [7]. L'action des enzymes lysosomales avec le phagosome aboutit à la formation et la libération de différents ions (peroxydes hydrogénés, ions hypochlorites) à fort pouvoir protéolytique et bactéricide, qui mettent en jeu le métabolisme oxydatif du neutrophile [24,31]. Ce dernier est compromis par des facteurs solubles présents dans

Figure 3 : Evolution de la capacité phagocytaire en fonction des semaines péri-partum (n = 11 ; d'après Kim *et al.*, [30]).



les sécrétions lochiales [35], ce qui explique la diminution de la capacité phagocytaire au cours de la première semaine post-partum (figure 3 ; [30,31,34]).

L'activité de phagocytose utérine peut être attribuée à 80% aux granulocytes neutrophiles et à 20% aux macrophages. Les neutrophiles jouent également un rôle capital dans le déclenchement ultérieur de l'immunité spécifique [7].

3.2. Activation des peptides antimicrobiens

La reconnaissance des PAMPs des bactéries par les TLRs conduit à une augmentation de l'expression des peptides antimicrobiens par l'endomètre. Ces molécules sont particulièrement impliquées dans l'immunité muqueuse. Parmi les AMPs, les cellules endométriales bovines expriment les gènes codant pour le Lingual Antimicrobial Peptide (*LAP*), le Tracheal Antimicrobial Peptide (*TAP*) et les Bovine Neutrophils β -Defensins (*BNBD4* et *DEFB5*) [10,21,36], alors que les cellules stromales expriment principalement le *LAP* et le *TAP* [21]. Les peptides antimicrobiens participent à la défense de l'utérus contre les contaminants [10,21,36]. Leurs modes d'action sont variés et incluent la désorganisation des membranes, la perturbation du métabolisme de la bactérie et une action dirigée contre ses composants cytoplasmiques. En complément de leur pouvoir directement bactéricide, les peptides antimicrobiens interviennent dans la régulation de la réponse immunitaire.

3.3. Activation des protéines de phase aiguë

Sous la stimulation des cytokines pro-inflammatoires, le foie sécrète des protéines de phase aiguë, qui sont ensuite retrouvées dans le tractus génital. Néanmoins, l'endomètre bovin n'exprime pas ces glycoprotéines [21], le foie étant le seul organe sécréteur sous la stimulation des cytokines pro-inflammatoires [37,38]. L'intrusion de bactéries dans la lumière utérine est donc indirectement à l'origine d'une réponse de phase aiguë : les concentrations plasmatiques en APPs, dont l'haptoglobine et la sérum amyloïde A, sont nettement augmentées lors de la contamination bactérienne de la lumière utérine post-partum [37,39].

L'haptoglobine est l'une des protéines de phase aiguë les plus réactives chez les bovins. Elle protège l'hôte de l'activité oxydative de l'hémoglobine [40]. Elle se lie à l'hémoglobine, inhibant la prolifération bactérienne par diminution de la disponibilité en fer [40]. Certaines APPs, comme la céruloplasmine, la sérum amyloïde A et l'haptoglobine, agissent en détruisant ou en freinant la croissance du pathogène.

4. Activation du système de défense acquis

Le tractus génital femelle est, comme les muqueuses respiratoires et intestinales, exposé à des stimulations antigéniques très fréquentes, ce qui entraîne une réponse immunitaire locale. L'immunité innée, première à être activée, est ensuite complétée par la mise en jeu de l'immunité acquise, humorale et cellulaire.

4.1. Activation de l'immunité humorale

L'immunité humorale est assurée par des molécules circulantes spécifiques des antigènes, les immunoglobulines (Ig), produites localement par les lymphocytes B. Les immunoglobulines A, G et M ont été identifiées dans les sécrétions génitales de la vache [7]. Selon une étude expérimentale d'inoculation intra-utérine d'un organisme pathogène (*Campylobacter fetus*), les immunoglobulines apparaissent dans l'ordre IgM, IgA et IgG dans les sécrétions cervicales et vaginales des bovins. Par ailleurs, leurs proportions varient entre les différents compartiments génitaux : les IgG prédominent dans l'utérus alors que les IgA sont prépondérantes dans la partie postérieure du tractus génital femelle [41]. La production d'IgA dans le col et le vagin semble essentiellement locale, alors que le sérum serait la source principale des IgG. Ces dernières proviennent en réalité de deux sites : une fraction est synthétisée localement dans l'endomètre bovin (IgG1) alors qu'une autre partie provient de la transsudation du sérum (IgG2). Les IgM, en raison de leur taille (1 900 000 unités de masse atomique [uma], contre environ 150 000 uma pour les IgG et IgA), semblent être limitées à l'espace intra-vasculaire. Cependant, des IgM ont été détectées en très faible concentration dans les sécrétions cervico-vaginales de la vache [7].

Ces anticorps spécifiques, qui agissent directement à la surface de la muqueuse utérine, possèdent un rôle important dans la neutralisation de la contamination bactérienne. Les immunoglobulines agissent principalement en lysant les bactéries, en participant à l'opsonisation et à la stimulation de la phagocytose. La prédominance des anticorps IgG à la surface des plasmocytes utérins et dans les sécrétions génitales suggère que cette classe d'immunoglobuline est importante pour la défense du tractus génital de la vache [31]. Les IgG fixent le complément et l'activent par la voie biochimique classique (se reporter au I.B.5.). Les IgA inhibent l'adhérence des bactéries aux cellules épithéliales et semblent jouer un rôle important dans la neutralisation des toxines et des virus. Enfin, les IgM sont présentes précocement au cours de la réponse aux

antigènes. Ce sont les immunoglobulines les plus efficaces pour l'agglutination et l'activation du système du complément [7,41].

4.2. Activation de l'immunité cellulaire

Outre la composante humorale, la réaction utérine face à la contamination bactérienne fait également intervenir la composante cellulaire [31]. L'endomètre est largement drainé par un réseau lymphatique, on y trouve infiltrés des plasmocytes, des lymphocytes et des macrophages présentateurs d'antigène [7]. Les populations cellulaires, présentant le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II, sont à peu près deux fois plus nombreuses dans la couche superficielle du stroma (située sous la membrane basale, appelée *stratum compactum*) que dans la couche profonde ou *stratum spongiosum* et prédominent autour des conduits des glandes utérines (figure 1) [7]. Les lymphocytes T CD8+ sont observés principalement dans l'épithélium glandulaire et luminal mais également dans la couche superficielle du *stratum compactum* de l'utérus. En revanche, aucun macrophage n'a été observé dans l'épithélium endométrial. Enfin, les CD4+ se trouvent majoritairement dans le *stratum spongiosum* [42].

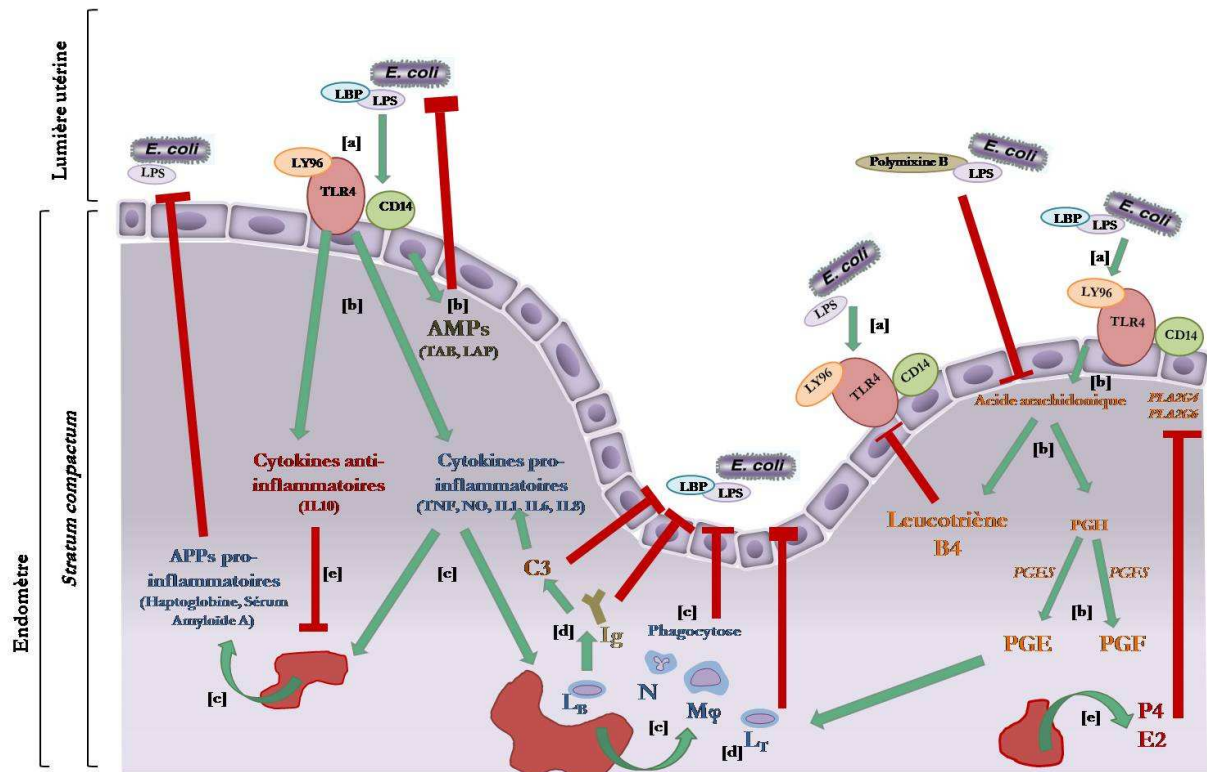
La population de lymphocytes endométriaux varie durant les différents stades de la gestation. En début et en milieu de gestation, ils sont en nombre réduit, évitant ainsi un rejet immunologique du fœtus. Puis leur concentration augmente en fin de gestation dans les zones intercaronculeuses, indiquant une fonction de reconnaissance et de protection contre les antigènes qui pénétreraient dans l'utérus [23]. De nombreux lymphocytes CD4+ et CD8+ sont infiltrés dans l'endomètre juste avant le part. L'immunité cellulaire utérine repose sur le pouvoir cytotoxique des lymphocytes T.

5. Activation du système du complément

Le système du complément est un groupe complexe de protéines solubles qui module la réponse inflammatoire. La présence des protéines du complément (au nombre de 35) dans les sécrétions utérines est peu documentée. Cependant, ces protéines étant d'origine sérique, les hémorragies physiologiques de l'endomètre caronculeuse au moment du vêlage sont susceptibles de les amener dans la lumière utérine. De plus, la libération de substances vasoactives par les mastocytes, en augmentant la perméabilité des vaisseaux de petit diamètre, favorise la transsudation du sérum dans le tissu endométrial superficiel et la lumière utérine [23].

Figure 4 : Représentation schématique de la cascade de signalisation et de la réponse immunitaire locale face à la contamination bactérienne de l'endomètre bovin (d'après Sheldon *et al.* [18]).

AMP : peptide anti-microbien ; APPs : protéines de phase aiguë ; C3 : facteur 3 du système du complément ; E2 : œstradiol ; *E. coli* : *Escherichia coli* ; Ig : immunoglobuline ; L_B : lymphocyte B ; L_T : lymphocyte T ; LPS : lipopolysaccharide ; LBP : LPS binding protein ; M ϕ : macrophage ; N : neutrophile ; P4 : progestérone ; PG : prostaglandine ; PLA2 : phospholipase A2 ; TLR : toll-like receptor



Analyse bibliographique

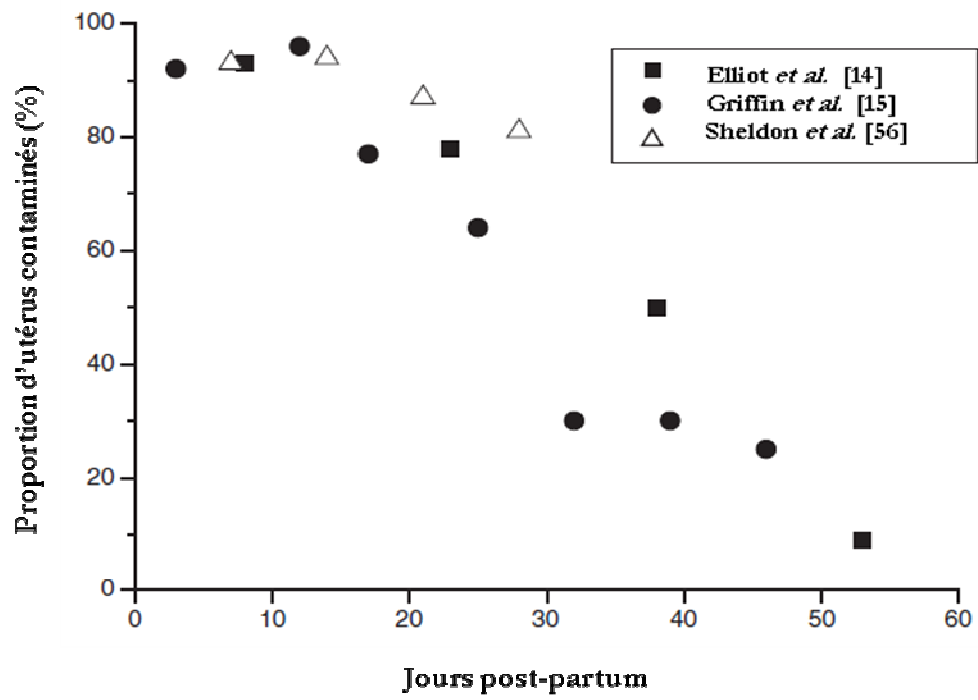
Inflammation utérine physiologique post-partum

Le complément est activé soit par la formation de complexes antigène–anticorps (voie classique), soit par les polysaccharides (zymozan, inuline) ou les LPS de la surface bactérienne (voie alternative). L'activation de ces deux voies de signalisation conduit à la formation d'un complexe d'attaque membranaire et à la lyse de la cellule cible. Les cellules endométriales endommagées de l'hôte sont protégées contre une lyse par le système du complément grâce à des protéines membranaires régulatrices du complément (CRPs), dont l'expression est augmentée en réponse au LPS bactérien [43].

Pour résumer, un modèle schématique (figure 4) représente la réponse immunitaire de l'hôte face à la contamination bactérienne de la lumière utérine. [a] Le système de défense inné est alerté de la présence de pathogènes par les récepteurs cellulaires endométriaux TLRs, qui détectent les bactéries ou leurs ligands (LPS). [b] En réponse, l'endomètre bovin sécrète des cytokines, augmente l'expression des peptides antimicrobiens et favorise la synthèse de prostaglandines. [c] Les cytokines pro-inflammatoires gouvernent la réponse innée. Elles attirent les neutrophiles et les macrophages de la circulation périphérique vers l'endomètre et favorisent la synthèse de protéines de phase aiguë par le foie. [d] Alors que la réponse immunitaire innée contribue à l'élimination des bactéries par les cellules phagocytaires, l'immunité cellulaire repose sur le pouvoir cytotoxique des lymphocytes T et la production locale d'anticorps (Ig) par les lymphocytes B. Ces derniers stimulent la phagocytose, activent le système du complément et lysent les bactéries. [e] La réponse immunitaire est régulée par divers médiateurs tels que des cytokines anti-inflammatoires et les stéroïdes sexuels. Les voies de signalisation sont donc variées, complexes et interreliées dans la réponse immunitaire face à l'intrusion d'un micro-organisme dans la lumière utérine.

En conclusion, l'utérus de la majorité des bovins est colonisé par une large variété de bactéries au moment de la parturition. Jusqu'à la fin de la période d'involution, il se produit un état d'équilibre entre la contamination bactérienne et les mécanismes de défense de l'animal, qui correspond en réalité à un système dynamique impliquant des vagues de croissance et d'inhibition de la multiplication bactérienne [15]. A la fin du processus d'involution utérine, vers 40 – 50 JPP, le système immunitaire aboutit finalement à l'élimination des bactéries de la lumière utérine. L'utérus redevient le plus souvent stérile, fournissant un environnement approprié pour mener à bien une nouvelle gestation. Ainsi, la prévalence d'utérus colonisés par des bactéries décroît au

Figure 5 : Proportion d'utérus bovins contaminés pendant la période post-partum (d'après Sheldon [44]).



Analyse bibliographique

Inflammation utérine physiologique post-partum

cours du post-partum : de 90% d'utérus contaminés au cours des 15 premiers jours post-partum, ils ne sont plus que 78% entre 16 et 30 jours, 50% entre 30 et 45 jours et, enfin, seulement 9% entre 46 et 60 JPP [14]. L'élimination progressive de la contamination bactérienne est une caractéristique constante des études bactériologiques qui ont examiné des utérus bovins après le vêlage (figure 5 ; [44]). La contamination bactérienne post-partum et la mobilisation de la réponse immunitaire sont donc chez les bovins physiologiques et transitoires.

II. Persistance d'une inflammation utérine

Un déséquilibre entre la contamination bactérienne initiale (nombre ou espèces bactériennes) et les mécanismes de défense de l'animal peuvent conduire à la persistance d'une inflammation superficielle de l'endomètre au-delà de 21 JPP, accompagnée (*i.e.*, endométrite clinique) ou non (*i.e.*, endométrite subclinique) de signes cliniques [18]. L'impact de l'endométrite est critique pour l'élevage laitier, cette affection détériorant fertilité et fécondité [45-47].

A. Dysfonctionnement du système immunitaire

Une déficience de la fonction immunitaire de l'hôte est habituellement incriminée dans les cas d'endométrite. Récemment, plusieurs études ont, au contraire, suggéré qu'une exacerbation du système immunitaire peut-être responsable de la persistance d'une inflammation utérine au-delà de 21 JPP.

1. Déficience du système immunitaire

Une immunodépression péri-partum est connue pour favoriser l'apparition d'infections, en particulier d'infections utérines ou mammaires [48-50]. La sécrétion de TNF α est stimulée suite à l'intrusion de bactéries dans la lumière utérine. De façon surprenante, lors de la deuxième semaine post-partum, la concentration de ce médiateur inflammatoire est diminuée chez les vaches qui développent une affection utérine [10]. Au contraire, la concentration sérique en TNF α devient plus élevée lors des troisièmes et quatrièmes semaines post-partum chez les animaux présentant une endométrite [30]. Ces résultats suggèrent qu'en raison d'une faible mobilisation initiale de la réponse immunitaire, la contamination bactérienne n'est toujours pas jugulée plus de 21 JPP, ce qui, en retour, maintient des concentrations plasmatiques élevées en TNF α chez les vaches affectées par une endométrite.

D'autre part, la défense de l'hôte est assurée en grande partie par la fonction de phagocytose des neutrophiles. Chez les vaches qui développent une endométrite, une diminution de l'activité phagocytaire des neutrophiles est observée dès la période pré-partum [30,32]. Les

Analyse bibliographique

Persistance d'une inflammation utérine

mécanismes expliquant cette diminution de la fonction bactéricide sont la réduction de l'activité cytochrome C et myéloperoxydase, suite à l'ingestion de particules opsonisées. Alors que l'activité myéloperoxydase des neutrophiles sanguins diminue légèrement à l'approche du vêlage chez les vaches en bonne santé utérine –avant de se stabiliser en post-partum précoce- une réduction brutale pré-partum est observée chez les vaches qui développeront une inflammation endométriale [50]. Une augmentation du pouvoir phagocytaire et du métabolisme oxydatif est d'ailleurs observée après la première semaine post-partum, dans les cas de résolution spontanée d'endométrite [34]. Ces données suggèrent qu'une diminution du pouvoir bactéricide des neutrophiles sanguins autour du vêlage est en faveur du développement d'une inflammation génitale au-delà de 21 JPP.

Les mécanismes explicatifs d'une diminution de l'immunité au cours du péri-partum sont encore mal compris. Une des raisons peut reposer sur le statut énergétique de l'animal en fin de gestation et en début de lactation. La diminution de la capacité d'ingestion de matière sèche en fin de gestation (à l'origine d'une élévation de la concentration en acides gras non estérifiés [AGNE]) est associée à une réduction de l'activité myéloperoxydase des neutrophiles pendant la période post-partum [50]. En début de lactation, un déficit énergétique important s'accompagne d'une diminution de la concentration sanguine en lymphocytes lors de la deuxième semaine post-partum par rapport aux vaches en situation de déficit énergétique modéré [36]. D'autre part, des études ont montré un lien entre une concentration élevée en corps cétoniques en début de lactation et une plus grande susceptibilité aux affections péri-partum (métrite, endométrite et mammite), par altération de la fonction neutrophile (diminution du chimiotactisme et de l'activité phagocytaire) [50-53]. La relation entre le déficit énergétique et l'immunité a enfin été retrouvée dans des analyses de protéomique montrant une diminution de l'expression endométriale de gènes clés de la régulation de la réponse en protéines de phase aiguë et de stress oxydatif (*PIK3R1*, *GSTA1* et *CRABP1*) chez des vaches en déficit énergétique important en début de lactation [36]. Ces modifications prédisposent la vache à des lésions persistantes de l'endomètre. Celles-ci sont de fait plus longues à réparer et associées à un phénomène inflammatoire chronique.

2. Exacerbation du système immunitaire

Inversement, certaines observations laissent penser qu'une exacerbation du système immunitaire en péri-partum pourrait avoir une influence sur la persistance d'une inflammation utérine au-delà de 21 JPP.

Tout d'abord, le développement d'une endométrite est associé à un comptage différentiel plus élevé du taux de leucocytes plasmatiques en péri-partum (de la première semaine avant le vêlage à la quatrième semaine post-partum) [30]. De plus, l'expression de gènes codant pour des récepteurs de surface cellulaire des neutrophiles (CD45 et CD14) et pour des molécules effectrices de la réponse immunitaire (peptides antimicrobiens et protéines de phase aiguë) est amplifiée chez les vaches présentant une inflammation importante de l'endomètre [10]. L'expression par les neutrophiles et les cellules épithéliales des gènes *HP*, *SAA3*, *TAP* et *DEFB5* est considérablement augmentée chez ces animaux [10]. Par ailleurs, chez les vaches infertiles atteintes d'endométrite, la synthèse de TLR4 et de médiateurs pro-inflammatoires (IL1A et IL1B et leur récepteur IL1R2) est augmentée lors de la première semaine post-partum par rapport aux vaches fertiles. Les ratio d'ARNm d'IL1 (IL1A ou IL1B) sur la cytokine anti-inflammatoire (IL10) sont également supérieurs chez les vaches infertiles. Au-delà de la première semaine post-partum, l'expression des gènes ne diffère plus entre ces deux catégories d'animaux [22]. Les animaux affectés par une inflammation utérine semblent donc développer une réponse inflammatoire importante, qui n'est pas endiguée par des molécules anti-inflammatoires.

Contrairement à ce qui a été décrit dans la section précédente, Wathes *et al.* [36] ont récemment montré qu'un déficit énergétique en début de lactation était associé à une surexpression des médiateurs de l'inflammation. Ils observaient lors de la deuxième semaine post-partum, chez les vaches en déficit énergétique sévère, une augmentation de l'expression de gènes antimicrobiens (*S100A8*, *S100A9* et *S100A12*), de cytokines (IL1 et IL2) et leurs récepteurs, ainsi que de plusieurs gènes codant pour des interférons (*MX1*, *MX2*, *IFIH1*, *ISG20*, *GBP1* et *Loc512486*). Par ailleurs, l'expression des gènes impliqués dans les mécanismes de réparation tissulaire (*MMP1*, *MMP3*, *MMP9*, *MMP13* et *AHSG*) était également augmentée [36]. Les analyses histologiques indiquaient une moindre avancée du processus de réparation de l'utérus chez les animaux en déficit énergétique important par rapport à ceux présentant un déséquilibre modéré, ce qui prolongeait la période de remaniement et d'inflammation de la muqueuse utérine.

Ces analyses suggèrent que le développement d'une endométrite repose en partie sur une incapacité à limiter la réponse pro-inflammatoire physiologique due à la contamination bactérienne post-partum.

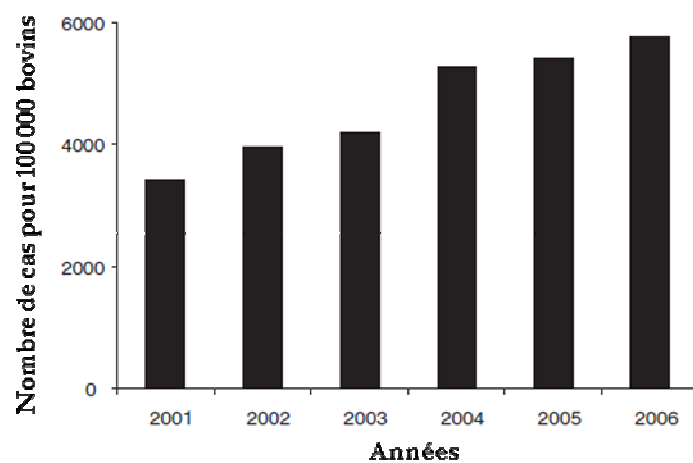
B. Conséquences de la persistance de l'inflammation génitale

La persistance d'une infiltration leucocytaire de l'endomètre bovin a été identifiée depuis longtemps comme un facteur retardant le processus normal d'involution utérine et ainsi perturbant la fonction de reproduction [54]. Plus récemment des troubles de la fonction ovarienne et une réduction de la fertilité ont été rapportés [18,55].

Les vaches dont l'utérus est contaminé par des bactéries présentent une croissance folliculaire réduite (diminution du nombre et du diamètre folliculaire), des concentrations plasmatiques en œstrogènes et progestérone moindres, ainsi qu'un risque d'anœstrus plus important [56,57]. La réduction de croissance folliculaire est surtout associée à la présence d'*E. coli* dans la lumière utérine [57,58]. Les germes ne sont pas spécifiquement retrouvés dans l'ovaire, en revanche une concentration mesurable de LPS est détectée dans le liquide folliculaire des vaches contaminées par *E. coli*, alors qu'elle n'est pas mesurable chez des vaches saines. En cas d'atteinte subclinique d'endométrite (*i.e.*, inflammation cytologique de l'endomètre superficiel en l'absence de signes cliniques) les vaches présentent des concentrations intermédiaires vers 40 à 60 JPP [58]. Les études *in vitro* et *in vivo* s'accordent sur une sécrétion réduite d'œstradiol lors d'infection par le LPS [56,58]. La mise en culture des cellules de la granulosa d'un follicule dominant en présence de LPS n'affecte pas la production d'androstènedione, mais diminue la synthèse d'œstradiol [58]. Les molécules pro-inflammatoires, telle que la cytokine IL6, suppriment également la stéroïdogénèse des cellules de la granulosa [38]. Il semble donc que les cellules de la granulosa ont des capacités immunitaires qui leur permettent de détecter l'infection bactérienne (LPS) et la réponse immunitaire associée (cytokines).

Du fait de la croissance réduite du follicule dominant et d'une moindre œstradiolémie, l'ovulation est perturbée. En présence de sécrétions vaginales anormales, la reprise de la cyclicité ovarienne est d'ailleurs généralement plus tardive (anœstrus anovulatoire ; Odd Ratio [OR] = 2,5) [55]. Chez les vaches qui ovulent, la taille du corps jaune cinq à sept jours après l'ovulation est réduite et la progestéronémie est inférieure à celle de vaches saines [57]. Le LPS diminue la survie des cellules lutéales [59] par un mécanisme encore inconnu qui ferait

Figure 6 : Incidence des cas d'endométrite, ayant nécessité un traitement vétérinaire, enregistrée par le réseau NADIS (National Animal Disease Information Service) entre 2001 et 2006 au Royaume-Unis (d'après Williams *et al.* [8]).



Analyse bibliographique

Persistance d'une inflammation utérine

intervenir une action directe du LPS ou un effet indirect des cytokines par leur pouvoir lutéolytique [18]. La survie de l'embryon se trouve ainsi compromise, à la fois du fait de la faible progestéronémie, que de la lutéolyse précoce [57].

Le risque augmenté de phase lutéale prolongée dans les cas d'inflammation utérine (OR = 4,4 ; [55]) repose sur le mécanisme de lutéolyse. Chez les ruminants, les prostaglandines F sont lutéolytiques, alors que les prostaglandines E ont une action lutéotrope. En réponse au LPS, le ratio PGE sur PGF est modifié vers une accumulation de l'agent lutéotrope, ce qui peut conduire à des corps jaunes persistants [27].

La croissance folliculaire, l'ovulation et la survie de l'embryon se trouvent donc perturbées en cas d'inflammation utérine. C'est pourquoi les endométrites cliniques sont associées à une diminution d'environ 20% du taux de réussite en première insémination [1,4,45,60-63], une réduction de près de 20% du taux de gestation à 150 JPP [45,60,64], un allongement d'une trentaine de jours de l'intervalle vêlage-insémination fécondante (IVIF) [1,63] et une augmentation de 3% du risque de réforme pour infertilité [1,63,65]. Les formes subcliniques sont associées à un allongement de l'IVIF et une diminution de près de moitié du taux de gestation par rapport aux animaux sains [4].

Sur un plan économique, l'impact d'une inflammation utérine pathologique peut être critique pour l'élevage laitier. L'estimation financière de l'impact des inflammations utérines nécessite le calcul des coûts direct (diminution de la production laitière, la mobilisation de l'éleveur, coût du vétérinaire, coût du traitement) et indirect (augmentation de l'intervalle vêlage-vêlage, du nombre d'inséminations, du risque de réforme) de l'infertilité. Le coût total d'un cas d'endométrite clinique a été évalué en moyenne à 161,58 £ (estimation sur 90 élevages du Royaume-Unis), avec des coûts indirects (90,77 £) supérieurs à l'impact direct de la maladie (70,81 £) [66].

D'autre part, le réseau sentinelle NADIS (National Animal Disease Information Service) du Royaume-Unis a mis en évidence une augmentation de la prévalence des endométrites au cours de la dernière décennie (figure 6). En 2006, près de 6% des bovins du Royaume-Unis ont ainsi nécessité l'intervention d'un vétérinaire pour le traitement d'une endométrite clinique [8]. Sachant que le nombre de vaches laitières en Europe s'élevait à 24 146 000 de têtes en 2007 [67], le coût annuel des endométrites représenterait un minimum (sans considérer les formes subcliniques, ni les cas non déclarés aux vétérinaires) de 268 millions d'euros. Même si contrairement aux mammites cliniques et subcliniques, les inflammations génitales de la vache ne concernent pas

directement la sécurité alimentaire et par conséquent le consommateur, ces affections relèvent néanmoins du bien-être animal. De plus, l'augmentation de l'incidence de cette affection et les coûts associés rendent nécessaire un diagnostic exact de l'inflammation utérine.

C. Caractérisation du statut inflammatoire utérin

De nombreuses techniques de diagnostic des endométrites sont disponibles. Elles se distinguent par la technicité, la rapidité et le coût que requiert leur mise en œuvre. La caractérisation du statut inflammatoire du tractus génital peut être effectuée par des examens utérins, vaginaux ou sanguins.

1. Examens utérin

Ces techniques reposent sur la recherche directe d'une inflammation *in situ*.

1.1. Examen cytologique

L'examen cytologique endométrial a été proposé pour la première fois par Gilbert *et al.* [64] chez les bovins, puis repris par Kasimanickam *et al.* [4] pour démontrer l'existence de formes subcliniques d'endométrite. Chez d'autres espèces, comme la jument ou la femme, l'examen cytologique endométrial fait partie des techniques communément utilisées depuis de nombreuses années dans le diagnostic des endométrites, endométrioses et maladies inflammatoires pelviennes [68-71].

Plusieurs dispositifs de prélèvements permettent chez la vache la collecte des cellules endométriales, selon qu'elle s'effectue par le lavage (cathéter d'insémination ; [64,72,73]) ou l'écouvillonnage utérin (écouvillon de coton ; [39] ou cytobrosse ; [4,45,60]). Le lavage utérin collecte des cellules provenant d'une plus grande surface de l'utérus que les techniques de cytobrosse ou d'écouvillon [72]. Mais il peut causer un traumatisme de l'endomètre, mis en évidence par une plus grande contamination sanguine des frottis, que par utilisation d'une cytobrosse [72]. Par ailleurs, cette technique se heurte parfois à des difficultés de recueil du matériel biologique : Kasimanickam *et al.* [72] rapportent une absence de liquide aspiré à la seringue dans 17% des cas. Enfin, l'aspect morphologique des cellules serait altéré par rapport à celui des cellules prélevées à l'aide de la cytobrosse [72]. L'écouvillon de coton est rarement mis

en œuvre pour réaliser un frottis. Il est préférentiellement utilisé pour la mise en culture de la flore bactérienne contaminant les couches superficielles de l'endomètre.

Chez les bovins, le prélèvement cytologique consiste donc la plupart du temps en recueil des cellules du corps utérin, juste en arrière de l'ostium interne du col. Après réalisation d'un frottis cytologique, les lames sont colorées au May-Grünwald-Giemsa (MGG), puis examinées au microscope optique. La classification des populations cellulaires repose sur une reconnaissance morphologique, complétée par le calcul, selon les études, des proportions de sous-populations leucocytaires ou de la proportion de neutrophiles par rapport au total des cellules nucléées [18].

A part de rares cas de contamination sanguine importante, les frottis cytologiques, s'ils sont obtenus lors d'un prélèvement délicat de l'épithélium, sont de lecture aisée. Cependant, le délai imposé entre la mise en œuvre du frottis et l'obtention des résultats est une limite à l'utilisation de l'examen cytologique en pratique bovine. D'autre part, si dans le cas de la jument, le cathétérisme cervical ne présente pas de complexité particulière (d'autant plus qu'il est pratiqué lors de la phase d'œstrus [69]), le passage des anneaux cervicaux de l'utérus bovin peut s'avérer délicat.

Pour information, un microscope optique coûte en moyenne 1 500 € à 2 000 € HT. Les lames de verre pour examen microscopique reviennent à moins de 5 centimes d'euros par étalement. Si la lecture est faite au cabinet, il faut ajouter l'achat des réactifs pour coloration MGG (prix des deux bouteilles de 250 ml : environ 15 € HT ; durée de coloration de l'ordre d'une dizaine de minutes) ou utiliser des kits de colorations rapide (Kit RAL 555 ; CML, Nemours ; durée de coloration inférieure à une minute). En laboratoire privé, la lecture est de l'ordre d'une vingtaine d'euros HT (durée de coloration de l'ordre d'une dizaine de minutes).

1.2. Examen histologique

L'examen histologique donne des informations de très bonne qualité sur le statut inflammatoire de l'endomètre, par évaluation de la population infiltrée et des lésions de la muqueuse utérine [10,74]. Les cas modérés et sévères d'inflammation se diagnostiquent sur la base d'une augmentation du nombre de neutrophiles, regroupés en foyers ou diffus à la surface de l'épithélium. Les cas aigus se caractérisent par une infiltration de neutrophiles, alors qu'un phénomène chronique est composé de lymphocytes, associés à des monocytes et une infiltration de macrophages [12].

Cependant, un effet néfaste sur la fertilité bovine est suspecté depuis plusieurs années [75,76]. Seules quelques études soutenaient son innocuité [77-79], en rapportant que les lésions guérissaient vite, que les hémorragies, qui arrivaient parfois, étaient de faible importance et ne présenteraient aucune conséquence clinique [79]. Ce n'est que très récemment que

Chapwanya *et al.* [78] ont reconsidéré cet examen. En l'absence d'effet néfaste sur la santé, la cyclicité et la fertilité de la vache allaitante, ils ont montré que la biopsie permettait d'obtenir du tissu en quantité suffisante (8 x 5 mm) et de bonne qualité pour permettre des analyses histologiques ou moléculaires plus poussées (génomique ou protéomique).

Pendant de nombreuses années, l'utilisation de la biopsie utérine s'est donc limitée à des essais *ex vivo* ou à des cas isolés. Son utilité et sa valeur pronostique ont donc été ignorées à cause de sa difficulté d'emploi (cathétérisme cervical) et de son risque d'altération des performances de reproduction. Si son innocuité était confirmée par d'autres travaux, le délai nécessaire à l'analyse histologique ainsi que son coût, bien supérieur à celui d'un frottis cytologique (de l'ordre d'une cinquantaine d'euros HT pour la lecture histologique) constitueront néanmoins des freins à son utilisation à grande échelle.

1.3. Mesure de la fonction des neutrophiles

L'activité des neutrophiles peut être abordée sous trois angles : la mesure du chimiotactisme génital, l'évaluation de leur capacité à phagocyter et l'étude de leur pouvoir bactéricide.

L'activité chimiotactique peut être déterminée par la mesure de la migration cellulaire en réponse à un agent chimio-attracteur [80,81]. Elle peut être complétée par une mesure de la diapédèse, par constitution de modèles *in vitro* (suspension de cellules épithélialesensemencées sur des inserts enrobés de collagène). Ces supports ont été utilisés chez les bovins dans la description de la migration cellulaire en cas de processus inflammatoire, depuis la circulation sanguine vers les organes d'intérêt, notamment dans le cas d'infection mammaire [82].

La capacité phagocytaire des neutrophiles peut être évaluée simplement sur des frottis colorés au MGG, par la mesure de la proportion de neutrophiles à activité phagocytaire (présence de bactéries intra-cytoplasmiques) et du nombre de bactéries intracytoplasmiques par neutrophile à activité phagocytaire (appelé index phagocytaire) [34]. Cette méthode peut être complétée par l'évaluation de l'ingestion d'un germe pathogène (*Staphylococcus aureus* ou *Escherichia coli*) marqué par un composant radioactif (généralement de l'iode 125) [34,83].

L'activité bactéricide est mesurée indirectement par l'évaluation du métabolisme oxydatif. Celui-ci est apprécié via l'aptitude à la réduction de différents substrats (bleu de tétrazolium, cytochrome C ; [50,83-85]) ou via la quantification d'une activité enzymatique (myéloperoxydase ; [34,50,83]). Les neutrophiles sont préalablement stimulés par la mise en présence d'immunoglobulines.

Tableau 1 : Classification des bactéries isolées par culture aéro- et anaérobie, selon leur pouvoir pathogène potentiel dans l'utérus (Williams *et al.*, [39]).

Pathogènes majeurs	Potentiellement pathogènes	Contaminants opportunistes
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Clostridium perfringens</i>
<i>Bacteroides sp.</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>Prevotella melaninogenica</i>	<i>Mannheimia haemolytica</i>	<i>Micrococcus sp.</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Pasteurella multocida</i>	<i>Providencia stuartii</i>
<i>Fusobacterium necrophorum</i>	<i>Peptostreptococcus sp.</i>	<i>Protens sp.</i>
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus sp.</i> , coagulase negative
	<i>Streptococci non-hémolytiques</i>	<i>Streptococci α-hémolytiques</i>
		<i>Streptococcus acidominimus</i>
		<i>Aspergillus sp.</i>

1.4. Examen bactériologique

L'examen bactériologique peut être mis en œuvre par deux types de prélèvement, la biopsie utérine ou l'écouvillon bactérien. Alors que Messier *et al.* [86] rapportaient 33% d'isolats supplémentaires avec la biopsie par rapport à l'écouvillon bactérien, ce dernier a ensuite suscité un grand intérêt en raison de son moindre coût, sa plus grande facilité de mise en œuvre et son innocuité pour l'animal [5,12,75]. Il se présente sous la forme d'une capsule stérile de coton ou de gélatine, fixée à l'extrémité d'une tige plastique et protégée d'une gaine stérile double. La réussite du prélèvement repose sur un nettoyage soigné de la région périnéale et l'utilisation d'un milieu de transport adapté, permettant la survie des contaminants jusqu'à la mise en culture en conditions aéro- et anaérobies au laboratoire [5]. Williams *et al.* [39] ont proposé une classification des colonies isolées d'utérus bovins post-partum selon leur pouvoir pathogène (tableau 1).

Recouvert d'une double gaine protectrice, le dispositif d'écouvillonnage, relativement souple, est d'un diamètre conséquent (9 mm). Ces deux caractéristiques ne facilitent pas son insertion à travers le col de l'utérus. De plus, la nécessité d'un prélèvement stérile constitue la seconde difficulté technique. En conditions d'élevage, la contamination par les poussières et autres éléments volatils est presque inévitable. L'obstacle réside donc dans l'interprétation du résultat et dans la discrimination des contaminants pathogènes et opportunistes. En raison de la fréquente contamination des prélèvements, la mise en évidence d'un agent pathogène n'a de valeur que s'il est retrouvé plusieurs fois sur le même animal, s'il fait partie des germes reconnus (classification de Williams *et al.* [39]) ou si sa présence est concomitante à des lésions histologiques. Enfin le délai d'obtention des résultats est de 48 heures.

L'achat d'une pince à biopsie représente certes un investissement (environ 300 € HT), mais son utilisation est durable. Les écouvillons bactériens destinés aux juments, d'usage unique, coûtent en moyenne une trentaine d'euros HT pour dix écouvillons.

1.5. Palpation transrectale

La palpation permet d'accéder au volume, au diamètre et à la consistance de l'utérus. Historiquement, le contrôle d'involution utérine prévoit en France d'évaluer le diamètre des cornes à leur base (4 cm environ à l'état normal), le diamètre du col (inférieur à 7,5 cm) et la consistance utérine (ferme, sans flot liquidien) [11]. Plus récemment, l'endométrite clinique a été définie par la présence d'un écoulement vaginal purulent ou d'un diamètre cervical supérieur à 7,5 cm [63].

La palpation en elle-même n'est pas suffisante pour apporter avec certitude le diagnostic d'endométrite [5,87]. Sa subjectivité ne fait pas d'elle une bonne technique diagnostique. L'involution (typiquement taille et consistance de l'utérus et des cornes) varie avec chaque vache et sa perception avec chaque utilisateur. Bien que la palpation transrectale constitue la technique la plus facile de mise en œuvre (technicité, coût, durée), seul le diamètre cervical est, parmi tous ses critères, associé à la présence d'endométrite [63].

1.6. Echographie transrectale

En cas d'endométrite, l'accumulation importante de pus dans l'utérus reste rare. Mais une zone anéchogène, en partie crâniale et déclive de l'utérus, est parfois observée à l'échographie transrectale. On constate alors de nombreuses petites accumulations liquidiennes responsables d'une échogénicité fortement hétérogène. On ne dispose actuellement d'aucune publication décrivant une image échographique pathognomonique de l'endométrite, même si Kasimanickam *et al.* [4] indiquent considérer comme critère la présence de « liquide dans l'utérus », sans fournir aucune image, ni indication précise. Ce critère est repris à l'identique par Senosy *et al.* [88]. Seuls Barlund *et al.* [60] ajoutent une mesure de l'épaisseur de la zone anéchogène (1 ou 3 mm).

L'échographie est une technique absolument non invasive. Elle autorise une détection plus fine des modifications du tractus génital, ce que ne permet pas la palpation transrectale. Cependant, le coût d'un échographe comprend l'équipement (entre 8 000 et 13 000 € HT) et éventuellement les formations pour l'apprentissage. D'autre part, la valeur diagnostique de l'échographie, autant en médecine humaine que vétérinaire, repose sur l'habileté et l'habitude de chacun. Le diagnostic différentiel d'endométrite doit se faire dans toutes les situations où du liquide peut se rencontrer dans l'utérus, pour des raisons physiologiques ou pathologiques (œstrus, kyste folliculaire, gestation, mortalité embryonnaire).

2. Examens vaginaux

Le diagnostic vaginal comprend l'observation macroscopique des sécrétions contenues dans la cavité vaginale et le dosage des constituants biochimiques du mucus.

2.1. Aspect macroscopique des sécrétions vaginales

Les endométrites cliniques se caractérisent par la présence de pus mélangé aux sécrétions vaginales [1]. L'inspection de la queue de l'animal et des traces sur le sol en constitue une première étape. Celle-ci doit être complétée par l'observation du contenu vaginal directement *in situ* ou de son recueil à l'aide de différents dispositifs.

Les techniques classiques comprennent la vidange manuelle du contenu vaginal à l'aide d'une main gantée, l'observation directe au vaginoscope (cylindre de plastique ou de carton ; 42 x 5 cm) ou au spéculum (système en métal constitué de deux valves). Récemment (2002), une sonde intravaginale spécifique surmontée d'une cupule de silicone à fond noir (Metricheck®, Simcro, Hamilton, Nouvelle-Zélande) a été conçue en Nouvelle-Zélande pour faciliter le recueil et l'examen des sécrétions.

L'étape de désinfection du matériel et de nettoyage de la région périnéale constitue un préalable indispensable à la bonne conduite du protocole. Certaines controverses concernent l'étape de lubrification de l'instrument, indispensable selon Mee [89] pour écarter le risque de lésions par abrasion de l'orifice urétral ou du vagin. Cette lubrification offre cependant le désavantage de fausser la nature des sécrétions recueillies, par dilution du matériel purulent.

Aucune technicité particulière n'est nécessaire. La difficulté réside dans l'introduction du dispositif lorsque la femelle montre une réaction de défense. Les techniques de recueil à l'aide d'une main gantée ou du dispositif Metricheck® présentent donc l'intérêt d'effectuer l'observation des sécrétions à distance de l'animal et de ne nécessiter aucune source lumineuse. Le recueil des sécrétions vaginales varie d'une durée de quelques secondes (vidange manuelle) à quelques minutes (vagoscope, spéculum, Metricheck®) selon la coopération de l'animal.

Le mucus vaginal recueilli peut être classé en différentes catégories selon la proportion de pus [39]. Les endométrites sont définies par la présence de sécrétions muco-purulentes (moins de 50 ml de mucus contenant moins de 50% de pus blanchâtre) à purulentes (plus de 50 ml de mucus contenant plus du pus généralement blanchâtre ou jaunâtre et occasionnellement sanguinolent) [39]. Le spéculum, le vaginoscope et le Métricheck® donnent des résultats comparables pour le diagnostic des formes cliniques [89,90]. La spécificité et la valeur prédictive positive d'un diagnostic par vaginoscope ou Métricheck® sont significativement supérieures à celui d'un diagnostic par palpation transrectale [89].

Selon les dispositifs utilisés, le coût de l'examen varie du simple au double. Il faut compter en moyenne 3 € HT pour un vaginoscope en carton et 70 € HT pour un vaginoscope en plastique. L'achat d'un Metricheck® coûte en moyenne 30 € HT. Enfin, la vidange manuelle

Tableau 2 : Seuils de concentration en composants des sécrétions vaginales en relation avec le taux de réussite à l'insémination (n = 281 ; Mascarhenas [7]).

Ig : Immunoglobuline ; s : Sécrétoire

Marqueur	Seuil	Taux de réussite à l'insémination	Test du Chi-deux
Protéines totales	< 3 mg/ml	60,3%	$P < 0,05$
	≥ 3 mg/ml	52,6%	
Albumine	< 50 μ g/ml	62,9%	$P < 0,05$
	≥ 50 μ g/ml	50,0%	
IgG1	< 40 μ g/ml	63,0%	$P < 0,05$
	≥ 40 μ g/ml	48,5%	
IgG2	< 40 μ g/ml	64,2%	$P < 0,05$
	≥ 40 μ g/ml	50,9%	
IgAs	< 50 μ g/ml	64,6%	$P < 0,05$
	≥ 50 μ g/ml	50,7%	

constitue l'examen le moins coûteux, sachant qu'une boîte de 100 gants d'examen coûte moins de 10 € HT.

2.2. Dosages biochimiques

Une fois l'écoulement vaginal recueilli (selon les méthodes préalablement décrites), une analyse biochimique de ses composants peut être entreprise. La turbidité des sécrétions est fortement corrélée au nombre de leucocytes par gramme de mucus [7]. En plus des marqueurs de l'immunité cellulaire (leucocytes), les sécrétions cervico-vaginales contiennent des marqueurs de l'immunité humorale, principalement des immunoglobulines (Ig) G et A [7,91]. La transsudation du sérum en est la source principale, même si une synthèse locale dans le col et le vagin semble possible [7,12]. Un dosage direct des différents types de protéines (protéines totales, albumine, lactoferrine et immunoglobulines) dans les sécrétions vaginales a été proposé par Mascarhenas [7]. Il a ainsi pu déterminer, pour chaque substance dosée, les seuils de concentration, au dessus desquelles la fertilité était significativement diminuée (tableau 2). Cependant, alors que les concentrations en IgG et en albumine des sécrétions utérines sont de bons marqueurs de l'endométrite, les résultats semblent moins favorables concernant le mucus vaginal [7]. Ceci est probablement imputable à la sécrétion essentiellement locale (col et vagin) de la glaire vaginale. Les sécrétions de l'endomètre se trouvent donc particulièrement diluées dans la cavité vaginale. De plus, en cas de sécrétions purulentes, l'origine du pus peut être complètement extérieure au tractus génital, comme lors d'infection vésicale ou rénale. Les marqueurs dosés dans le mucus vaginal ne sont alors pas le reflet de l'état inflammatoire de la cavité utérine.

Le manque de spécificité de l'analyse biochimique constitue un frein à son utilisation en pratique. D'autre part, les sécrétions vaginales possèdent une viscosité et une capacité d'étirement très élevée qui rendent difficile leur manipulation. Le dosage de leurs composants, par un test rapide ou une méthode directe par analyseur, nécessite préalablement la mise au point de techniques de solubilisation du mucus par des agents chimiques, enzymatiques ou physiques [7].

3. Examens sanguin

Les marqueurs sanguins offrent un moyen peu invasif d'évaluation de l'inflammation génitale. Les analyses proposées reposent sur les dosages des protéines de phase aiguë, de marqueurs biochimiques et métaboliques, ainsi que sur le calcul de la formule leucocytaire sanguine.

3.1. Dosage des protéines de phase aiguë

Les protéines de phase aiguë font partie des systèmes de défense non spécifiques de l'organisme (se reporter à la partie I.3.3.). Le suivi de la concentration sérique des APPs, et notamment de l'haptoglobine, est par conséquent utile dans l'évaluation des processus inflammatoires des bovins. Les autres protéines plasmatiques, la céruloplasmine et la glycoprotéine acide- α_1 , présentent une augmentation plus modérée en cas d'inflammation [92].

Immédiatement après la parturition, les concentrations circulantes en APPs augmentent chez la vache et la brebis. Le pic est atteint le lendemain de la mise bas, puis les concentrations en glycoprotéine acide- α_1 , haptoglobine et céruloplasmine diminuent au cours du processus d'involution utérine [37,93]. La variation de la concentration sérique en APPs a longtemps été expliquée par les processus de réparation tissulaire de la période d'involution. Sheldon *et al.* [37] ont montré que leur concentration était aussi associée au score de croissance bactérienne de l'écouvillonnage utérin (échelle de 0 à 4 en fonction de la croissance des colonies *in vitro*). De plus, les concentrations en glycoprotéine acide- α_1 et en céruloplasmine augmentent lors de l'isolement d' *A. pyogenes* ou d'*E. coli* [37].

Alors que l'association entre les protéines de phase aiguë et la présence de germes dans la lumière utérine est manifeste, la valeur diagnostique d'une augmentation de la concentration sérique en APPs est faible dans l'identification spécifique d'une inflammation génitale. La concentration en glycoprotéines sériques est d'ailleurs augmentée lors de mammite sévère [92]. De plus, les APPs semblent réagir uniquement aux processus génitaux du post-partum immédiat. Alors que les protéines sont décrites comme de bons marqueurs de la métrite (infection utérine des 21 premiers JPP) [92], les endométrites cliniques ne sont pas associées à une augmentation de la concentration plasmatique en haptoglobine [7,92]. Enfin, reste à savoir si les APPs peuvent avoir un rôle dans l'identification des processus inflammatoires subcliniques. Leur présence est retrouvée dans des cas de mammite subclinique [94], cependant leur lien avec les endométrites subcliniques n'est pas encore établi. Seuls Chan *et al.* [94] établissent une relation entre une augmentation de la concentration circulante en haptoglobine et une diminution des performances de reproduction (IVIF), baisse qu'ils attribuent à la présence d'endométrite subclinique, sans pour autant réaliser de comptage de la population cellulaire.

3.2. Dosages des prostanoides

La demi-vie des prostanoides étant très courte, le dosage repose sur l'évaluation de la concentration plasmatiques des métabolites stables des prostaglandines F 2 α et E2, respectivement les PGFM et PGEM.

L'inoculation de bactéries dans la lumière utérine s'accompagne d'une augmentation de la concentration plasmatique en PGFM par rapport au groupe de vaches non traitées [95]. Cependant, ce n'est pas une sécrétion élevée et prolongée de PGF2 α qui favorise le développement d'une inflammation utérine, mais précisément la diminution du rapport PGF2 α /PGE2 [96]. Il est donc envisageable de diagnostiquer les endométrites en mesurant le rapport PGFM/PGEM.

Deux méthodes permettent d'obtenir leurs concentrations : un dosage par ELISA et une technique radio-immunologique (RIA) [97]. Le dosage par ELISA est réalisable au cabinet. Il nécessite cependant l'achat d'une gamme échantillon dont le coût, pour une gamme de 30 échantillons, est de 500 € HT. L'investissement est certain et le temps nécessaire non négligeable. La méthode par RIA est uniquement effectuée dans le cadre de programmes de recherche. Cette méthode pourrait également être réalisée au cabinet pour les opérateurs avertis et suite à une formation à la radioprotection et à la mise aux normes du local. La réalisation de la RIA revient à 1 € HT par échantillon.

3.3. Dosage biochimiques

Les enzymes créatinine phosphokinase (CPK) et aspartate aminotransférase (ASAT) sont libérées dans le sang lors de lésions tissulaires entraînant la lyse cellulaire, telles qu'un dommage musculaire ou lors de pathologie hépatique. Les changements histologiques de la muqueuse endométriale lors de processus inflammatoire chronique sont également responsables d'une élévation des concentrations plasmatiques de CPK et ASAT [98]. Alors qu'Azawi *et al.* [99] notent une augmentation significative de ces marqueurs chez les vaches atteintes d'endométrite par rapport à des génisses saines. Les concentrations sont néanmoins similaires chez des multipares saines et celles atteintes d'inflammation utérines.

Le lien entre l'équilibre énergétique et l'inflammation génitale n'est pas direct, mais fait intervenir une modification de la réponse immunitaire de l'animal (se reporter à la section II.A.). La mesure de facteurs métaboliques constitue un indicateur précoce de la susceptibilité aux inflammations génitales. L'équilibre énergétique de l'animal peut être caractérisé par la mesure de

différents marqueurs sanguins, tels que les acides gras non estérifiés, les corps cétoniques (dont les béta-hydroxybutyrates), le glucose, l'urée ou l'insuline [51].

3.4. Numération formule leucocytaire

La numération leucocytaire sanguine, et plus précisément le comptage différentiel des sous-populations cellulaires, présente un intérêt dans l'évaluation d'un phénomène inflammatoire [40]. En cas de métrite, l'augmentation de la concentration pré-partum de neutrophiles est moins marquée, alors que sa chute en postpartum est accentuée par rapport aux vaches saines [32]. Mateus *et al.* [34] ont suivi la formule sanguine de vaches atteintes d'endométrite clinique. Cependant, l'absence de groupe témoin dans cet essai ne permet pas de mettre en évidence une quelconque modification de la numération formule sanguine chez les animaux affectés par une endométrite.

De plus, le comptage des leucocytes sanguins n'est pas spécifique aux modifications du tractus génital. Le suivi conjoint de la formule leucocytaire sanguine et utérine peut néanmoins présenter un intérêt dans la mesure de la diapédèse et de la fonction neutrophile [34]. Le coût d'une cytologie sanguine est d'une vingtaine d'euros HT.

D. Axes principaux du travail expérimental

L'état des connaissances sur l'inflammation utérine post-partum de la vache laitière s'est considérablement développé ses dernières années, particulièrement depuis l'utilisation de l'examen cytologique endométrial. En revanche, le compartiment cervical a été délaissé dans la grande majorité des études. Impliqué d'une façon indirecte dans la fécondation, le col possède néanmoins une position clé à l'interface entre la lumière utérine stérile et l'environnement extérieur contaminé, qui lui confère un rôle de barrière de protection de l'utérus contre les agents pathogènes. Cependant la mobilisation du système immunitaire face à un contaminant n'a toujours été décrite que dans le compartiment utérin. Notre travail a donc consisté en une caractérisation indépendante du statut inflammatoire de deux sites du tractus génital, le col et le corps utérin.

L'intégralité de ce travail a reposé sur la mise en œuvre de l'examen cytologique génital, comme technique de référence pour l'évaluation de l'état inflammatoire génital. Il semblait donc indispensable dans une première partie de valider cette technique sur le plan des conditions de

Analyse bibliographique

Persistance d'une inflammation utérine

lecture, des sites de prélèvement et de sa correspondance avec l'examen bactériologique utérin. D'autre part, face à la mise en œuvre nouvelle du frottis endocervical, préalablement utilisé par une seule équipe de recherche dans le monde [100], cette partie a donc consisté en une description de l'inflammation dans le compartiment cervical. Des imprécisions dans la littérature nous ont aussi conduit à décrire qualitativement et quantitativement l'inflammation endométriale.

Ensuite (deuxième partie), nous avons cherché à définir à partir de quelle proportion de neutrophiles sur un frottis endométrial et endocervical, une altération des performances de reproduction était observée. En effet, l'importance économique de l'inflammation génitale réside très majoritairement dans la détérioration des performances de reproduction. Inversement, seules les inflammations ayant un impact sur la reproduction nécessitent d'être diagnostiquées. Cette deuxième partie a regroupé deux essais réalisés à des moments clés du post-partum : à la fin du processus d'involution utérine, vers 30 JPP, puis lors de la mise à la reproduction des animaux, peu avant l'insémination artificielle.

La troisième partie a reposé sur la recherche des facteurs de variation du statut inflammatoire génital. Nous avons tout d'abord décrit l'évolution de l'inflammation physiologique au cours des premiers mois post-partum, puis nous avons cherché à évaluer l'influence du cycle œstral sur le statut inflammatoire génital. Enfin, l'influence de facteurs propres à l'animal, des conditions de vêlage et du statut métabolique ont été testés.

Puisque les inflammations utérines sont une préoccupation actuelle de l'élevage laitier, la dernière partie de notre travail s'est intéressée aux techniques diagnostiques disponibles, grâce à la diffusion de deux enquêtes, à la description actuelle de l'attitude des éleveurs et des vétérinaires français face à cette affection.

Les différents essais ayant reposé la plupart du temps sur la mise en œuvre des mêmes techniques de prélèvement et d'analyse, les matériels et méthodes utilisés ont été regroupés dans un premier chapitre, suivi des résultats des différentes études (deuxième chapitre), divisés en quatre parties, brièvement décrites plus haut. Les résultats de chaque expérience ont été discutés immédiatement après leur description. Enfin, le dernier chapitre constitue une synthèse et une discussion générale des résultats de nos différents essais avec les données de la littérature.

MATERIELS ET METHODES

Les matériels et méthodes communs aux différentes études sont présentés ci-dessous. Les spécificités relatives à chaque protocole seront précisées en début des parties correspondantes.

I. Animaux

La totalité des études a été menée sur des bovins adultes non gestants. Ce travail de thèse s'est articulé autour de six grands protocoles. Le premier correspondait au recrutement de 168 vaches entre 21 et 60 JPP et à la réalisation de cinq techniques diagnostiques successives. Les animaux recrutés dans ce protocole ont également été utilisés pour l'étude de la description des populations cellulaires présentes sur les frottis génitaux (chapitre I.A.), de la variabilité des résultats des résultats de lecture des frottis génitaux (I.B.), de la correspondance entre les examens bactériologiques et cytologiques (I.D.), de l'impact à long terme de l'inflammation génitale (II.A.), des facteurs favorisant l'inflammation génitale (III.C.), des valeurs diagnostiques des techniques macroscopiques (IV.A.1.) et du caractère pathologique des sécrétions vaginales (IV.A.3.). Le second protocole correspondait à la collecte de 101 utérus *ex vivo* pour l'étude de l'homogénéité de l'inflammation dans le tractus génital bovin (I.C.). Le troisième protocole reposait sur le recrutement de 93 vaches pour l'évaluation de l'impact à court terme de l'inflammation génitale sur les performances de reproduction (II.B.). Quarante et vingt six vaches ont été recrutées dans l'étude de l'évolution de l'inflammation génitale au cours du post-partum (protocole n°4 ; chapitre III.A.) et du cycle œstral (protocole n°5 ; chapitre III.B.). Enfin, le sixième protocole incluait 157 vaches dans l'évaluation de l'influence de la palpation transrectale sur la valeur diagnostique de l'examen de sécrétions vaginales. Les bovins utilisés dans les protocoles n°3 à n°6 ont été regroupés en un effectif total de 745 vaches, pour l'étude *in vivo* de la variabilité de l'inflammation liée au site de prélèvement (I.C.)

A. Etudes *in vivo*

1. Echantillon d'étude

Les protocoles expérimentaux ont été réalisés en grande majorité dans trois élevages laitiers de la région parisienne (Yvelines), sur des bovins de race Prim'Holstein suivis par l'Unité de Reproduction de l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort (ENVA). Au cours des trois années de

recrutement (campagnes laitières 2006 à 2009), le nombre d'animaux était en moyenne de 117 vaches en production dans la ferme d'AgroParisTech (78, Thiverval-Grignon), 131 vaches dans la ferme de La Tremblaye (78, La Boissière-Ecole) et 290 vaches dans la ferme de Bissy (78, Bonnelles). Les niveaux de production moyens variaient par élevage entre 9 500 et 10 000 kg de lait par vache et par an. Un quatrième élevage (SCL des 3L, 76, Ourville-en-Caux) a été recruté pour l'étude « Impact à court terme de l'inflammation génitale sur la fertilité » (partie II.B. des résultats). L'exploitation comptait 115 vaches en lactation, avec une production laitière moyenne de 9 900 kg de lait par vache sur la campagne laitière 2009/2010.

2. Gestion de la reproduction

Un suivi de reproduction était assuré tous les quinze jours par l'Unité de Reproduction de l'ENVA. Les vaches étaient examinées entre 21 et 35 JPP pour la recherche d'endométrite clinique. L'insémination artificielle avait lieu après une période d'attente volontaire de 50 JPP. Les diagnostics de gestation étaient réalisés entre 30 et 45 jours post-insémination par échographie transrectale (sonde 6 MHz ; Aquila®, Pie Medical, Hospimedi, Poisy, France ; Tringa®, Pie Medical, Esaote, Saint-Germain-en Laye, France). Les vaches étaient également examinées lors d'anomalie de la cyclicité et traitées selon les conclusions de l'examen de l'appareil génital.

Les pratiques d'élevage et la gestion de la reproduction n'ont pas été modifiées par les protocoles expérimentaux, à l'exception du protocole « Evolution de l'impact de l'inflammation génitale au cours du cycle œstral » (partie III.B. des résultats), pendant la durée duquel il avait été demandé à l'éleveur de ne pas inséminer les femelles incluses. Ni les éleveurs, ni les vétérinaires réalisant les suivis n'avaient connaissance des informations recueillies au cours des différents essais.

B. Etudes *ex vivo*

Une étude s'est déroulée *ex vivo* dans l'abattoir de Noeux-les-Mines (62 ; groupe Bigard) avec l'aimable autorisation des Docteurs Roze et Machacova. Les observations et prélèvements étaient réalisés immédiatement. Les utérus bovins étaient récupérés en triperie, au fur et à mesure de leur arrivée de la chaîne d'abattage. Les utérus découverts gestants suite à l'incision de chacune des cornes utérines le long de la grande courbure, étaient exclus de l'étude.

Tableau 3 : Composition des modèles en silicone pour l'évaluation de la consistance des cornes utérines par palpation transrectale.

Consistance		Tonique	Ferme	Molle	Dure	Pâteuse
Cylindre interne	Epaisseur ^a (mm)	9,5	7	9,5	7	9,5
	% silicone	40	70	50	40	30
Cylindre externe	Epaisseur ^b (mm)	4	6,5	4	6,5	4
	% silicone	60	50	70	70	70

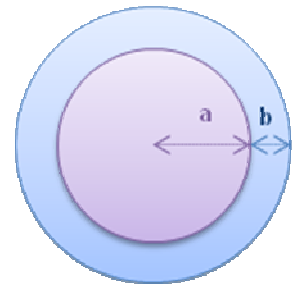
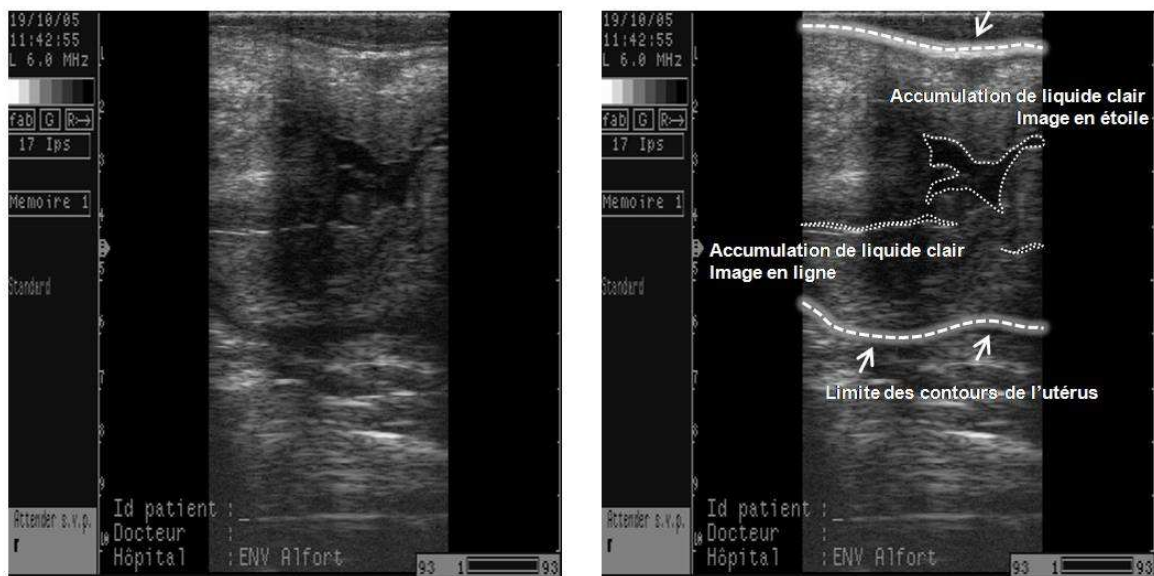


Figure 7 : Image échographique d'accumulation de liquide dans l'utérus (Unité de Reproduction, ENVA).



II. Caractérisation de l'inflammation génitale

L'inflammation du tractus génital a été caractérisée par des méthodes macroscopiques, classiquement utilisées par les vétérinaires praticiens (palpation et échographie transrectales, examen du contenu vaginal), ainsi que des examens complémentaires ou techniques microscopiques (examens cytologique et bactériologique). Lorsque les techniques diagnostiques étaient utilisées en combinaison, elles étaient réalisées dans l'ordre suivant : palpation transrectale, échographie transrectale, examen du contenu vaginal, examen cytologique, puis examen bactériologique.

A. Palpation transrectale

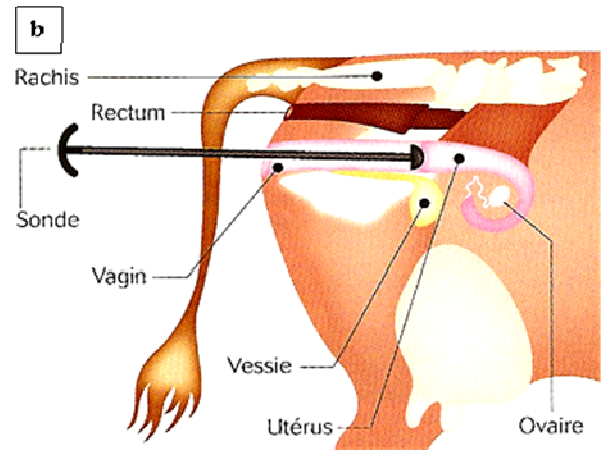
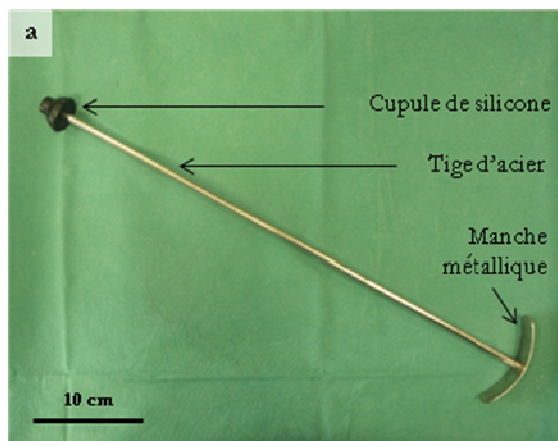
Pour effectuer cette exploration, une main préalablement gantée (Sensigan®, Alcyon, Paris, France) et lubrifiée à l'aide d'huile de paraffine (Chimie Dro, Alcyon) palpe l'utérus à travers la paroi rectale. Les diamètres du col de l'utérus et de chacune des cornes utérines (immédiatement en avant des ligaments intercornuaux) étaient mesurés. La consistance des cornes était évaluée par comparaison avec des modèles en silicone, formés d'un cylindre interne plein, inséré dans un cylindre creux d'épaisseur variable (tableau 3). Par dilution de silicone (Silicone RTV 6007, Esprit Composite, Paris) dans de l'huile (Huile silicone, Esprit Composite, Paris), des cylindres de différentes concentrations ont été formés (de 30 à 70% de silicone pour le cylindre interne et de 50 à 70% pour le cylindre externe), permettant de créer cinq modèles de consistance utérine : tonique, ferme, molle, dure et pâteuse.

B. Echographie transrectale

L'examen échographique était effectué par voie transrectale à l'aide d'un échographe Aquila® équipé d'une sonde linéaire de 6 MHz et alimenté sur le secteur. L'utérus était parcouru dans sa globalité, afin de noter la présence d'images liquidiennes dans la lumière utérine, certaines formant des lignes anéchogènes d'accumulation d'un liquide clair de faible épaisseur (de 1 à 3 mm), d'autres formant des étoiles (figure 7).

Figure 8 : Recueil du contenu vaginal à l'aide du dispositif Metrichick®.

- a. Sonde intravaginale Metrichick® (Deguillaume)
- b. Principe de la mise en place (d'après Mee [89])



C. Examen du contenu vaginal

Des traces d'écoulements vulvaires étaient recherchées sur la zone périnéale, la queue de l'animal et le sol. L'inspection externe était complétée par un recueil et un examen macroscopique du contenu vaginal.

1. Matériel

Selon les protocoles, le contenu vaginal était collecté à l'aide d'une main gantée (Sensigan®) lubrifiée avec de l'eau propre ou grâce à une sonde intravaginale (Metricheck®, Simcro ; figure 8, [89]). L'instrument était constitué d'une tige en acier inoxydable de 50 cm de long, surmontée d'une cupule hémisphérique de silicone de couleur noire (4 cm de diamètre).

2. Méthode

2.1. Nettoyage de la région périnéale

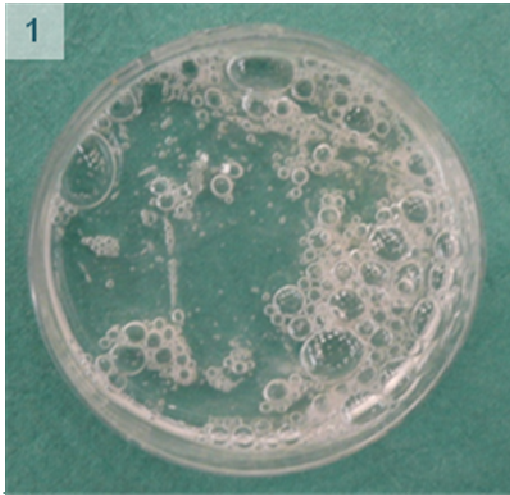
La région périnéale, la vulve et la commissure inférieure, auxquelles s'accrochent fréquemment débris et souillures, étaient minutieusement nettoyées. La queue était maintenue sur le côté afin de ne pas contaminer la zone. Après un premier nettoyage à l'aide de papier absorbant à usage unique, nécessaire pour éliminer les fèces liquides de la région périnéale, un deuxième passage était alors réalisé à l'aide de papier imbibé de savon antiseptique (Vétédine® savon, Vetoquinol, Lure, France). Le nettoyage était effectué de façon centrifuge, puis la zone était séchée au moyen de papier absorbant.

2.2. Recueil par vidange manuelle

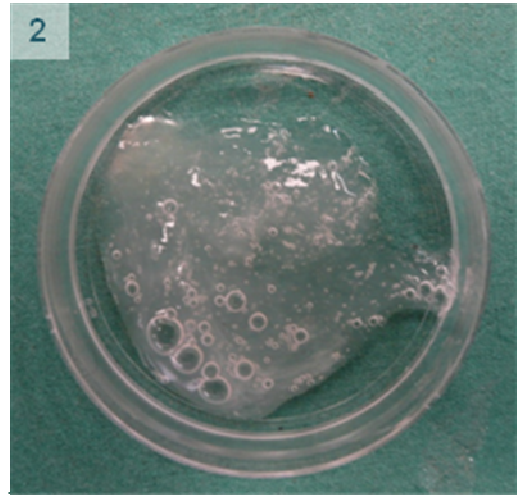
Suite au nettoyage de la région périnéale, une main, préalablement gantée et lubrifiée à l'eau, était introduite dans le vagin de l'animal, jusqu'à l'orifice postérieur du col. Les doigts étaient introduits dans les fornix vaginaux ventraux et dorsaux. A la sortie du bras, la main était utilisée comme réceptacle pour recueillir les sécrétions vaginales.

Figure 9 : Classification des sécrétions vaginales selon leur aspect macroscopique (Unité de Reproduction, ENVA)

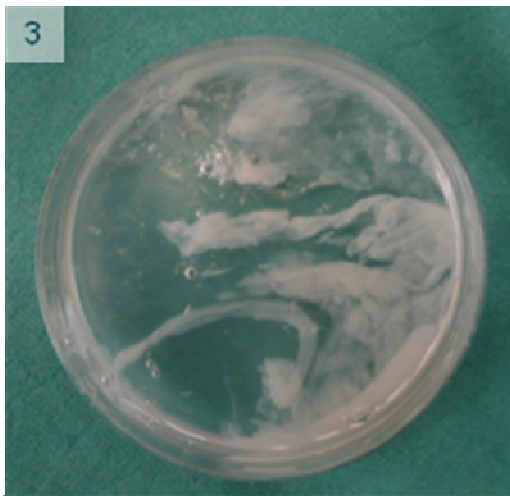
La catégorie [0] (i.e., absence de sécrétions) n'a pas été représentée.



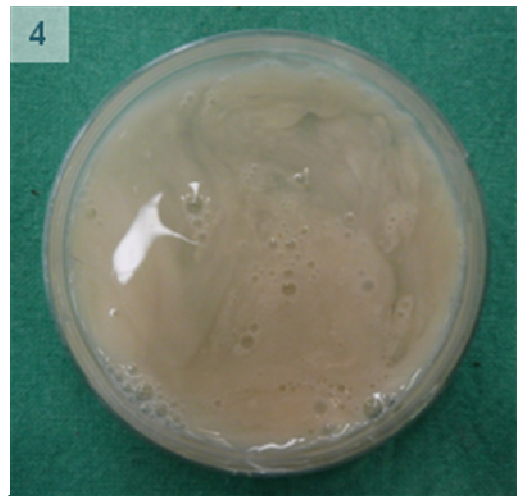
[1] Sécrétions claires
ou translucides



[2] Mucus trouble ou
présence de rares flocons de pus blancs



[3] Mucus contenant moins de 50%
de pus blanchâtre



[4] Mucus contenant plus de 50%
de pus blanchâtre

2.3. Recueil par le Metrichheck®

La sonde, lubrifiée à l'eau propre, était insérée délicatement, après nettoyage de la région périnéale (préalablement décrite), en visant théoriquement l'orifice postérieur du col. Elle était avancée crânialement jusqu'au fornix du vagin (figure 8), puis retirée doucement, en soulevant le manche pour optimiser la récolte du contenu vaginal dans la cupule de silicone. Les sécrétions étaient contenues à l'intérieur de la surface concave de la sonde ou adhérentes à la partie convexe du dispositif. Entre chaque examen, l'instrument était désinfecté dans un seau de solution antiseptique diluée de povidone iodée (Vétédine® solution, Vetoquinol).

3. Classification des sécrétions

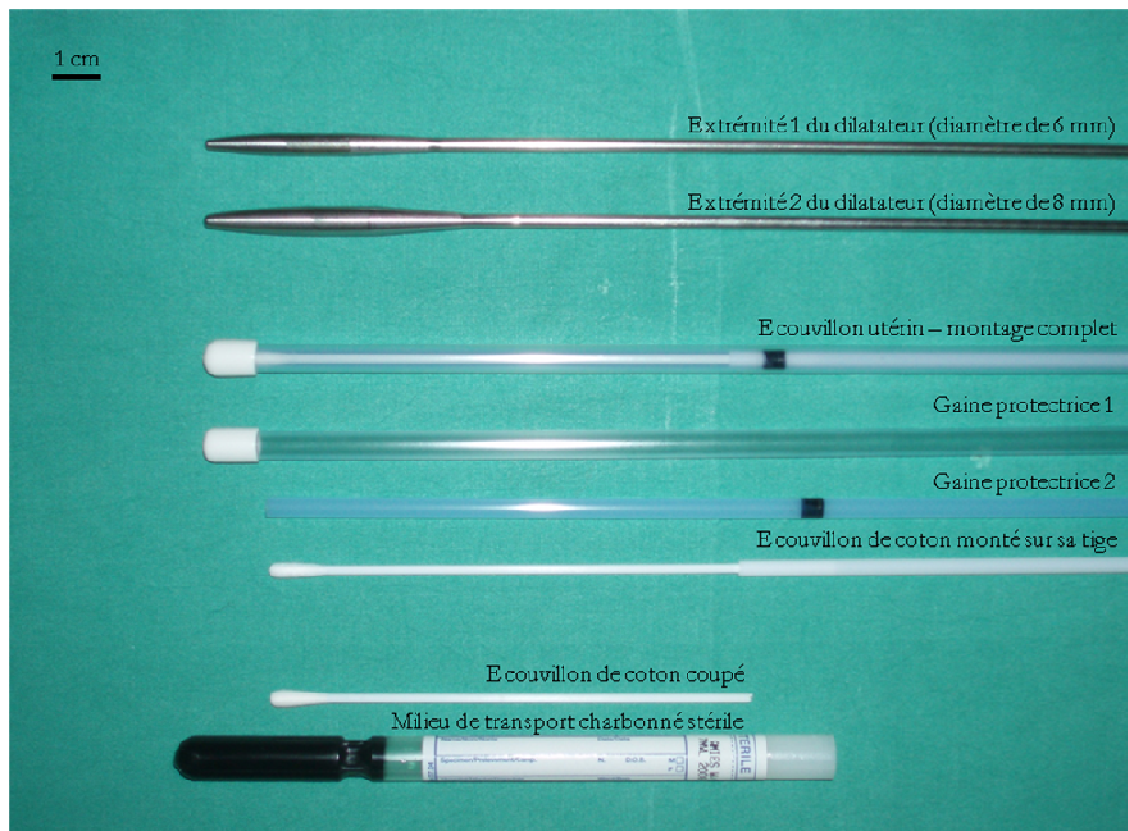
Immédiatement après la collecte, l'aspect macroscopique du contenu vaginal était évalué à l'intérieur du gant translucide ou dans la cupule à fond noir selon la technique de recueil utilisée. La classification, inspirée de celle de Williams *et al.* [39], était basée sur la proportion de pus mélangé aux sécrétions : [0] absence de sécrétions, [1] sécrétions claires ou translucides, [2] mucus trouble ou présence de rares flocons de pus blancs, [3] mucus contenant moins de 50% de pus blanchâtre, [4] mucus contenant plus de 50% de pus blanchâtre (figure 9).

D. Examen bactériologique

1. Matériel

Des écouvillons utérins à usage unique pour jument ont été utilisés (Equivet®, Alcyon). Une capsule stérile de coton fixée à l'extrémité d'une tige plastique d'une soixantaine de centimètres de long et d'un diamètre de 6 mm, était recouverte d'une gaine protectrice stérile double, prévenant la contamination de l'écouvillon lors de son introduction dans les voies génitales (figure 10). Un dilateur cervical métallique (de diamètre de 6 ou 8 mm ; IMV Technologies, l'Aigle, France) pouvait être nécessaire au prélèvement bactériologique.

Figure 10 : Matériel utilisé pour le prélèvement bactériologique (Deguillaume).



2. Méthode

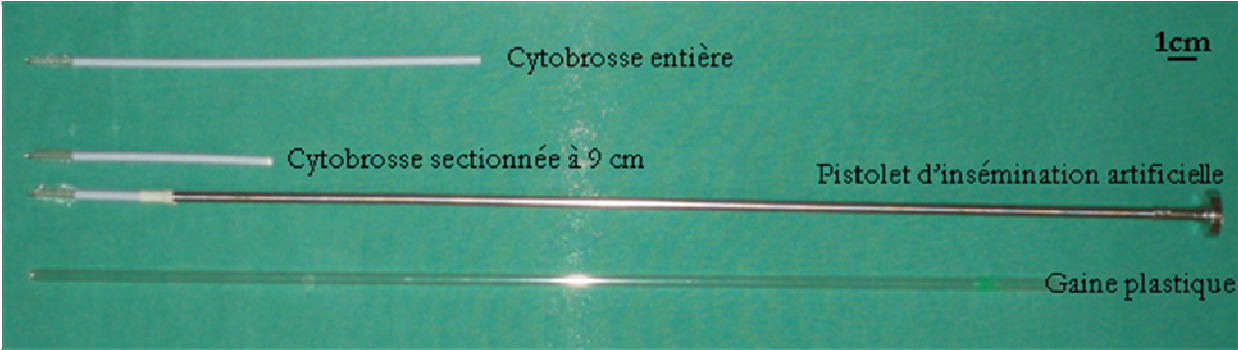
Deux opérateurs étaient nécessaires pour ce prélèvement. Après désinfection soignée de la vulve (préalablement décrite), un dilateur métallique pouvait être utilisé pour faciliter le passage de l'extrémité large (d'un diamètre de 9 mm) de l'écouvillon bactérien lors du cathétérisme cervical. Cette opération préalable terminée, le dispositif était introduit dans le vagin et guidé par palpation transrectale à travers le canal cervical jusqu'à la lumière utérine. Une fois dans l'utérus, l'écouvillon, découvert de sa gaine protectrice était déplacé deux centimètres en avant de la bifurcation des cornes utérines et mis en contact de l'endomètre utérin. Avant son retrait définitif, le coton était réintégré dans sa gaine protectrice. De façon stérile, l'écouvillon était placé par le deuxième opérateur dans un milieu de transport charbonné stérile (milieu Amies, AES, Combourg, France, figure 10), traditionnellement utilisé dans l'identification de la Métrite Contagieuse des Equidés, permettant la survie de souches aéro- et anaérobies. Le délai entre le prélèvement et l'arrivée au laboratoire (Laboratoire de Bactériologie, ENVA) n'excédait pas six heures.

3. Culture et identification des souches bactériennes

Tout le matériel consommable utilisé pour la culture et l'identification bactérienne provenait de BioMérieux (Marcy l'Etoile, France). Au laboratoire, chaque écouvillon était mis en culture à une température de 37°C sur deux géloses au sang (milieux en boîte de Pétri : gélose Columbia + 5% de sang de mouton). L'une était placée à l'étuve en milieu aérobie, l'autre était déposée dans une jarre hermétique (GENbox Jar 2,5 L) contenant un sachet (GENbox anaer) générateur d'anaérobiose. Au bout de 24 à 48 h, la ou les colonie(s) présente(s) étai(en)t repiquée(s) à nouveau sur une gélose au sang. L'opération était répétée jusqu'à l'obtention d'une culture pure.

Les bactéries étaient ensuite identifiées selon différents critères : leur aspect, la coloration obtenue après coloration de Gram (test Color Gram 2), leur morphologie (bacille ou coque ; identification au microscope à immersion, 1000 x), le type d'hémolyse, les profils biochimiques (test Catalase pour les souches Gram + ; ID Color Catalase ; et Test Oxydase pour les souches Gram - ; Oxydase, Disques non imprégnés, 6 mm) et enfin, l'utilisation de galeries d'identification rapide (API). Les colonies identifiées étaient classées selon les types bactériens classiquement isolés de l'utérus bovin post-partum, d'après la classification de Williams *et al.* [39] (tableau 1).

Figure 11 : Montage de la cytobrosse et du pistolet d'insémination artificielle pour le prélèvement cytologique (Deguillaume).



E. Examen cytologique

1. Matériel

1.1. Protocoles *in vivo*

Des frottis endocervicaux et endométriaux ont été réalisés à l'aide d'une cytobrosse stérile (Cytobrush® Plus GT, Medscand® medical, Alcyon) modifiée pour un usage chez les grands animaux. La cytobrosse était coupée à environ 9 cm de la longueur de sa tige plastique et était insérée dans un pistolet d'insémination artificielle en acier inoxydable (45 cm de long et 4,1 mm de diamètre intérieur ; Kombicolor®, IMV Technologies). La cytobrosse était fixée à moitié de sa longueur (soit environ 4 cm) à l'extrémité du pistolet, à l'aide d'Adhéroplaste Fibranne® (BSN Médical, Vibraye, France). Le montage était ensuite placé dans une gaine plastique d'insémination artificielle (44 cm de long, IMV Technologies) afin de rigidifier l'ensemble (figure 11). Enfin, l'instrument était recouvert d'une chemise sanitaire (IMV Technologies).

1.2. Protocole *ex vivo*

Ce protocole ne nécessitait pas de montage particulier. Quatre cytobrosses (Cytobrush® Plus GT) étaient nécessaires par utérus recruté, une pour chaque site de collecte.

2. Méthode

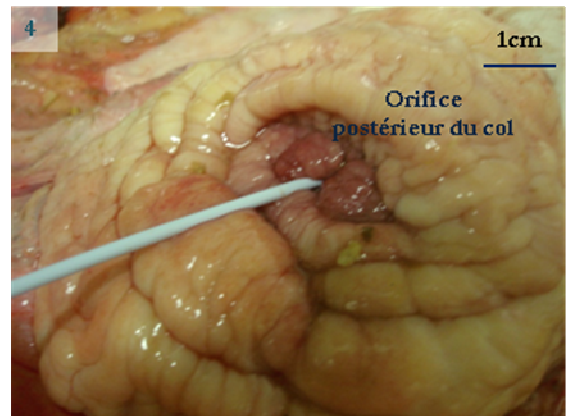
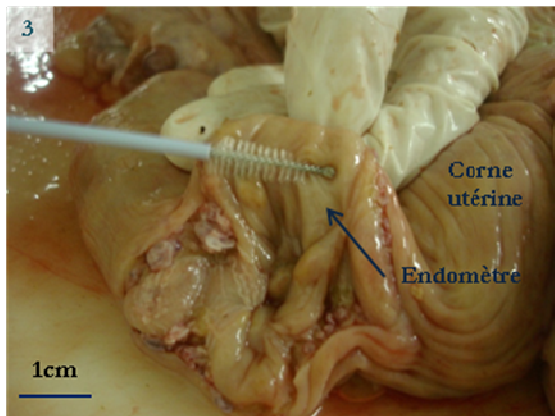
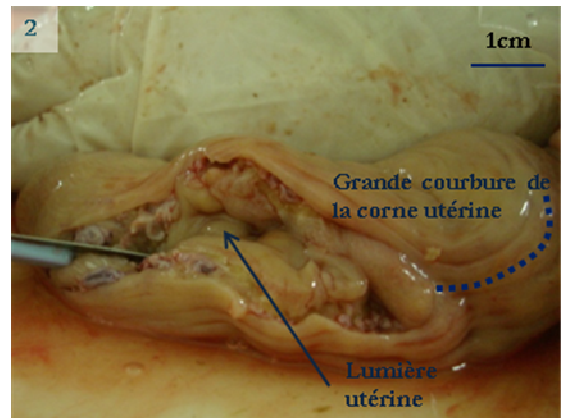
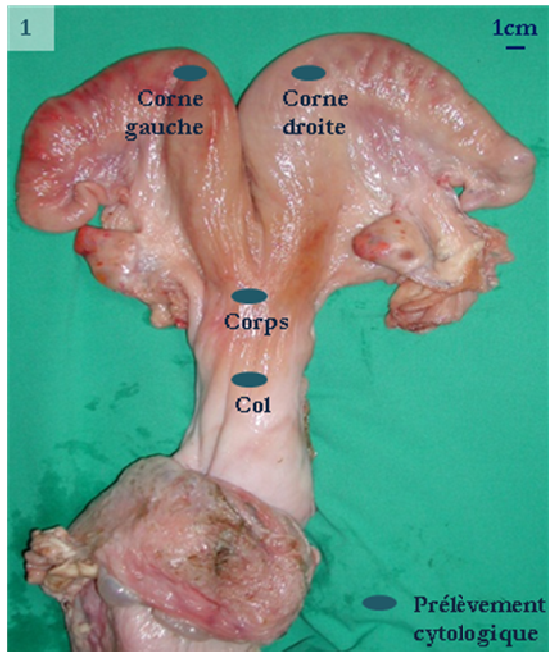
2.1. Protocoles *in vivo*

2.1.1. Prélèvement endocervical

Après nettoyage de la région périnéale (préalablement décrite), l'instrument lubrifié par de l'huile de paraffine (Esprit Composite), était introduit à travers la vulve et guidé par voie vaginale jusqu'à l'orifice postérieur du col. La chemise sanitaire percée, le pistolet d'insémination était poussé hors de la gaine plastique, afin de découvrir la cytobrosse dans le deuxième anneau du col. Par un mouvement de rotation en sens horaire, la cytobrosse était pressée contre l'une des parois du col. Elle était ensuite recouverte de sa gaine sanitaire plastique avant d'être extraite du vagin de l'animal.

Figure 12 : Prélèvements cytologiques *ex vivo* sur utérus d'abattoir (Deguillaume).

1. Sites des quatre prélèvements cytologiques
2. Incision de la corne jusqu'à la lumière utérine, sur la grande courbure, par une lame de bistouri
3. Réalisation du frottis endométrial par rotation de la cytobrosse contre la paroi de l'endomètre
4. Réalisation du frottis endocervical par introduction de la cytobrosse dans l'orifice postérieur du col jusqu'au deuxième anneau cervical



2.1.2. Prélèvement endométrial

En prenant les mêmes précautions d'hygiène, un montage similaire était inséré dans le vagin. Une main assurait par voie transrectale le guidage du pistolet par mobilisation du col de l'utérus. En cas de difficulté de cathétérisme, le dilateur métallique (IMV Technologies) utilisé pour l'examen bactériologique (voir plus haut) pouvait être employé. Quelques centimètres avant la bifurcation des cornes, la cytobrosse était découverte afin de réaliser le prélèvement. Le retrait s'effectuait sous couvert de la gaine sanitaire, afin d'éviter toute contamination cellulaire.

2.2. Protocole *ex vivo*

Les sites prélevés étaient le col (au niveau du deuxième anneau cervical), le corps de l'utérus (face ventrale, 2 cm en dessous de la bifurcation des cornes), ainsi que les cornes droite et gauche, (face ventrale, 2 cm au-dessus du ligament large ; figure 12). Après incision de l'utérus avec une lame de bistouri non stérile, en regard de chaque site, la brosse était appliquée contre la muqueuse utérine et tournée dans un sens horaire, en appliquant une légère pression. Le prélèvement endocervical ne nécessitait pas d'incision de la paroi de l'utérus, la brosse étant directement insérée dans l'orifice postérieur de col jusqu'au site de prélèvement, au niveau du deuxième anneau cervical (figure 12).

3. Réalisation des frottis

Immédiatement après le prélèvement (*in vivo* ou *ex vivo*), les frottis étaient réalisés en roulant la cytobrosse sur une lame en verre pour microscope (lame standard, CML, Nemours, France). En cas de contamination sanguine visible sur la brosse, deux frottis étaient réalisés et le second utilisé pour analyse. Selon les protocoles, les lames étaient fixées sur place, à l'aide d'un vaporisateur pour cytologie (CytoRAL®, Réactifs RAL, CML) ou laissées sécher à l'air libre, puis rangées dans une boîte de transport.

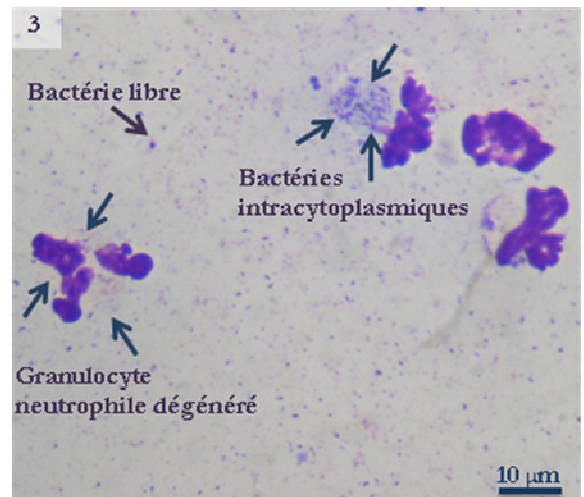
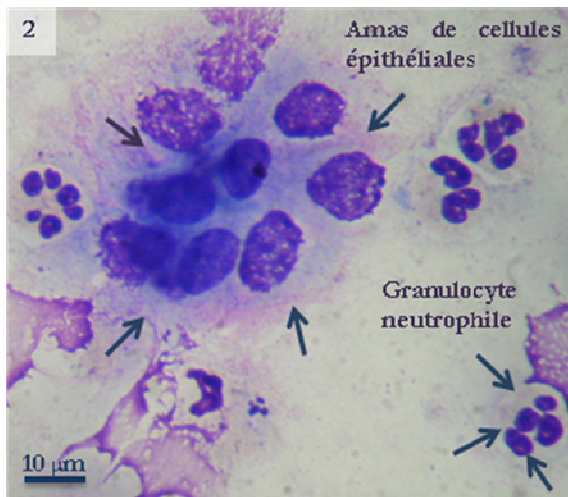
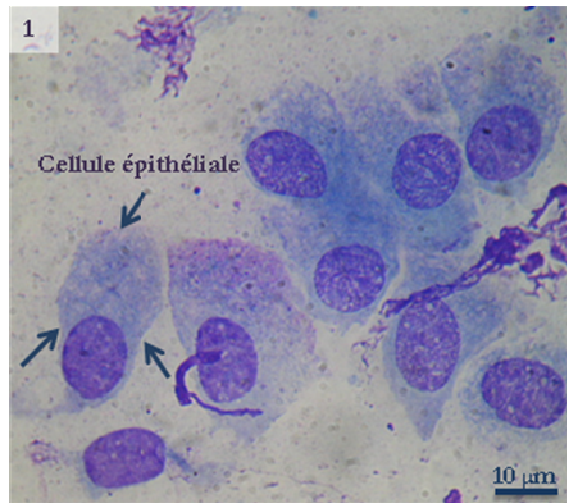
4. Coloration et lecture des frottis

Les lames étaient colorées par un automate (modèle Aerospray, Wescor, Kitvia, Labarthe Inard, France) en utilisant la coloration de May-Grünwald-Giemsa. La méthode de lecture comprenait, tout d'abord, une observation de la lame au faible grossissement (100 x) pour attester

Figure 13 : Frottis cytologiques endométriaux (grossissement 1000 x, coloration May-Grünwald-Giemsa ; Deguillaume).

Les flèches délimitent les contours des cellules d'intérêt

1. Cellules épithéliales
2. Granulocytes neutrophiles infiltrés dans l'endomètre utérin (amas de cellules épithéliales)
3. Granulocytes neutrophiles dégénérés après phagocytose (bactéries intra-cytoplasmiques)
4. Présence de bactéries libres sur le fond de la lame



de son homogénéité et rechercher une zone de lecture correcte, puis à l'objectif à immersion (1000 x) en faisant des créneaux, comme lors de la lecture d'un frottis sanguin.

Deux cent cellules ont été comptées par frottis. Pour être prise en compte, une cellule devait : avoir un contour nucléaire visible et intègre, avoir un contour cytoplasmique visible et intègre et faire partie de l'une des six catégories suivantes : granulocyte neutrophile mature (cytoplasme de coloration neutre ou légèrement éosinophile, noyau segmenté ; figure 13), granulocyte éosinophile (granules cytoplasmiques éosinophiles, noyau bilobé), granulocyte basophile (granules cytoplasmiques de coloration bleutée intense, masquant parfois le noyau), lymphocyte-plasmocyte (diamètre de 8 à 15 µm, noyau rond, chromatine dense, rapport nucléocytoplasmique élevé), monocyte-macrophage (diamètre de 13 à 19 µm, vacuoles intracytoplasmiques, noyau de grande taille, chromatine diffuse) ou cellule épithéliale (agranulaire, granuleuse ou squameuse ; figure 13) [101]. N'étaient pas comptés : les cellules anucléées (hématies et squames), les cellules abimées, les noyaux nus, les amas tridimensionnels de cellules, les cellules fortement fusiformes, isolées ou en paquets, évoquant des fibroblastes. Par ailleurs, la contamination sanguine était évaluée selon les caractéristiques suivantes : [0] pas d'hématie, [+] quelques hématies, [++] plusieurs plages de lecture fortement hémorragiques et [+++] cellules à compter toutes incluses dans des plages hémorragiques et de morphologie altérée. La présence de bactéries (libres ou intra-cytoplasmiques ; figure 13) était également notée qualitativement.

A l'issue de la lecture, les proportions des différentes sous-populations leucocytaires ont été calculées, soient les taux de neutrophiles (%N), éosinophiles, lymphocytes – plasmocyte et monocyte – macrophage, parmi les deux cents cellules comptées par frottis.

III. Détermination de la phase du cycle œstral

Lors du protocole *ex vivo*, les organites ovariens étaient latéralisés et classés après section longitudinale. Selon les protocoles *in vivo*, la phase du cycle œstral était déterminée par examen échographique des ovaires et/ou par dosage des stéroïdes sexuels sanguins. Il s'agissait plus particulièrement d'évaluer si les animaux se trouvaient sous l'influence de la progestérone au moment de l'examen cytologique génital.

A. Echographie ovarienne

Les images ovariennes ont été réalisées à partir d'un échographe portable (Tringa® Pie Medical ou Agrosan® ALR 575, ECM Noveko International Inc, Angoulême, France) disposant d'une sonde linéaire de 7,5 MHz.

Sur chacun des ovaires, seules les structures dont le diamètre dépassait 10 mm étaient enregistrées. Les organites présents (follicule, corps jaune, corps jaune cavitaire, kyste folliculaire, kyste lutéal) étaient caractérisés par leur nombre et leur dimension (après mesure des deux axes de la structure par section perpendiculaire). Le follicule était défini comme une structure anéchogène de paroi fine, de section ronde de moins de 25 mm de diamètre. Il s'opposait au kyste folliculaire, structure anéchogène de paroi fine, de plus de 25 mm de diamètre. Les corps jaunes étaient définis comme des structures grises bien délimitées et d'échogénicité homogène [102].

L'échographie ovarienne a aussi été utilisée pour déterminer le moment de l'ovulation, par cartographie ovarienne, après un protocole d'induction de l'œstrus (se reporter à la partie III.B. des résultats). Des échographies ovariennes étaient alors réalisées quotidiennement pendant une durée de quatre à sept jours selon le protocole d'induction de l'œstrus. Le jour de l'ovulation était défini comme le jour de disparition du follicule dominant (follicule de plus gros diamètre, en croissance les jours précédents).

B. Dosage des stéroïdes sexuels

Les prises de sang étaient réalisées à la veine coccygienne (aiguille 18G ; Vacutainer®, Becton Dickinson, Le Pont-de-Claix, France) sur héparinate de lithium (4 ml ; Vacutainer®, Becton Dickinson). Durant le transport jusqu'au laboratoire (Laboratoire Biologie du Développement et Reproduction, ENVA), les prises de sang étaient conservées à température ambiante. Après centrifugation à 2000 g pendant cinq minutes, le plasma était récupéré grâce à une micropipette et conservé en deux aliquots congelés à - 20°C jusqu'à analyse.

Les dosages d'œstradiol 17 β et de progestérone ont été réalisés sur deux à trois jours consécutifs, selon les études. Les échantillons décongelés à température ambiante puis

homogénéisés par vortex étaient dosés par ELISA et chemiluminescence sur un automate (Hitachi Elecsys® 1010, Roche, Neuilly sur Seine, France).

L'analyseur était calibré pour la progestérone à l'aide du kit Progesterone II (Cobas®, Roche) de limite de détection basse 0,03 ng/ml, et de limite de détection haute 60,00 ng/ml. Pour le dosage de l'œstradiol 17 β , l'analyseur était calibré à l'aide du kit Œstradiol II (Cobas®, Roche) de limite de détection basse 5 pg/ml, et de limite de détection haute 4300 pg/ml. Les coefficients de variation intra- et inter-dosage pour la progestérone étaient respectivement de 2 et 10%. Les coefficients de variation intra- et inter-dosage pour l'œstradiol étaient respectivement de 6 et 10%. Un taux de progestérone (P4) supérieur à 3,2 nmol/l (1 ng/ml) attestait la présence d'un corps jaune fonctionnel [103].

IV. Analyses statistiques

Les données ont été analysées à l'aide du logiciel SAS® 9.2 (SAS Institute Inc, Cary, NC, USA). Les valeurs du degré de significativité P étaient bilatérales. Le risque d'erreur α a été situé à 5%. Les tailles d'échantillon sont définies, dans la partie descriptive, par le recrutement du plus grand nombre de sujets permettant d'obtenir l'estimation la plus précise des paramètres évalués. Dans les études analytiques, l'absence d'information précise sur les valeurs des variables d'intérêt, à nécessité le recueil du plus grand nombre d'individus possible, correspondant généralement à la totalité des vaches du troupeau satisfaisant les critères d'inclusions de l'étude.

A. Epidémiologie descriptive

La vache constituait l'unité épidémiologique. Les médianes des variables continues (taux de neutrophiles endométriaux, endocervicaux) ont été comparées à l'aide des tests non paramétriques (sans contrainte de normalité des distributions) de Wilcoxon (comparaison de deux médianes) et de Kruskal-Wallis (comparaison de plus de deux médianes). Les variables binaires (taux de neutrophiles < seuil ν : taux de neutrophiles \geq seuil) ont été comparées à l'aide du test du chi-deux. Ces tests ont permis à plusieurs reprises de comparer des groupes d'individus selon des facteurs (cyclicité ovarienne, délai post-partum, *etc*) susceptibles d'être associés au taux de neutrophiles génitaux.

Les associations entre les variables continues ont été analysées à l'aide du test de concordance de Lin [104]. Il a notamment été utilisé pour tester la reproductibilité de la mesure entre deux observateurs ou entre deux sites de prélèvements (section I. des résultats) [105,106]. Le coefficient de concordance de Lin (ρ_c) est plus approprié que les autres indices (tels que le coefficient de corrélation de Pearson ou le coefficient de variation) pour mesurer l'accord lorsque la variable d'intérêt est continue. En général, les autres coefficients n'offrent pas la précision et l'exactitude qu'apporte le coefficient de concordance [105,106]. L'interprétation de la valeur du coefficient de concordance ρ_c a reposé sur la classification suivante : la reproductibilité de la mesure était classée « excellente » pour les valeurs \hat{n}_c supérieures à 0,95, « très bonne » ($0,90 < \rho_c \leq 0,95$), « assez bonne » ($0,80 < \rho_c \leq 0,90$), « moyenne/satisfaisante » ($0,70 < \rho_c \leq 0,80$), « médiocre » ($0,60 < \rho_c \leq 0,70$), « mauvaise » ($0,50 < \rho_c \leq 0,60$) ou « inacceptable » ($\rho_c \leq 0,50$) [107].

Lorsque la variable d'intérêt était binaire, la reproductibilité du diagnostic a été évaluée par le calcul du coefficient de concordance kappa. Les seuils d'interprétation de ce coefficient étaient : « excellent » pour un $\kappa > 0,75$, de « médiocre » à « bonne » pour $0,40 < \kappa < 0,75$ et « mauvais » pour des valeurs inférieures à 0,40 [108].

B. Analyse de survie à partir de données longitudinales

L'analyse de survie, utilisant les courbes de Kaplan-Meier et le modèle de Cox [109], a été utilisée pour deux études distinctes : l'évaluation de l'impact d'une inflammation endométriale et/ou endocervicale sur le taux de gestation, puis l'analyse du caractère pathologique des sécrétions vaginales contenant du pus en plus ou moins grande proportion.

Lors de l'étude de l'impact d'une inflammation génitale sur les paramètres de reproduction (se reporter à la partie II.A.), les courbes de Kaplan-Meier représentaient la proportion de vaches non gestantes en fonction du temps. La variable « temps » correspondait au nombre de jours écoulés entre le vêlage et l'insémination fécondante ou la date de la réforme, selon l'évènement intervenant en premier. Le temps de survie était censuré à 300 JPP. Le test du Logrank comparait les courbes de survie des vaches présentant ou non une inflammation génitale.

Le modèle multivarié de Cox quantifiait les chances de gestation (*i.e.*, risque relatif [RR] de survenue de l'évènement « gestation ») en fonction de l'inflammation génitale. Les statuts inflammatoires endométriaux et endocervicaux étaient définis par la proportion de neutrophiles

parmi la population cellulaire comptée (200 cellules par frottis ; voir plus haut). Le taux de neutrophiles a été inclus dans le modèle en tant que variable binaire selon le seuil d'inflammation retenu. En plus du taux de neutrophiles, le modèle de Cox incluait des facteurs de confusion potentiels (*i.e.*, variables décrites dans la littérature ou identifiées dans notre étude associées au statut inflammatoire et au taux de gestation, pour une valeur de $P < 0,20$). Au final, les variables incluses dans le modèle multivarié étaient le taux de neutrophiles, la note d'état corporel (NEC), la parité et l'élevage d'origine.

En raison d'une possible interaction entre le moment du prélèvement (*i.e.*, nombre de jours écoulés entre le vêlage et l'examen cytologique) et le statut inflammatoire génital, les analyses ont été stratifiées selon le nombre de jours post-partum ($<$ ou ≥ 35).

Pour chacune des inflammations endométriales et endocervicales, les seuils de neutrophiles retenus ont été sélectionnés sur la base de la plus petite valeur du critère d'Akaike [110], fournie par le modèle de Cox élaboré pour des niveaux d'inflammation variant de 0 à 15%N.

L'analyse de survie a également été utilisée dans une autre étude évaluant le caractère pathologique des sécrétions vaginales (section IV.A.3. des résultats). La relation entre l'aspect des sécrétions vaginales et les performances de reproduction a été étudiée jusqu'à 300 JPP. Les sécrétions ont été classées en variables binaires selon la proportion de pus (dans un premier temps, mucus translucide *vs.* flocons de pus, puis, flocons de pus *vs.* mucus purulent).

Les courbes de Kaplan-Meier, représentant la proportion de vaches non gestantes en fonction du nombre de jours post-partum, ont été comparées (test du Logrank) en fonction de la catégorie des sécrétions vaginales. Enfin, le modèle de Cox évaluait les chances de gestation en fonction de la présence de sécrétions purulentes en plus ou moins grande quantité. Le modèle incluait les facteurs de confusions potentiels suivants : NEC, parité et ferme d'origine.

C. Analyse par une fonction polynôme

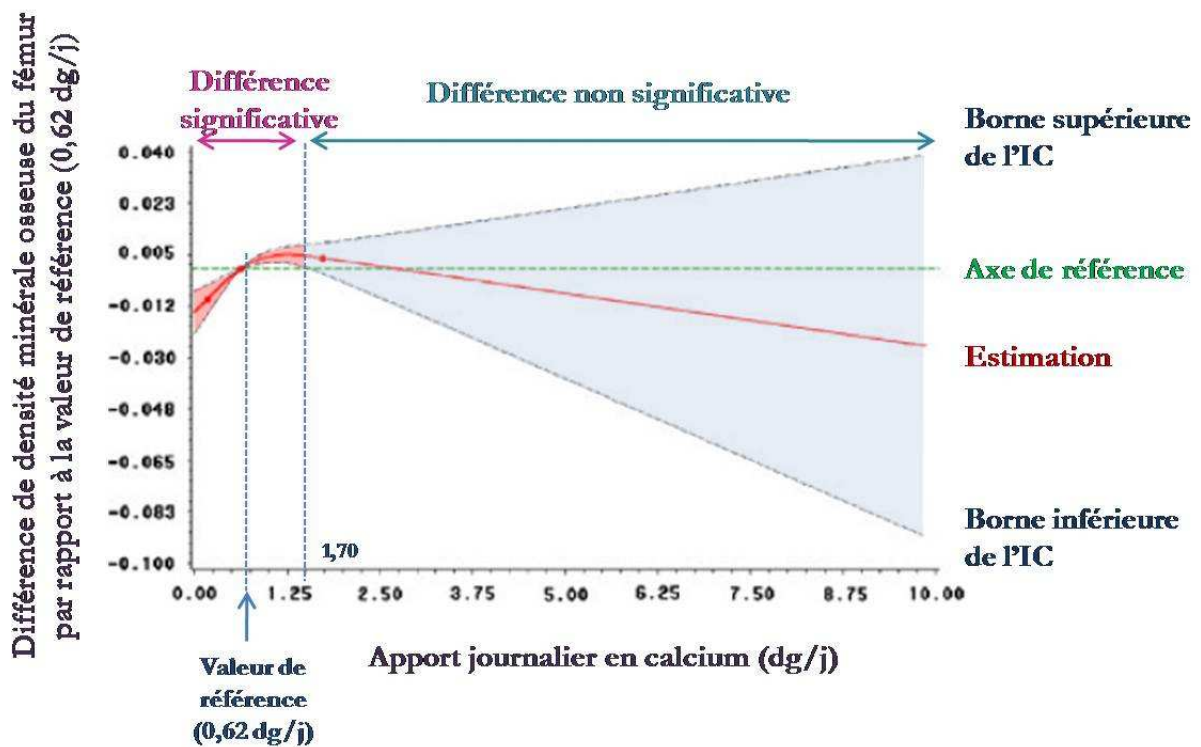
La modélisation par une fonction polynôme a été utilisée à deux reprises dans notre travail : pour représenter l'évolution de l'inflammation génitale au cours du post-partum et pour évaluer l'impact des stéroïdes sexuels sur l'inflammation génitale.

Par rapport aux fonctions binaires simples (fonction en escaliers), l'utilisation de fonctions polynômes par morceaux (fonction spline cubique restreint) permet une représentation plus souple de la relation entre une variable d'exposition continue (ici, le délai post-partum ou la

Figure 14 : Interprétation d'une modélisation par une fonction polynôme de l'impact de l'apport journalier en calcium (variable d'exposition) sur la densité minérale osseuse du fémur (variable mesurée ; d'après Desquilbet et Mariotti [111]).

IC : intervalle de confiance.

La ligne horizontale (pointillé vert ; axe de référence) correspond à une différence nulle de densité minérale osseuse par rapport à la valeur de référence (de densité osseuse) mesurée pour un apport de calcium de 0,62 dg/j. Pour des valeurs inférieures à 1,70 dg/j, l'apport en calcium a un impact significatif sur la densité osseuse, alors que pour des valeurs supérieures à 1,70 dg/j, l'impact n'est pas significatif (la surface [bleue] décrite par les intervalles de confiance de la modélisation inclut l'axe de référence [vert]).



Matériels et méthodes

concentration en stéroïdes sexuels) et une mesure quantitative (ici, le taux de neutrophiles) [111]. En supprimant les créneaux qui caractérisent la fonction en escaliers, la fonction linéaire polynôme permet de lisser la courbe, ce qui facilite l'interprétation de la relation qui existe à un temps donné.

La modélisation conduit à une fonction (courbe rouge ; figure 14), représentant l'estimation de la relation entre la variable d'exposition (axe des abscisses) et la mesure (axe des ordonnées), encadrée par deux autres courbes symbolisant ses intervalles de confiances à 95%. La fonction est décrite par des nœuds (dont le nombre est choisi entre trois et huit) définissant les changements de pente de la courbe pour les différents intervalles de la variable d'exposition. Lorsque la surface dessinée par les intervalles de confiance de la courbe (surface rouge ; figure 14) n'inclue pas l'axe de référence (correspondant à une différence nulle de la variable mesurée par rapport à la valeur de référence), il existe alors un impact significatif de la variable d'exposition sur la variable mesurée.

Dans l'étude du suivi de l'inflammation génitale au cours du post-partum (se reporter à la partie III.A. des résultats), la modélisation avait comme objectif de tester l'impact du délai post-partum sur le résultat de l'examen cytologique (*i.e.*, taux de neutrophiles). La fonction polynôme représentait la variation du %N génitaux en fonction du temps, par rapport à une valeur de référence (*i.e.*, variation nulle du %N) fixée à 45 JPP (nadir de la courbe). En d'autres termes, la modélisation estimait la différence entre le %N à un temps donné et le %N à 45 JPP. Enfin, le modèle était ajusté sur les variables note d'état corporel, production laitière et déficit énergétique.

Dans l'étude de l'influence des stéroïdes sexuels sur l'inflammation génitale (section III.B. des résultats), la fonction polynôme a modélisé successivement la variation du %N génitaux (un modèle pour l'utérus et un pour le col) en fonction de la progestéronémie, de l'œstradiolémie et du ratio œstradiol sur progestérone, par rapport à une référence (*i.e.* variation nulle du %N) définie par une concentration clé en stéroïdes (cas de la progestéronémie ; valeur de référence de 1 ng/ml) ou par la valeur médiane (cas de l'œstradiolémie et du ratio) lorsqu'il n'existait aucune hypothèse sous-jacente. Un impact des hormones stéroïdiennes sur l'examen cytologique était attesté par une variation significative du %N génitaux en fonction de la concentration plasmatique en stéroïdes.

RESULTATS

**I. L'inflammation génitale
évaluée par l'examen cytologique**

L'inflammation génitale évaluée par l'examen cytologique

L'examen cytologique endométrial, plus facile d'utilisation que la biopsie utérine, est considéré depuis 2004 chez la vache, comme technique de référence pour l'évaluation du statut inflammatoire de l'appareil génital, par dénombrement des leucocytes infiltrés dans la muqueuse. Cependant, la population leucocytaire rencontrée lors de frottis endométriaux n'a encore jamais été décrite avec précision.

Chez la jument et la femme, l'examen cytologique endométrial est généralement associé à un frottis endocervical, afin de diagnostiquer les infections de la partie haute (endométrite, endométriose, maladie inflammatoire pelvienne) et de la partie basse (vaginite, cervicite) du tractus génital [69-71,112]. Chez les bovins, l'examen cytologique endocervical a été tout d'abord décrit pour la recherche de la pathogénicité de certains contaminants du tractus génital, tels que *Haemophilus somnus* ou *Trichomonas fetus* [113,114]. Cet examen a ensuite été proposé, chez la vache et la brebis, comme une alternative, plus facile de mise en œuvre, au prélèvement endométrial, car s'affranchissant du cathétérisme cervical, parfois difficile selon le degré d'ouverture de l'orifice postérieur et la configuration des anneaux du col [115,116]. Cependant l'homogénéité de l'inflammation dans les différentes zones du tractus génital n'a pas été étudiée, et le résultat de l'examen endocervical n'a encore jamais été comparé à celui de l'examen cytologique de l'endomètre utérin.

La première partie de notre travail a été ainsi consacrée à caractériser les frottis cytologiques. Il s'agissait tout d'abord d'évaluer, qualitativement et quantitativement, la population cellulaire présente sur les frottis génitaux post-partum. Nous avons ensuite étudié les variabilités de lecture inter- et intra-opérateur. Enfin, la problématique était de déterminer si un prélèvement cytologique unique, réalisé au niveau du corps utérin, était représentatif du statut inflammatoire du tractus génital et/ou de l'état de contamination bactérienne.

A. Description des populations cellulaires présentes sur les frottis génitaux

Publications et travaux associés

Thèse de Doctorat Vétérinaire (encadrement)

- Daragon B. (en préparation ; soutenance prévue au second semestre 2011) *Homogénéité de l'inflammation cytologique génitale chez la vache. Etudes in vivo et ex vivo*. Thèse Méd. Vét., Alfort.

L'inflammation génitale post-partum évaluée par l'examen cytologique

Description de la population cellulaire sur les frottis cytologiques

La composition cellulaire des frottis endométriaux bovins n'a jamais été clairement décrite dans la littérature. Une incertitude demeure concernant la population cellulaire comptée, le terme de cellule polymorphonucléaire (PMN), pourtant largement employé, désignant parfois des neutrophiles [117,118] ou l'association de neutrophiles, macrophages et lymphocytes [4,45,50].

L'examen cytologique endocervical étant d'utilisation récente et jusqu'à maintenant proposé par une seule équipe de recherche [100], la description de la population cellulaire rencontrée lors d'un frottis de l'endocol nécessite d'être décrite avec précision et comparée avec l'examen cytologique du corps utérin, plus couramment mis en œuvre depuis 2004.

L'objectif de cette étude était donc de décrire la population cellulaire (et l'éventuelle contamination par des éléments non cellulaires) présente sur un frottis de l'épithélium superficiel. Les compositions des lames issues des deux types de prélèvements (endométrial et endocervical) ont été confrontées de façon qualitative et quantitative.

1. Protocole

Des vaches Prim'Holstein (n = 168) issues de trois élevages de la région parisienne ont été recrutées pour cette étude. Les prélèvements cytologiques endocervicaux et endométriaux ont été réalisés entre 21 et 60 jours post-partum (JPP), par une cytobrosse (Cytobrush® Plus GT, Medscand® medical). Un dosage de la progestéronémie a été effectué le jour de l'examen cytologique.

Les proportions des différentes sous-populations leucocytaires (*i.e.*, granulocytes neutrophiles, éosinophiles, basophiles, lymphocytes-plasmocytes et monocytes-macrophages) ont été calculés sur la base des 200 cellules comptées par frottis au microscope à immersion (1000 x).

2. Résultats

2.1. Cytologie endométriale

2.1.1. Evaluation qualitative

Nous distinguons deux types de frottis cytologiques, selon la proportion de leucocytes présente sur la lame. Le premier type se caractérisait par une infiltration leucocytaire très faible, ou absente (moins d'une dizaine de leucocytes par lame). Les cellules épithéliales, rondes ou elliptiques, de diamètre de 20 à 50 µm et de noyau à chromatine réticulée, pouvaient se rencontrer isolées, ou au contraire en amas ou nid d'abeille. Elles apparaissaient alors de contour

Figure 15 : Cellules épithéliales à mucus d'un frottis endométrial : cellule polarisée, avec présence de grains de mucus au pôle apical (grossissement 1000 x, coloration May-Grünwald-Giemsa) ; (Deguillaume).

Les flèches délimitent les contours de la cellule d'intérêt.

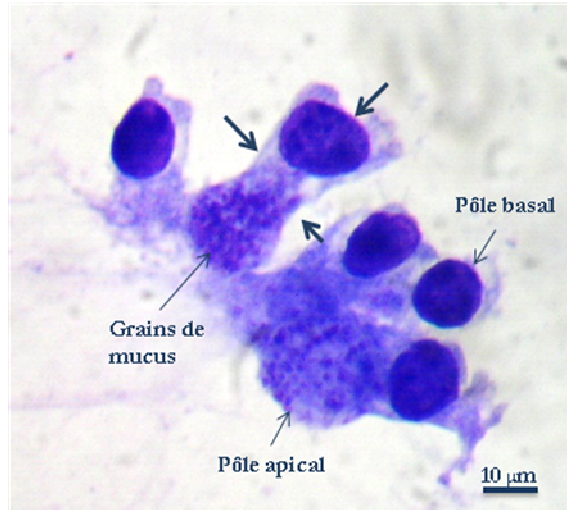
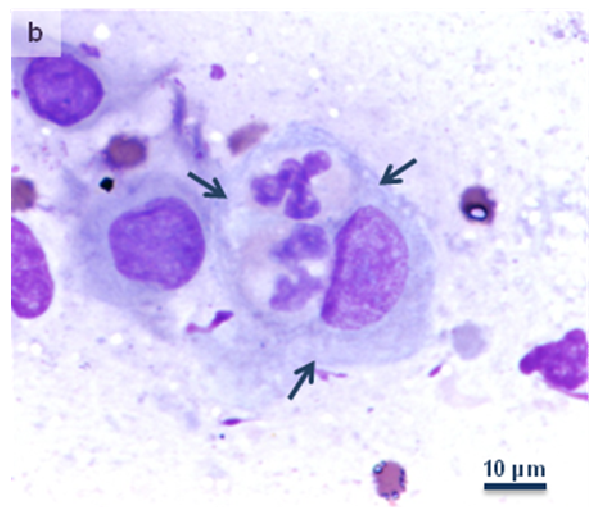
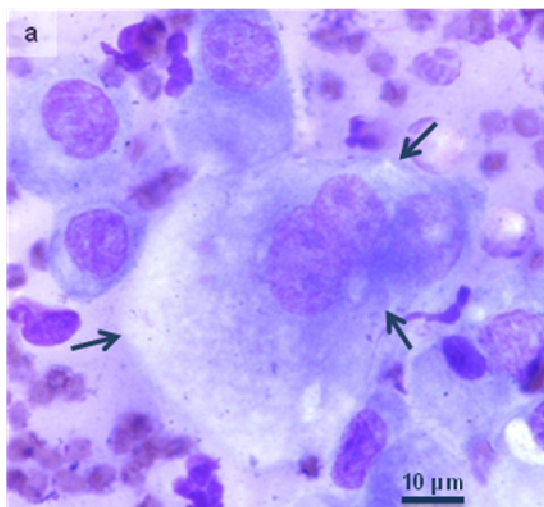


Figure 16 : Population cellulaire observée lors d'infiltration leucocytaire importante d'un frottis endométrial (grossissement 1000 x, coloration May-Grünwald-Giemsa) ; (Service de Biochimie, ENVT).

- a. Cellule épithéliale hyperplasique trinuéclée
- b. Cellule épithéliale macrophagique

Les flèches délimitent les contours de la cellule d'intérêt.



L'inflammation génitale post-partum évaluée par l'examen cytologique

Description de la population cellulaire sur les frottis cytologiques

cytoplasmique polyédrique. Certaines étaient nettement polarisées, avec la présence de grains de mucus au pôle apical (figure 15). Occasionnellement, des érythrocytes étaient observés, en quantité très variable, jusqu'à gêner parfois la lecture de la lame. Étaient occasionnellement retrouvés d'autres composants cellulaires ou acellulaires, tels que des squames de contamination fécale (identifiés par la présence de grains de mélanine dans leur cytoplasme basophile), des cellules végétales (présence de stomates) et des bulles de graisse (dues à la lubrification des gants du manipulateur à l'aide d'huile de paraffine).

La deuxième catégorie de frottis se caractérisait par une infiltration leucocytaire plus importante. Les granulocytes neutrophiles en constituaient la population prédominante. En cas d'inflammation sévère, des formes immatures non segmentées (neutrophiles à noyau non segmenté, de contenu chromatinien moins dense et généralement en forme de fer à cheval), des neutrophiles dégénérés (perte de la lobulation nucléaire, gonflement du cytoplasme), ainsi que des cellules épithéliales hyperplasiques ou à activité macrophagique, étaient observés (figure 16). Il était également possible d'identifier des bactéries libres ou phagocytées (figure 13), des champignons ou des débris cellulaires. Le fond de la lame pouvait alors prendre une coloration foncée qui altérait la lecture du frottis.

2.1.2. Evaluation quantitative

Les leucocytes étaient absents de près de 10% des frottis endométriaux. Lorsque les leucocytes étaient présents, les neutrophiles en constituaient la population prédominante. La médiane (écart interquartile, EIQ) du taux de neutrophiles (*i.e.*, nombre de neutrophiles parmi les 200 cellules dénombrées, %N) était de 4% (1 – 12%), contre des médianes (EIQ) de 1% (0 – 2%), 0% (0 – 1%) et 0% (0 – 0%) ; $P < 0,01$) pour les taux de lymphocytes, monocytes et granulocytes éosinophiles, respectivement. Les granulocytes basophiles étaient absents de la totalité des lames. La concordance entre les différentes proportions de sous-populations leucocytaires était médiocre (tableau 4). Seul le taux de neutrophiles était fortement associé au taux de leucocytes totaux ($\rho_c = 0,98$; tableau 4). Les neutrophiles représentaient en médiane (EIQ) 85% (53 – 96%) des leucocytes totaux. Dans notre échantillon, 61% des vaches présentaient un taux de neutrophiles $\leq 5\%N$ et seulement 13% des individus une inflammation endométriale sévère ($< 40\%N$; figure 17). Les fortes proportions de neutrophiles étaient plus fréquemment observées chez les vaches prélevées avant 35 JPP ($n = 93$). Leurs taux de neutrophiles étaient d'ailleurs supérieurs (médiane, 5% ; EIQ, 1 – 25%) à ceux des vaches prélevées au-delà de 35 JPP ($n = 75$; médiane, 3% ; EIQ, 1 – 6% ; $P < 0,01$).

Tableau 4 : Concordance (coefficients de Lin [intervalle de confiance à 95%]) entre les différentes sous-populations leucocytaires endométriales (n = 168).

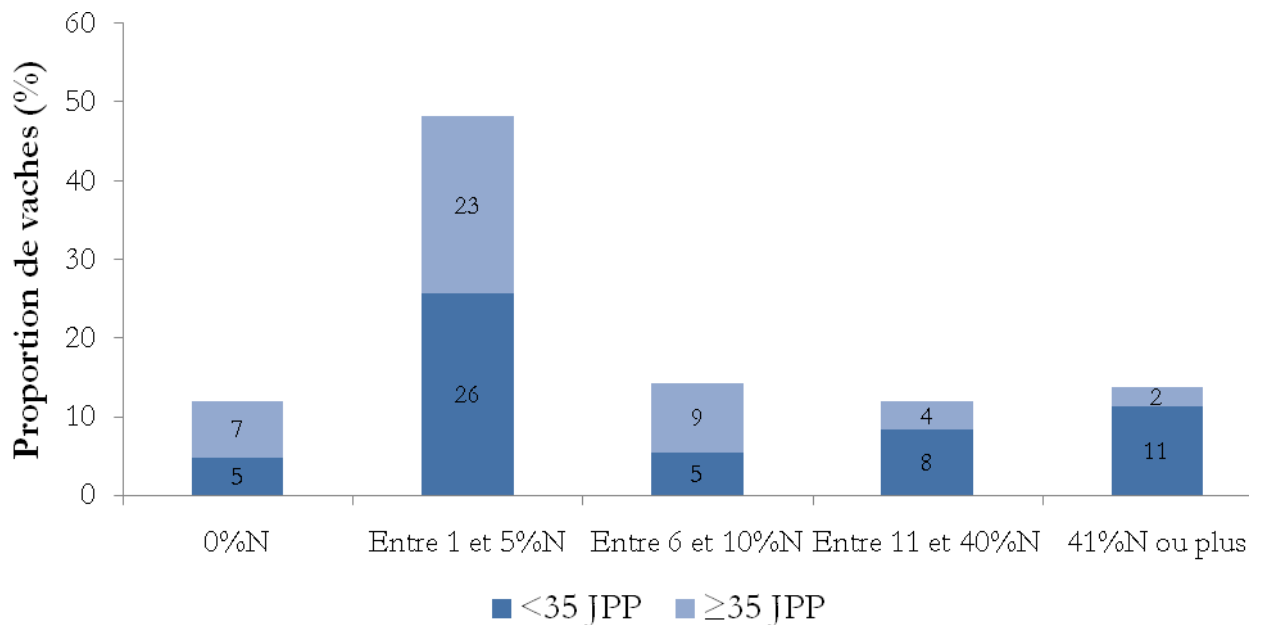
%LC : taux de leucocytes ; %N : taux de neutrophiles ; %E : taux d'éosinophiles ; %LP : taux de lymphocytes ; %MN : taux de monocytes

	% LC	% N	% E	% LP	% MN
% LC	1				
% N	0,98 [0,98 ; 0,99]	1			
% E	0 [0 ; 0]	0 [0 ; 0]	1		
% LP	0,02 [0 ; 0,05]	0,01 [-0,01 ; 0,03]	0,04 [0,02 ; 0,07]	1	
% MN	0,03 [0,01 ; 0,05]	0,02 [-0,01 ; 0,04]	0,01 [-0,02 ; 0,04]	0,10 [-0,04 ; 0,24]	1

Figure 17 : Distribution des taux de neutrophiles endométriaux en fonction du délai post-partum (< 35 JPP, n = 93 ; ≥ 35 JPP, n= 75).

%N : taux de neutrophiles

JPP : jours post-partum



L'inflammation génitale post-partum évaluée par l'examen cytologique

Description de la population cellulaire sur les frottis cytologiques

Lorsque la contamination sanguine était absente ou très modérée (de [-] à [+]), la médiane (EIQ) du taux de lymphocytes était de 1% (0 – 2%), alors qu'elle était de 3% (1 – 4% ; $P < 0,01$) lorsque des érythrocytes étaient observés en grande quantité sur la lame (de [++] à [++++]). La contamination entraînait également une modification de la médiane du %N utérins (médiane, 2% ; EIQ, 1 – 5%, pour [-] ou [+] de contamination sanguine, *vs.* médiane, 4% ; EIQ, 3 – 8%, en présence de contamination sanguine de [++] à [++++] ; $P < 0,05$). Le taux de monocytes n'était en revanche pas affecté par la présence d'érythrocytes.

La contamination bactérienne avait une forte influence sur le %N (médiane, 3% ; EIQ, 1 – 6%, en l'absence de bactéries libres sur le frottis, *vs.* médiane, 5% ; EIQ, 2 – 23%, en présence de bactéries libres ; $P < 0,01$). La proportion de neutrophiles était également affectée par la présence de bactéries phagocytées (médiane, 3% ; EIQ, 1 – 8%, en l'absence, *vs.* médiane, 48% ; EIQ, 26 – 73%, en présence de bactéries intracellulaires ; $P < 0,01$). Les proportions de monocytes et de lymphocytes n'étaient pas liées à la présence de bactéries libres, ni phagocytées.

Le taux de neutrophiles endométriaux n'était pas associé à l'imprégnation progestéronique (médiane, 4% ; EIQ, 1 – 22% pour $P4 < 1$ ng/ml, *vs.* médiane, 4% ; EIQ, 1 – 12% pour $P4 \geq 1$ ng/ml ; $P = 0,34$).

2.2. Cytologie endocervicale

2.2.1. Evaluation qualitative

Les frottis endocervicaux étaient constitués des mêmes composants cellulaires et acellulaires que les frottis endométriaux. Les cellules épithéliales de l'endomètre utérin n'étaient pas distinguables de celles de la muqueuse endocervicale. Des travées éosinophiles tapissaient parfois le fond de la lame lors de la présence d'un mucus cervical abondant.

2.2.2. Evaluation quantitative

Les médianes (EIQ) des taux de neutrophiles, lymphocytes, monocytes et éosinophiles étaient de 2% (0 – 7%), 0% (0 – 1%), 0% (0 – 0%), 0% (0 – 0%), respectivement. La médiane du taux de leucocytes cervical des 168 frottis analysés (2% ; EIQ, 0 – 8%) était inférieure à celle du taux de leucocytes utérins des prélèvements correspondants (médiane, 6% ; EIQ, 2 – 15% ; $P < 0,01$). Les neutrophiles constituaient en médiane (EIQ) 100% (89 – 100%) des leucocytes totaux. Hormis le taux de neutrophiles, fortement associé au taux de leucocytes totaux ($Q_c = 0,99$), la concordance des proportions des différentes sous-populations leucocytaires était médiocre (tableau 5). Le %N variait entre 0 et 92%, avec près des trois quart des frottis dont le

Tableau 5 : Concordance (coefficients de Lin [intervalle de confiance à 95%]) entre les différentes sous-populations leucocytaires endocervicales (n = 168).

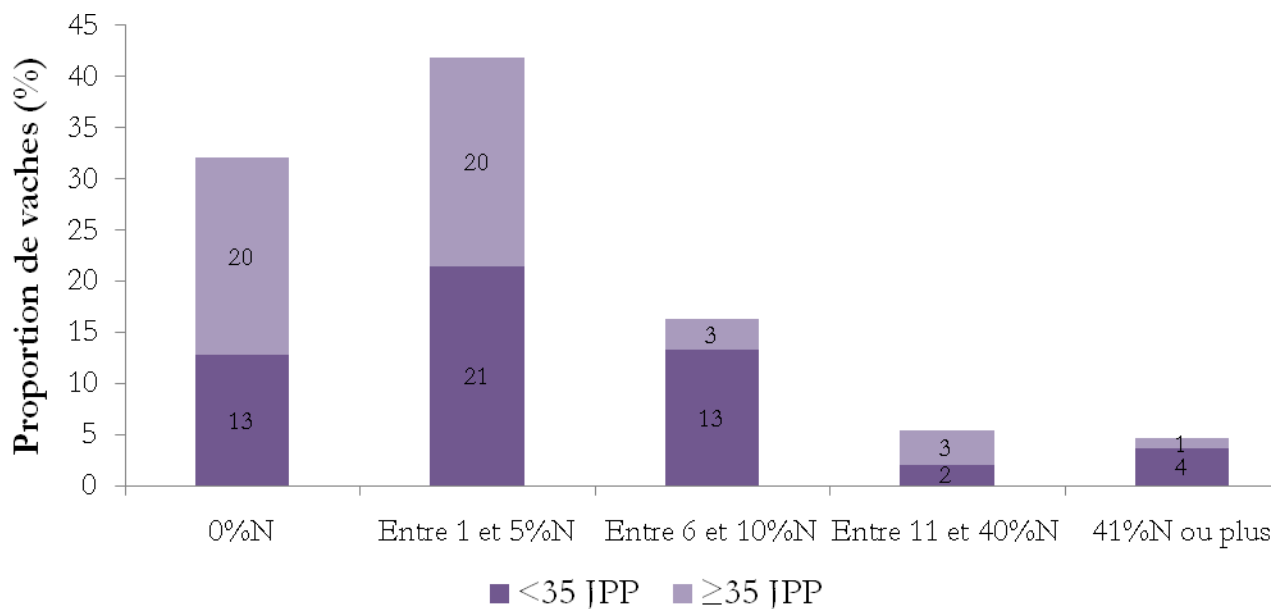
%LC : taux de leucocytes ; %N : taux de neutrophiles ; %E : taux d'éosinophiles ; %LP : taux de lymphocytes ; %MN : taux de monocytes

	% LC	% N	% E	% LP	% MP
% LC	1				
% N	0,99 [0,99 ; 0,99]	1			
% E	0,01 [0 ; 0,01]	0 [0 ; 0,01]	1		
% LP	0,03 [0,02 ; 0,05]	0,03 [0,02 ; 0,04]	0,46 [0,36 ; 0,55]	1	
% MP	0,04 [0,02 ; 0,06]	0,03 [0,01 ; 0,05]	0,04 [-0,04 ; 0,13]	0,06 [-0,07 ; 0,20]	1

Figure 18 : Distribution des taux de neutrophiles endocervicaux en fonction du délai post-partum (< 35 JPP, n = 93 ; ≥ 35 JPP, n= 75).

%N : taux de neutrophiles

JPP : jours post-partum



L'inflammation génitale post-partum évaluée par l'examen cytologique

Description de la population cellulaire sur les frottis cytologiques

%N endocervicaux était inférieur ou égal à 5% (figure 18). Les vaches examinées avant 35 JPP (n = 93) présentaient un %N (médiane, 2,5% ; EIQ, 1 – 16%) supérieur à celui des vaches examinées au-delà de 35 JPP (n= 75 ; médiane, 0,5%, EIQ, 0 – 3% ; $P < 0,01$). Les granulocytes neutrophiles étaient absents de 33% des frottis endocervicaux (13% avant 35 JPP, *vs.* 20% après 35 JPP ; figure 18).

L'identification d'érythrocytes sur le frottis affectait la médiane des taux de monocytes, lymphocytes et particulièrement du %N (médiane, 1%N ; EIQ, 0 – 6%N en l'absence d'érythrocytes, *vs.* médiane, 39%N ; EIQ, 4 – 66%N en présence d'une contamination sanguine de la lame ; $P < 0,01$).

Le %N était supérieur lorsque des bactéries libres ou intracellulaires étaient isolées (médiane, 2%N ; EIQ, 1 – 13%N ; médiane, 18%N ; EIQ, 14 – 34%N, lors d'identification de bactéries libres ou phagocytées, respectivement), que lorsqu'elles étaient absentes (médiane, 1%N ; EIQ, 0 – 5%N ; $P < 0,01$). Les proportions de monocytes et de lymphocytes n'étaient pas liées à la présence de bactéries.

Le taux de neutrophiles endocervicaux n'était pas associé à l'imprégnation progestéronique (médiane, 2% ; EIQ, 0 – 9% pour $P4 < 1\text{ng/ml}$, *vs.* médiane, 2% ; EIQ, 1 – 14% pour $P4 \geq 1\text{ng/ml}$; $P = 0,91$).

3. Discussion

La constitution cellulaire des frottis endométriaux était semblable à celle des frottis endocervicaux. Les prélèvements de notre étude étaient réalisés au niveau du deuxième anneau du col. Ahmadi *et al.* [100] sont les seuls à avoir comparé la composition des frottis endocervicaux et endométriaux. La composition cellulaire de ces deux types de frottis (cellules épithéliales, neutrophiles, macrophages et lymphocytes) semblait également identique. Chez la plupart des mammifères, seule la partie externe du col (*i.e.*, l'orifice postérieur du col) est composée d'un épithélium squameux, similaire à celui qui tapisse le vagin. Le reste du canal cervical (dont le deuxième anneau) et l'orifice antérieur du col sont constitués d'un simple épithélium unistratifié, semblable à celui de l'endomètre [119].

Dans notre étude, les neutrophiles ont constitué la population leucocytaire dominante des frottis génitaux. Des lymphocytes et monocytes étaient parfois retrouvés, alors que les granulocytes éosinophiles et basophiles étaient quasi-absents de toutes les lames. Pour Ahmadi *et al.* [100], les neutrophiles constituaient $86 \pm 1\%$ des leucocytes endocervicaux et $90 \pm 1\%$ des leucocytes endométriaux.

L'inflammation génitale post-partum évaluée par l'examen cytologique

Description de la population cellulaire sur les frottis cytologiques

La concordance entre les proportions des différentes sous-populations leucocytaires était médiocre. Seule la proportion de neutrophiles était fortement associée à celle des leucocytes totaux. Cette observation suggère que les taux de neutrophiles ou de leucocytes totaux peuvent être utilisés indifféremment pour caractériser le statut inflammatoire. Les neutrophiles constituent la population cellulaire majeure qui afflue dans la muqueuse lors de processus inflammatoire. Ceci est cohérent avec les observations de Chapwanya *et al.* [10] qui ont suivi l'expression moléculaire de marqueurs des cellules hématopoïétiques, notamment des neutrophiles (CD45) et des cellules myéloïdes (CD14). Lors d'inflammation histologique de l'utérus post-partum, une augmentation de l'expression du gène codant pour la protéine CD45 signale un afflux de leucocytes dans l'utérus, majoritairement sous forme de neutrophiles. L'expression de CD14 n'étant pas significativement différente selon les niveaux d'inflammation, l'afflux de monocytes n'est pas une caractéristique de l'inflammation endométriale.

La présence d'érythrocytes en grande quantité sur la lame était associée à une augmentation du taux de neutrophiles, ainsi que du taux de lymphocytes et parfois de monocytes. L'infiltration de la muqueuse par des cellules sanguines provenant de la circulation générale peut justifier l'identification de lymphocytes, composant leucocytaire majoritaire de la formule sanguine des bovins [40]. La présence de neutrophiles pourrait s'expliquer par une contamination sanguine accrue ou une fragilisation de la muqueuse en cas d'endométrite ou de cervicite. La phase du cycle œstral et notamment l'œstrus peuvent être à l'origine d'une hyperhémie et d'une plus grande fragilité capillaire [119]. Mais contrairement aux résultats d'Ahmadi *et al.* [120], la phase lutéale n'était ici pas associée à une modification de la proportion de neutrophiles.

L'identification de bactéries sur le frottis, sans permettre la datation précise de la contamination initiale, est informative du développement du processus inflammatoire. A l'objectif à immersion (1000 x), une contamination bactérienne du prélèvement (contamination fécale de la cytobrosse ou de la lame de microscope) apparaît sous la forme de colonies hétérogènes et localisées à certains endroits de la lame. Lorsque les bactéries sont présentes dans l'épithélium et prélevées lors du frottis, on obtient une coloration bleutée, une population bactérienne homogène répartie sur la totalité de la surface du frottis, sur laquelle la mise au point est possible. En présence de bactéries, la population neutrophile, première ligne de défense de l'utérus [12,18,121], est sollicitée. La médiane du %N était supérieure lors d'identification de bactéries (libres ou intracytoplasmiques) à celle de frottis dénués de toute contamination bactérienne. Notons cependant qu'il est difficile de distinguer un processus inflammatoire aigu d'un processus chronique, les frottis étant caractérisés dans les deux cas par la présence de

L'inflammation génitale post-partum évaluée par l'examen cytologique

Description de la population cellulaire sur les frottis cytologiques

neutrophiles, de plages bactériennes et de cellules épithéliales de contours altérés [119]. Seules les formes immatures de neutrophiles, non segmentées, apparaissent parfois en cas de très forte infiltration ($\geq 50\%N$ sur le frottis) et signalent une recrudescence du recrutement des granulocytes neutrophiles pour faire face à une contamination bactérienne importante [40].

De composition similaire, les frottis endométriaux et endocervicaux se caractérisent en cas de processus inflammatoire par une infiltration de granulocytes neutrophiles plus ou moins marquée. Ce composant majeur de l'immunité innée bovine est utilisé dans le reste notre travail pour définir l'inflammation génitale post-partum, par le calcul d'un taux de neutrophiles (*i.e.*, nombre de neutrophiles parmi les 200 cellules dénombrées).

Nous avons ensuite cherché à déterminer si l'évaluation quantitative du %N était fiable par le calcul des variabilités inter- et intra-opérateurs et enfin quel était son lien avec l'isolement bactérien.

B. Variabilité des résultats de lecture des frottis génitaux

Dans l'évaluation de la santé de l'utérus chez les bovins, l'examen cytologique repose sur un comptage différentiel de la population de cellules inflammatoires infiltrées dans la partie superficielle de l'épithélium endométrial [4,121]. Le comptage manuel, par rapport à l'utilisation d'automates, présente l'avantage d'identifier toutes les catégories cellulaires, autres que les cellules normalement retrouvées dans l'épithélium (tels que les formes immatures de neutrophiles, les érythrocytes, les mélanocytes et les cellules épithéliales agranulaires, granuleuses ou squameuses). Il est cependant nécessaire d'évaluer la fiabilité de ce comptage manuel.

Dans l'optique d'une utilisation diagnostique des frottis génitaux, nous avons apprécié la variabilité du résultat de lecture lors d'un comptage différentiel manuel d'un frottis cytologique génital, par analyse de la concordance entre deux opérateurs (variabilité inter-opérateur) et de la répétabilité de lecture chez un même opérateur (variabilité intra-opérateur).

1. Variabilité inter-opérateur

1.1. Protocole

Des frottis endométriaux (n = 154) et endocervicaux (n = 168) réalisés chez des vaches prélevées entre 21 et 60 JPP, ont été lus par deux opérateurs (désignés dans la suite du texte par leurs initiales, AG et LD). Soixante quatorze frottis utérins et 79 frottis endocervicaux provenaient de vaches entre 21 et 35 JPP.

Chaque opérateur comptait manuellement un total de 200 cellules par frottis, afin de calculer le taux de neutrophiles. Les deux opérateurs lisaient successivement les mêmes lames, à l'aveugle des résultats de la lecture de l'autre opérateur.

La comparaison des %N des deux séries de lectures a été analysée par le calcul du coefficient de concordance de Lin. La variable d'intérêt (%N) a ensuite été classée qualitativement en fonction d'un seuil de 6%N pour l'utérus et de 5%N pour le col, pour les vaches prélevées avant 35 JPP. Ces valeurs définissent l'inflammation pathologique, c'est-à-dire les seuils à partir desquels les performances de reproduction sont dégradées (se reporter au II.A.). Au-delà de 6%N sur le frottis endométrial, les vaches étaient considérées atteintes d'endométrite et au-delà de 5%N sur le frottis cervical, de cervicite. La concordance du diagnostic des deux opérateurs a été évaluée par le calcul du coefficient kappa.

1.2. Résultats

1.2.1. Cytologie endométriale

Pour les 154 frottis, les médianes (EIQ) des %N des opérateurs AG et LD étaient de 4% (1 – 9%) et 2% (1 – 8%), respectivement. Le coefficient de concordance de Lin était de valeur $\rho_c = 0,91$ (IC95% ; 0,89 – 0,94).

Parmi les 74 vaches prélevées avant 35 JPP, 45% des animaux présentaient un taux de neutrophiles $\geq 6\%$ chez AG, contre 41% chez l'opérateur LD. Six frottis $\geq 6\%N$ chez AG étaient comptés à moins de 6%N chez LD. Le coefficient de concordance kappa pour ces 74 frottis était $\kappa = 0,75$.

1.2.2. Cytologie endocervicale

Les médianes (EIQ) des taux de neutrophiles chez AG et LD (n = 168) étaient de 0% (0 – 4%) et 1% (0 – 6%), respectivement. Le coefficient de concordance de Lin était de valeur $\rho_c = 0,85$ (IC95% ; 0,81 – 0,89).

Parmi les 79 vaches prélevées avant 35 JPP, 37% des vaches présentaient un taux de neutrophiles $\geq 5\%$ chez l'opérateur AG, contre 33% chez LD. Le coefficient de concordance kappa était $\kappa = 0,75$.

2. Variabilité intra-opérateur

2.1. Protocole

Le calcul de la variabilité intra-opérateur a été réalisé après double lecture de 45 lames (23 frottis endométriaux et 22 endocervicaux) par un même individu. Parmi ces 45 lames, 21 (10 frottis endométriaux et 11 endocervicaux) provenaient de vaches prélevées entre 21 et 35 JPP.

Le coefficient de Lin mesurait la concordance entre les deux lectures. La concordance de diagnostic entre les deux lectures, après classement du taux de neutrophiles qualitativement (aux seuils de 6 et 5% pour les frottis endométriaux et endocervicaux respectivement), a été évaluée par le calcul du coefficient kappa.

2.2. Résultats

Pour les frottis endométriaux, la médiane (EIQ) du %N de la première lecture était de 12% (0 – 33%). Celle de la deuxième lecture fut de 13% (2 – 32%). Un coefficient de Lin de valeur $\rho_c = 0,88$ (IC95% ; 0,80 – 0,97) a été obtenu.

Parmi les 10 vaches prélevées entre 21 et 35 JPP, cinq présentaient un taux de neutrophiles supérieur à 6% lors de la première lecture, contre six lors de la deuxième lecture. Le coefficient de concordance kappa était de $\kappa = 0,80$.

Pour les frottis endocervicaux, les médianes (EIQ) de la première et deuxième lecture étaient respectivement de 2% (1 – 9%) et de 2% (1 – 10%). Le coefficient de Lin avait pour valeur $\rho_c = 0,95$ (IC95% ; 0,92 – 0,98).

Chez les vaches prélevées entre 21 et 35 JPP, quatre présentaient un taux de neutrophiles supérieur à 5% quelque soit le numéro de lecture. La concordance était de $\kappa = 1$.

3. Discussion

La littérature équine et bovine propose deux modes de lecture des frottis cytologiques, qualitative ou quantitative. Santos *et al.* [73] ont proposé une évaluation ordinale subjective de l'inflammation utérine selon quatre catégories : le score de zéro désignait l'absence d'inflammation et celui de trois, une inflammation importante. Parallèlement à cette classification, un deuxième opérateur dénombrait 200 cellules par lame selon leur type morphologique. La corrélation entre les évaluations ordinales et quantitative était forte ($r^2 = 0,96$; $P < 0,01$). Les erreurs de classement concernaient principalement les groupes à inflammation faible ou absente. Le diagnostic d'inflammation génitale reposant sur une faible infiltration de la muqueuse par des neutrophiles (la proportion est de 6%N pour l'utérus et de 5% pour le col ; se reporter à la partie II.A. des résultats ; [45,60]), nous avons donc privilégié dans ce travail une évaluation quantitative du taux de neutrophiles.

Dans un souci de précision, pour chaque frottis, 200 cellules ont été comptées à l'objectif à immersion (1000 x), beaucoup d'études se limitant à l'identification de 100 cellules au grossissement 400 x [4,60,117,120]. Notre but était de limiter la variabilité intra-opérateur. En médecine humaine, Roussel *et al.* [122] proposent jusqu'à un comptage de 400 cellules par lame, pour améliorer la précision d'une numération-formule sanguine. Dans notre cas, la première appréciation de la lame au faible grossissement a révélé des frottis d'homogénéité variable, tant

L'inflammation génitale post-partum évaluée par l'examen cytologique

Variabilité des résultats de lecture des frottis génitaux

sur la concentration en cellules épithéliales (de quelques cellules isolées à des amas en nid d'abeille), que sur l'infiltration de cellules inflammatoires, parfois localisée en une zone particulière du frottis. Le coefficient de concordance de Lin a indiqué une variabilité intra-opérateur faible, équivalente à celle obtenue par Barlund *et al.* [60] sur des frottis endométriaux bovins ($\rho_c = 0,85$, suite au comptage de 100 cellules par lame).

La reproductibilité de la mesure entre deux opérateurs (variabilité inter-opérateur) était bonne, avec un coefficient de concordance de Lin révélateur d'une forte liaison entre les deux comptages numériques. Le coefficient kappa a confirmé la bonne concordance du diagnostic final annoncée par Gilbert *et al.* [45] pour un prélèvement cytologique endométrial ($\kappa = 0,86$; au seuil de 15%N).

Nos observations montrent que le résultat de la lecture d'un frottis cytologique post-partum est fiable, tant sur la variabilité inter- qu'intra-opérateur. Outre le comptage d'un total de 200 cellules par lame, l'identification de seulement cinq catégories cellulaires (neutrophiles, éosinophiles, lymphocytes, monocytes et cellules épithéliales) y a probablement contribué. En effet, Koepke *et al.* [123] ont montré une bonne concordance de lecture de frottis sanguins entre 73 techniciens et un référent lorsque l'identification portait sur une population cellulaire normale (neutrophiles, lymphocytes et éosinophiles). Une augmentation de la variabilité était notée dans l'identification de formes immatures de neutrophiles et de variants atypiques de lymphocytes et de monocytes. Dans notre étude, les composants cellulaires et acellulaires atypiques ont été signalés qualitativement pour ne pas diminuer la précision de la lecture. D'autre part, les erreurs de comptage des sous-populations leucocytaires ont été enrayerées par la définition du statut inflammatoire reposant sur la seule proportion de neutrophiles parmi la population cellulaire totale comptée.

Ces deux études ont permis de valider le comptage manuel pour l'estimation de la proportion de neutrophiles lors d'un frottis génital chez la vache. Il est nécessaire maintenant d'évaluer l'homogénéité du statut inflammatoire au sein du tractus génital bovin.

C. Variabilité liée au site de prélèvement

Publications et travaux associés

Thèse de Doctorat Vétérinaire (encadrement)

- Daragon B. (en préparation ; soutenance prévue au second semestre 2011) *Homogénéité de l'inflammation cytologique génitale chez la vache. Etudes in vivo et ex vivo*. Thèse Méd. Vét., Alfort.

L'examen cytologique endométrial est proposé chez les bovins pour évaluer la santé de l'utérus. Le prélèvement réalisé à l'aide d'une cytobrosse ne collecte cependant des cellules que sur une zone très localisée de l'endomètre, dans le corps utérin, à la base des cornes. Nous avons donc cherché à savoir si un tel prélèvement unique du corps utérin par une cytobrosse était représentatif du statut inflammatoire de l'ensemble de l'utérus.

L'objectif était d'évaluer l'homogénéité de l'inflammation dans les différents secteurs de l'utérus, à savoir le corps utérin et chacune des cornes. Nous avons également examiné l'état inflammatoire du canal cervical. Pour cela, deux approches ont été associées, l'une à partir d'appareils génitaux d'abattoir (étude *ex vivo*), la seconde chez des vaches vivantes (étude *in vivo*).

1. Etude *ex vivo*

1.1. Protocole

Cent un utérus ont été collectés immédiatement après abattage. Aucune donnée individuelle concernant l'animal (race, parité, note d'état corporel, production laitière, délai post-partum) n'était disponible. Après ouverture délicate à l'aide d'une lame de scalpel en regard du site d'intérêt, une cytobrosse non stérile était appliquée contre la muqueuse et tournée afin de collecter des cellules. Quatre prélèvements étaient réalisés par appareil génital : dans la partie moyenne de chaque corne utérine (au bord anti-mésométrial), dans le corps utérin et au niveau du deuxième anneau cervical (figure 12).

Après étalement de la cytobrosse et coloration, les frottis étaient lus par un unique opérateur. Le taux de neutrophiles parmi les 200 cellules comptées était calculé pour chaque site de prélèvement. Les médianes d'inflammation ont été comparées par le test de Kruskal-Wallis. Les %N des différents sites de prélèvement ont été analysés par le calcul du coefficient de concordance de Lin.

1.2. Résultats

Sur les 101 utérus prélevés, les médianes (EIQ) d'inflammation étaient de 0%N (0 – 1%N), 0%N (0 – 0%N), 0%N (0 – 0%N) et 0%N (0 – 1%N) pour les prélèvements de la corne droite, gauche, du corps et du col, respectivement ($P < 0,05$). Cinquante quatre utérus présentaient une inflammation nulle aux quatre sites de prélèvement.

Les coefficients de concordance de Lin des différents sites sont présentés en tableau 6. La corrélation entre les deux cornes utérines était médiocre ($Q_c = 0,68$). Celle du corps et de chacune

L'inflammation génitale post-partum évaluée par l'examen cytologique
 Variabilité liée au site de prélèvement

Tableau 6 : Concordance (coefficients de Lin [intervalle de confiance à 95%]) entre les différents sites de prélèvement d'utérus d'abattoir (n = 101).

	Corne droite	Corne gauche	Corps	Col
Corne droite	1			
Corne gauche	0,68 [0,47 - 089]	1		
Corps	0,71 [0,53 - 0,87]	0,80 [0,66 - 0,94]	1	
Col	0,60 [0,36 - 0,84]	0,50 [0,21 - 0,79]	0,61 [0,36 -0,86]	1

Tableau 7 : Répartition des animaux selon les états pathologiques inflammatoires du col (cervicite) et du corps utérin (endométrite) ; (n = 200).

%N : taux de neutrophiles

Les seuils de 6%N pour l'utérus et de 5%N pour le col définissent l'inflammation pathologique, c'est-à-dire la proportion de neutrophiles au-delà de laquelle les performances de reproduction sont dégradées (se reporter à la partie II.A des résultats).

		Cytologie endométriale		Total
		< 6%N	≥ 6%N	
Cytologie endocervicale	< 5%N	67	35	102
	≥ 5%N	20	78	98
Total		87	113	200

des cornes étaient satisfaisantes (corps *vs.* corne gauche, $Q_c = 0,80$; corps *vs.* corne droite, $Q_c = 0,71$). La concordance entre le corps utérin et le deuxième anneau du col était médiocre ($Q_c = 0,61$). Et d'une façon générale, la corrélation entre le col et chacune des cornes était mauvaise (col *vs.* corne droite ; $Q_c = 0,60$ et col *vs.* corne gauche ; $Q_c = 0,50$; tableau 6).

2. Etude *in vivo*

2.1. Protocole

Un prélèvement cytologique endométrial associé à un prélèvement cytologique endocervical a été réalisé chez 745 vaches Prim'Holstein. Parmi les 745 vaches, 200 se trouvaient entre 21 et 35 JPP.

La variabilité entre les deux sites de prélèvement a été analysée par le calcul du coefficient de concordance de Lin. La variable d'intérêt (%N) a ensuite été classée qualitativement en fonction d'un seuil d'inflammation pathologique (*i.e.*, 6%N pour l'utérus et 5%N pour le col pour les vaches prélevées avant 35 JPP ; se reporter au II.A.) Les diagnostics cytologiques ont été comparés à l'aide du coefficient de concordance kappa.

2.2. Résultats

La médiane du taux de neutrophiles endocervical (1%N ; EIQ, 0 – 8%N) était inférieure à celle du prélèvement endométrial (3%N ; EIQ, 0 – 11%N ; $P < 0,01$). Le résultat de l'examen cytologique endométrial était faiblement corrélé à celui de l'examen endocervical ($Q_c = 0,38$; IC95% ; 0,32 - 0,44 ; $n = 745$).

Après classement des %N en variables qualitatives pour les 200 vaches examinées avant 35 JPP, le coefficient kappa était de $\kappa = 0,45$. La répartition des animaux selon la présence ou non d'une inflammation pathologique utérine ou cervicale est présentée en tableau 7. Au total, la prévalence des formes cytologiques d'inflammation (utérine et/ou cervicale) était de 67%. Parmi les vaches atteintes d'endométrite (*i.e.*, $\geq 6\%N$; $n = 113$), 69% présentaient également un frottis cervical positif (*i.e.*, $\geq 5\%N$). Inversement, 79% des vaches à frottis cervical positif présentaient un frottis utérin positif. Mais il est intéressant de constater que parmi les vaches ayant un frottis cervical non inflammé (*i.e.*, $< 5\%N$; $n = 102$), 34% étaient en réalité atteintes d'une inflammation utérine pathologique. Au final, lorsqu'une inflammation d'au moins un compartiment était présente ($n = 133$), une inflammation simultanée des deux compartiments était observée dans seulement 59% des cas ($n = 78$; tableau 7).

3. Discussion

Les deux études *ex vivo* et *in vivo* ont révélé la non homogénéité de l'inflammation dans le tractus génital femelle. La reproductibilité de mesure, qu'elle soit qualitative ou quantitative, entre les différents sites de prélèvement était faible. Néanmoins, il est regrettable que dans l'étude *ex vivo* une majorité d'utérus aient présenté une inflammation nulle en leurs quatre sites de prélèvement, ceci en raison de l'absence de sélection des animaux à l'abattoir, par défaut de traçabilité entre l'utérus et l'animal. Les utérus constituant des sous-produits animaux non destinés à la consommation humaine (matière de catégorie 3), non identifiés comme matériels à risque spécifiés en tant que tissus susceptibles de véhiculer un agent infectieux, ne sont pas soumis à une identification individuelle. Aucune information n'a permis de caractériser les bovins abattus, selon leur race, âge ou motif de réforme. Même si un tri des utérus sur la base de leur taille anatomique était effectué afin d'exclure les tractus génitaux de génisses, notre échantillon a probablement été constitué de jeunes vaches ou de femelles en fin de lactation, très éloignés du moment du vêlage, ce qui a sans doute eu une influence sur la proportion de neutrophiles des frottis [124].

Les coefficients de concordance n'ont pas révélé de forte dépendance entre les quatre sites (col, corps et cornes) anatomiquement et biologiquement proches. Ce résultat est similaire à celui obtenu par Ahmadi *et al.* [115] sur des utérus de brebis. Dans notre étude, la meilleure concordance ($\rho_c = 0,80$) a été obtenue pour l'association entre la corne gauche et le corps utérin, sans explication biologique.

Le prélèvement endocervical a été suggéré comme une alternative au prélèvement du corps utérin [115,116]. Or notre étude *in vivo* montre que la mise en œuvre de la seule cytologie endocervicale était à l'origine du sous-diagnostic de plus d'un tiers des animaux présentant une inflammation utérine $\geq 6\%N$ avant 35 JPP. L'inflammation endocervicale, qu'elle soit considérée quantitativement ou qualitativement par rapport à un seuil pathologique, ne reflète pas de façon fiable le statut inflammatoire utérin. Contrairement à ce qui est décrit chez la jument, les changements inflammatoires (augmentation du $\%N$) qui apparaissent dans le col et dans l'utérus ne sont pas fortement corrélés [119]. Le corps utérin et le col constituent donc chez la vache à un moment donné, deux compartiments distincts du point de vue inflammatoire.

Malgré la difficulté technique du cathétérisme cervical, une évaluation directe du statut inflammatoire du corps de l'utérus est nécessaire. La cytologie endocervicale, si elle est mise en

L'inflammation génitale post-partum évaluée par l'examen cytologique
Variabilité liée au site de prélèvement

œuvre, n'est donc pas à considérer comme le reflet indirect du statut inflammatoire de l'utérus, mais comme un autre indicateur de la santé de l'appareil génital.

Face à l'hétérogénéité de l'inflammation du tractus génital, les deux sites de prélèvement (*i.e.*, le deuxième anneau du col et le corps utérin) ont été conservés dans la suite de notre travail. Un prélèvement plus en amont, au niveau de la partie moyenne des cornes utérines, n'a pas été retenu en raison d'un doute quant à son innocuité. En raison de la faible concordance entre les %N des cornes droite et gauche, il aurait été nécessaire d'introduire un cathéter dans chacune des cornes, augmentant encore le risque de traumatisme.

L'examen cytologique permet donc de caractériser le statut inflammatoire de l'utérus. La question est maintenant de déterminer si l'examen cytologique post-partum est le reflet d'une contamination bactériologique de la lumière utérine.

D. Correspondance entre les examens bactériologique et cytologique

Publications et travaux associés

Articles publiés

- Hanzen C, Theron L, Simon A, **Deguillaume L.** (2009) Infections utérines : définitions, symptômes et diagnostic. *Point Vét.*, **299**, 41-46.
- **Deguillaume L**, Fournier R, Chastant-Maillard S. (2008) Les méthodes de diagnostic des endométrites chez la vache. *Repro Mag*, n°2, Intervet, Beaucouzé, France, 6-8.

Thèse de Doctorat Vétérinaire (réalisation)

- **Deguillaume L.** (2007) *Etude comparative des différentes techniques de diagnostic des métrites chroniques chez la vache.* Thèse Méd. Vét., Alfort, 109p.
Lauréate de la Faculté de Médecine de Créteil, médaille d'argent
Lauréate de l'Académie de Médecine Vétérinaire, médaille d'or.

L'inflammation génitale post-partum évaluée par l'examen cytologique

Correspondance entre les examens bactériologique et cytologique

L'afflux de neutrophiles dans la lumière utérine est la conséquence d'une contamination de l'endomètre au moment du vêlage. La mobilisation de la réponse immunitaire a pour rôle l'élimination des contaminants et le retour de l'utérus à un état stérile.

L'objectif de cette étude était de déterminer la correspondance entre les examens bactériologique et cytologique, plus précisément d'évaluer si la présence d'une inflammation endométriale, mais aussi endocervicale, était associée à l'isolement de germes dans la lumière utérine.

1. Protocole

Pour cela, à chaque prélèvement bactériologique au niveau du corps utérin était associé un examen cytologique endométrial contiguë et un prélèvement endocervical, au niveau du deuxième anneau du col. Afin de caractériser les sécrétions vaginales, un recueil du contenu vaginal a été effectué à l'aide du dispositif Metrichick®. Cent soixante trois vaches ont été examinées entre 21 et 60 JPP.

Les colonies bactériennes isolées étaient hiérarchisées selon la classification de Williams *et al.* [39] en germes pathogènes majeurs, potentiellement pathogènes ou contaminants opportunistes (tableau 1). La densité de croissance bactérienne était évaluée quantitativement (*i.e.*, nombre de colonies isolées) après 48h de mise en culture en conditions aéro- et anaérobies.

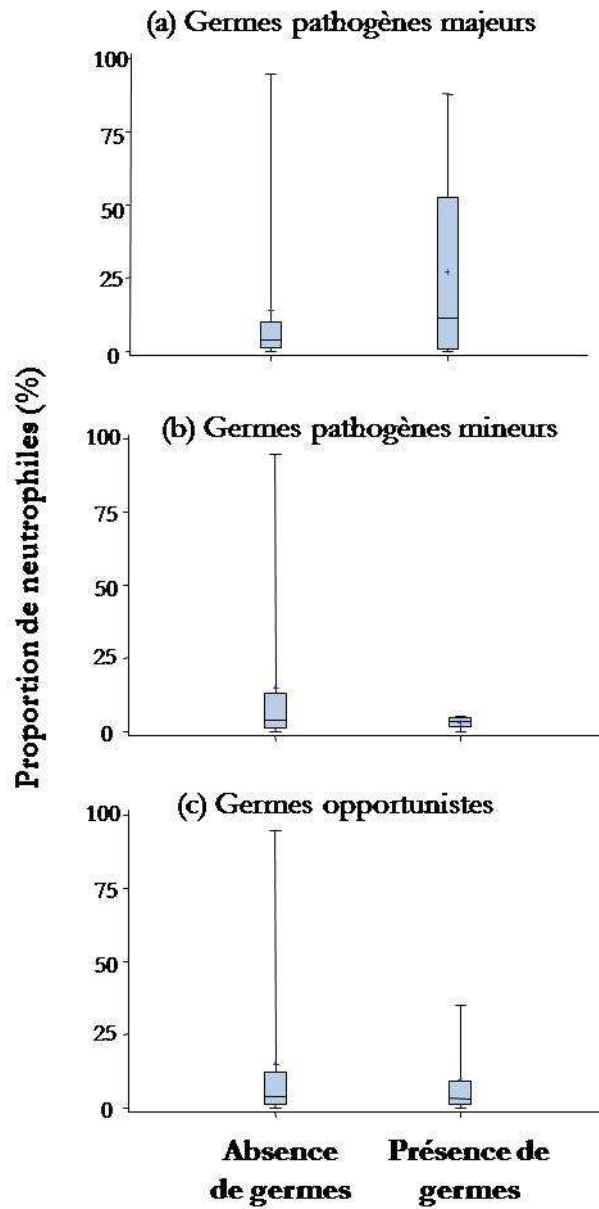
2. Résultats

Sur les 163 prélèvements utérins mis en culture, nous n'avons pas obtenu de croissance bactérienne pour une grande majorité (91%) d'entre eux. Parmi les 15 prélèvements non stériles, nous avons identifié sept utérus contaminés par des pathogènes majeurs, trois par des souches potentiellement pathogènes et trois par des contaminants opportunistes. De plus, deux échantillons associaient deux types de pathogènes (majeurs + opportunistes pour l'un et mineurs + opportunistes pour l'autre).

Les 15 échantillons étaient dans l'ensemble faiblement contaminés après 48 h de mise en culture, le nombre de colonies variait de trois à 500. On comptait en majorité moins de dix colonies ($n = 6$) ou entre 10 et 100 colonies ($n = 7$) par culture. Les pathogènes majeurs le plus souvent rencontrés étaient *Escherichia coli* ($n = 4$) et *Arcanobacterium pyogenes* ($n = 3$).

Figure 19 : Proportion de neutrophiles endométriaux en fonction de la pathogénicité des contaminants utérins (n = 163).

La barre horizontale des boîtes à moustaches correspond à la médiane, le rectangle à la dispersion centrale des valeurs entre les quartiles supérieur et inférieur et l'axe vertical représente la dispersion de 95% des valeurs



L'inflammation génitale post-partum évaluée par l'examen cytologique

Correspondance entre les examens bactériologique et cytologique

Staphylococcus aureus a été isolé dans trois cas de contamination par des germes potentiellement pathogènes.

Nous avons ensuite examiné la relation entre l'inflammation endométriale et l'isolement bactérien. Quarante deux pourcent des cas d'inflammation endométriale non nulle ($> 0\%N$) et 36% des cas d'inflammation endométriale pathologique ($\geq 6\%N$) n'ont donné lieu à aucune croissance bactérienne. En cas d'inflammation utérine grave ($\geq 30\%N$; $n = 26$), 85% des écouvillons utérins n'ont pas généré de culture positive.

Inversement, parmi les 19 cas d'inflammation utérine nulle, nous obtenions quatre cultures positives, dont deux contaminées par des pathogènes majeurs (*E. coli*; < 5 colonies), une par des germes potentiellement pathogènes (*Staphylococcus aureus*; 7 colonies) et une par des contaminants opportunistes (*Aerococcus sp.*; 12 colonies).

Pour les 15 prélèvements contaminés, la médiane (EIQ) d'inflammation endométriale était de 5%N (2 - 35%N), contre une médiane (EIQ) de 4%N (1 - 11%N; $P = 0,68$) en cas de culture bactérienne négative. Plus précisément, la relation entre l'inflammation endométriale et le type de pathogène a été examinée (figure 19). La médiane d'inflammation n'était pas significativement modifiée en fonction de la pathogénicité des contaminants.

Concernant la relation entre l'inflammation du col et la présence de bactéries utérines, une absence de croissance bactérienne était observée dans 91% des cas d'inflammation endocervicale non nulle ($> 0\%N$), 89% des inflammations pathologiques $\geq 5\%N$ et 80% des inflammations graves ($\geq 30\%N$).

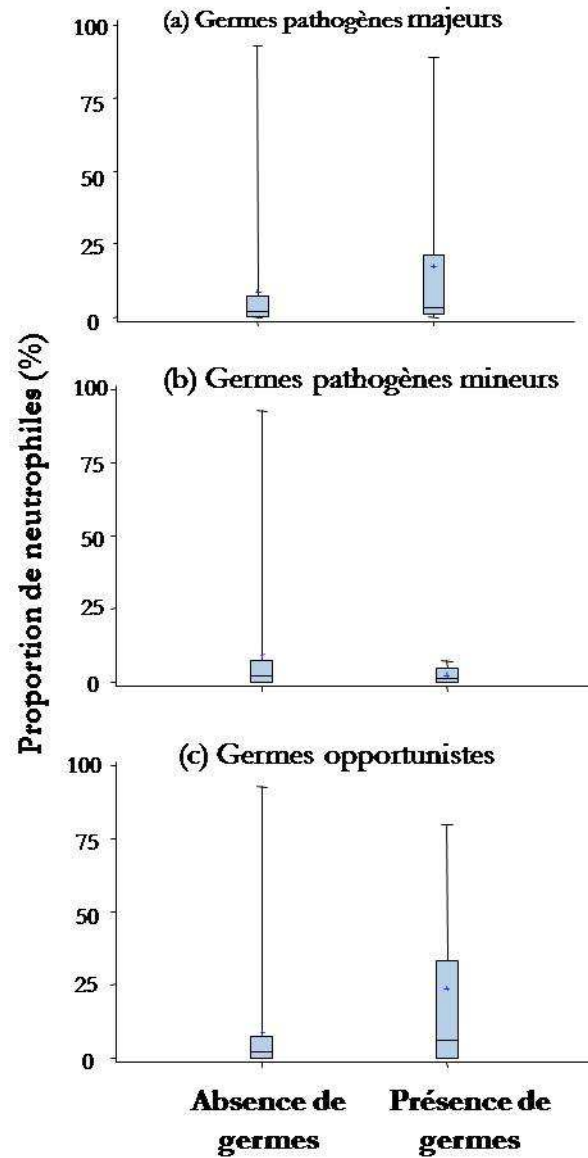
En cas d'inflammation cervicale nulle ($n = 46$), cinq prélèvements utérins étaient contaminés, dont un par des pathogènes majeurs (*Bacteroides sp.*; 4 colonies), deux par des germes potentiellement pathogènes (*Streptococci* non-hémolytique; < 10 colonies) et deux par des contaminants opportunistes (*Aerococcus sp.*; < 15 colonies).

Les médianes (EIQ) d'inflammation endocervicale étaient de 3%N (0 - 9%N) en présence d'une culture positive ($n = 15$) contre 2%N (0 - 7%N; $P = 0,50$) en l'absence de croissance bactérienne. La médiane d'inflammation endocervicale n'était pas significativement modifiée en fonction de la pathogénicité des contaminants de la lumière utérine (figure 20).

Une inflammation génitale pathologique, définie par un frottis endocervical $\geq 5\%N$ ou un frottis endométrial $\geq 6\%N$, était présente chez 80 vaches. Une absence de croissance bactérienne était observée dans 90% des cas d'inflammation génitale pathologique et dans 91% des cas

Figure 20 : Proportion de neutrophiles endocervicaux en fonction de la pathogénicité des contaminants utérins (n = 163).

La barre horizontale des boîtes à moustaches correspond à la médiane, le rectangle à la dispersion centrale des valeurs entre les quartiles supérieur et inférieur et l'axe vertical représente la dispersion de 95% des valeurs



L'inflammation génitale post-partum évaluée par l'examen cytologique

Correspondance entre les examens bactériologique et cytologique

d'inflammation génitale non nulle (*i.e.*, frottis endocervical > 0%N ou un frottis endométrial > 0%N ; n = 152).

En cas d'inflammation génitale nulle (*i.e.*, inflammation endocervicale et inflammation endométriale nulles ; n = 11), un seul prélèvement était contaminé par l'association d'un pathogène mineur (*Aerococcus sp.* ; 12 colonies) et d'un contaminant opportuniste (*Staphylococci chromogenes* ; < 10 colonies).

3. Discussion

L'endomètre bovin post-partum héberge des germes aéro- et anaérobies de pathogénités variées. Williams *et al.* [39] distinguent - les bactéries pathogènes de l'utérus - reconnues associées à des lésions de l'endomètre - les bactéries potentiellement pathogènes - fréquemment isolées de la lumière utérine en cas d'endométrite, mais non associées à des lésions utérines - et enfin les contaminants opportunistes - transitoirement isolés, mais non associés à des cas d'endométrite (tableau 1). *A. pyogenes* seul ou en combinaison d'autres contaminants (*E. coli*, *Bacteroides sp.* ou *F. necrophorum*) est la bactérie pathogène la plus fréquemment rencontrée dans les cas d'endométrite [76,125].

Quatre vingt onze pourcents des prélèvements utérins réalisés entre 21 et 60 JPP n'ont pas permis de croissance bactérienne par culture *in vitro*. La croissance seuil avait tout d'abord été fixée à plus de dix colonies par gélose. Les faibles degrés de contamination nous ont amenés à baisser ce seuil au cas par cas et selon le type de pathogène isolé. Dans l'étude de Williams *et al.* [39], malgré le succès de la culture bactérienne dans 89% des cas, la densité de croissance était faible pour les prélèvements réalisés entre 21 et 28 JPP, avec une médiane de zéro ou deux colonies par culture. Dans un seul cas, la médiane de densité de croissance était de 500 colonies. Elle correspondait à l'identification de pathogènes majeurs associés à un mucus purulent.

Une forte proportion d'utérus présentant une inflammation endométriale supérieure à 0%N n'était pas associée à une culture bactérienne positive. D'autres études rapportent le manque de concordance entre les résultats des examens bactériologique et histologique [86,126]. Les agents responsables de l'inflammation ne semblent pas systématiquement présents au moment du prélèvement. D'après Lewis [76], l'absence d'isolement de germes n'est pas pour autant synonyme d'absence d'endométrite. L'identification d'un contaminant n'est pas nécessairement associé à une inflammation [5]. L'identification de bactéries dans la lumière

L'inflammation génitale post-partum évaluée par l'examen cytologique

Correspondance entre les examens bactériologique et cytologique

utérine peut précéder l'apparition de signes cliniques, même si les études chez la jument laissent penser que l'afflux de neutrophiles dans la muqueuse est concomitant de la contamination bactérienne [127]. Inversement, un échantillon stérile peut être observé en cas d'inflammation génitale. C'est le cas lorsque l'agent pathogène a été éliminé par mobilisation des défenses utérines ou après mise en place d'une thérapeutique.

La relation entre l'isolement bactérien et l'inflammation génitale est donc complexe. Il semble nécessaire de s'interroger sur l'obtention d'un taux de croissance bactérienne médiocre et définir s'il est dû à une faible contamination de la lumière utérine entre 21 et 60 JPP ou si la technique de culture aéro- anaérobie est inadaptée. Les prélèvements sont-ils réellement stériles ou les bactéries présentes ne peuvent-elles être mises en évidence par des techniques de bactériologie conventionnelle ?

Nous avons observé qu'une contamination utérine par des pathogènes majeurs ou potentiellement pathogènes n'avait pas d'impact sur le statut inflammatoire endocervical. Ce travail aurait pu être complété par un examen bactériologique endocervical, afin d'examiner l'association entre la contamination et l'inflammation de ce compartiment. Petit *et al.* [125] ont récemment montré que le vagin et le col étaient colonisés par une flore variée, mais non représentative des pathogènes de la lumière utérine. Seules, respectivement, 20 et 30% des bactéries vaginales et cervicales doivent être considérées comme potentiellement pathogènes pour l'endomètre utérin. Les autres sont indifféremment isolées du vagin de femelles gestantes ou non gestantes [125]. Cependant, en cas de non respect des règles d'hygiène, elles peuvent souiller l'écouvillon lors de son passage dans le tractus génital et engendrer des erreurs de diagnostic [12,128].

Le vagin et le col agissent comme des barrières protectrices contre l'ascension de bactéries commensales dans le tractus génital femelle. Du fait de sa position à l'interface entre le milieu utérin stérile et l'environnement extérieur, la colonisation de la muqueuse cervicale est fréquente, mais elle ne requiert cependant aucun traitement, sauf si elle est associée à des signes cytologiques ou cliniques d'inflammation [125]. Le col apparaît donc comme un organe à part entière, tant sur le statut bactériologique qu'immunologique.

Cette partie a montré que les statuts inflammatoires du col et du corps étaient distincts. La question est maintenant de déterminer quel est l'impact d'une inflammation de chacun de ces compartiments sur les paramètres de reproduction.

II. Impact de l'inflammation génitale sur la fertilité

Impact de l'inflammation génitale sur la fertilité

Un environnement utérin sain est un facteur indispensable à la réussite de la reproduction, l'endomètre jouant un rôle crucial dans la fécondation et le développement embryonnaire précoce. Plusieurs études ont montré l'impact d'une inflammation utérine diagnostiquée par examen cytologique vers 30 JPP sur les performances de reproduction ultérieures de l'animal [4,45,60]. Seule une équipe a évalué l'inflammation utérine au moment de l'insémination artificielle (4 heures post-insémination artificielle [IA]) et son impact sur la réussite à cette insémination [129].

De même, seule l'inflammation du corps utérin est en général évaluée dans la littérature [4,60,129]. Ahmadi *et al.* [100,116] se sont néanmoins intéressés à l'inflammation endocervicale. Mais un lien direct entre la proportion de neutrophiles au sein de la muqueuse cervicale et les paramètres de reproduction n'a pas été établi. Le col constitue pourtant l'une des principales barrières protectrices de l'utérus contre l'environnement extérieur. Le mucus cervical, par ses propriétés physico-chimiques, protège l'organisme d'une contamination ascendante du tractus génital [7]. A l'inverse, les contractions utérines favorisent l'élimination des débris tissulaires et bactériens de la lumière utérine, en transitant à travers le col béant. Par sa position anatomique clef entre l'utérus et l'environnement extérieur, la muqueuse cervicale peut être exposée à un processus inflammatoire. A la différence de l'endométrite, la prévalence et les conséquences de l'inflammation endocervicale ont été peu étudiées dans l'espèce bovine, la plupart des études consistant uniquement en une caractérisation macroscopique de cette inflammation [113,130].

Compte tenu de notre démonstration préalable de l'absence de concordance entre l'inflammation du corps utérin et celle du col, l'objectif de la suite de notre travail était d'évaluer l'impact d'une inflammation génitale (*i.e.*, utérine et/ou cervicale) sur la fertilité de la vache. Dans une première partie, nous avons estimé l'impact à long terme d'une inflammation génitale mesurée avant 35 JPP. Puis il s'agissait de caractériser les conséquences à court terme d'une inflammation sur la réussite de l'insémination.

A. Impact à long terme de l'inflammation génitale

Publications et travaux associés

Article soumis à *Theriogenology*

- **Deguillaume L**, Geffré A, Desquilbet L, Dizien A, Thoumire S, Vornière C, Constant F, Fournier R, Chastant-Maillard S. Impact of endocervical inflammation on reproductive performance in dairy cows. Relationship with endometritis.

Article publié

- Chastant-Maillard S, **Deguillaume L**. (2009) Endométrites subcliniques : la partie immergée de l'iceberg. *Repro Mag*, n°5, Intervet, Beaucauzé, France, 8-11.

Congrès internationaux

- **Deguillaume L**, Geffré A, Desquilbet L, Fournier R, Chastant-Maillard S. (2010) Post-partum cervicitis in dairy cows: incidence and impact on fertility. In : *14th annual conference of the European Society of Domestic Animal Reproduction*. Eger, Hongrie, 15-18 Septembre 2010, 94. (poster)
- **Deguillaume L**, Boulouis HJ, Thoumire S, Vornière C, Constant F, Geffré A, Fournier R, Chastant-Maillard S. (2008) Comparative evaluation of various techniques for diagnosis of chronic endometritis in cows. In : *XXVth World Buiatrics Congress*. Budapest, Hongrie, 6-11 Juillet 2008, 186. (communication orale)

Thèse de Doctorat Vétérinaire (encadrement)

- Dizien A. (2008) *Etude interspécifique des cytologies génitales pour le diagnostic de l'endométrite. Intérêt diagnostique chez la vache*. Thèse Méd. Vét., Alfort, 97p.
Lauréate de la Faculté de Médecine de Créteil, médaille de bronze.

Thèse de Doctorat Vétérinaire (réalisation)

- **Deguillaume L**. (2007) *Etude comparative des différentes techniques de diagnostic des métrites chroniques chez la vache*. Thèse Méd. Vét., Alfort, 109p.
Lauréate de la Faculté de Médecine de Créteil, médaille d'argent.
Lauréate de l'Académie de Médecine Vétérinaire, médaille d'or.

Impact de l'inflammation génitale sur la fertilité

Impact à long terme de l'inflammation génitale

Nos études précédentes ont montré que le statut inflammatoire endocervical ne reflétait pas directement celui de l'endomètre utérin. Sachant que l'inflammation endométriale autour de 30 JPP a des conséquences néfastes sur la reproduction des bovins [18], cette étude avait comme objectif l'évaluation de l'impact d'une inflammation endocervicale, caractérisée par un examen cytologique au moment du contrôle d'involution post-partum, sur la fertilité ultérieure de l'animal.

1. Protocole

Cent soixante huit vaches laitières ont été recrutées dans trois élevages, entre 21 et 60 JPP par deux cliniciens (93 et 75, respectivement). Un prélèvement cytologique endocervical, suivi d'un prélèvement endométrial, étaient réalisés sur chaque individu, comme décrit précédemment. La parité des animaux, ainsi que les événements post-partum, tels que les conditions de vêlage, la naissance de jumeaux et les affections post-partum (rétention placentaire, métrite, coma vitulaire, déplacement de caillette ou mammite clinique) ont été enregistrées. La NEC était évaluée le jour de la visite.

Les frottis cytologiques ont été colorés puis lus par l'opérateur qui avait effectué le prélèvement. La progestéronémie a été dosée. Les pratiques d'élevage n'ont pas été modifiées par l'étude et la mise à la reproduction des animaux a été faite indépendamment des résultats des examens.

L'impact de l'inflammation génitale sur le taux de gestation a été caractérisé jusqu'à 300 JPP, à l'aide d'une analyse de survie, utilisant les courbes de Kaplan-Meier et le modèle de Cox ajusté pour la parité, la NEC et l'élevage d'origine [109]. Les analyses ont été stratifiées selon le nombre de jours post-partum ($<$ ou \geq 35).

2. Résultats

2.1. Détermination du seuil d'inflammation pathologique

Pour les frottis endocervicaux réalisés avant 35 JPP, en se basant sur le critère d'Akaike, le %N minimal discriminant les chances de gestation dans les 300 JPP, était de 5%. Une inflammation endocervicale de plus de 5%N était associée à une diminution significative du taux de gestation, indépendamment de la parité, de la NEC et de l'élevage (risque relatif ajusté [RRa],

Tableau 8 : Risque relatif ajusté du taux de gestation dans les 300 JPP, en fonction du résultat de l'examen cytologique endocervical réalisé avant 35 JPP (n = 93).

Le modèle est ajusté pour la parité, la NEC et l'élevage d'origine

NEC : note d'état corporel ; %N : taux de neutrophiles

Variable	Risque relatif	Intervalle de confiance à 95%	P
Parité (multipares <i>vs.</i> primipares)	1,2	0.7 - 2.2	0,5
NEC (≥ 2.5 <i>vs.</i> < 2.5)	2,5	1.3 - 4.5	<0.01
Elevages			
Elevage 1	1		
Elevage 2	0,8	0.2 - 3.2	0,7
Elevage 3	0,4	0.2 - 0.7	<0.01
Inflammation endocervicale ($\geq 5\%N$ <i>vs.</i> $< 5\%N$)	0,4	0.3 - 0.8	<0.01

Tableau 9 : Risque relatif ajusté du taux de gestation dans les 300 JPP, en fonction du résultat de l'examen cytologique endométrial réalisé avant 35 JPP (n = 93).

Le modèle est ajusté pour la parité, la NEC et l'élevage d'origine

NEC : note d'état corporel ; %N : taux de neutrophiles

Variable	Risque relatif	Intervalle de confiance à 95%	P
Parité (multipares <i>vs.</i> primipares)	1,4	0.8 - 2.4	0,3
NEC (≥ 2.5 <i>vs.</i> < 2.5)	2,6	1.4 - 4.7	<0.01
Elevages			
Elevage 1	1		
Elevage 2	0,6	0.1 - 2.5	0,5
Elevage 3	0,4	0.2 - 0.8	<0.01
Inflammation endométriale ($\geq 6\%N$ <i>vs.</i> $< 6\%N$)	0,4	0.2 - 0.7	<0.01

Impact de l'inflammation génitale sur la fertilité

Impact à long terme de l'inflammation génitale

0,4 ; IC95%, 0,3 – 0,8, $P < 0,01$, tableau 8). Pour les vaches prélevées au-delà de 35 JPP, aucun seuil inflammatoire délétère pour le taux de gestation n'a été mis en évidence.

Au seuil de 5%N, parmi les 93 vaches prélevées avant 35 JPP, la prévalence des inflammations endocervicales était de 41%.

Pour les frottis endométriaux réalisés avant 35 JPP, le critère d'Akaike a révélé que le %N minimum prédictif des performances de reproduction était de 6%, avec pour RRA des chances de gestation dans les 300 JPP, la valeur de 0,4 (IC95%, 0,2 – 0,7, $P < 0,01$, tableau 9). Au-delà de 35 JPP, aucun seuil délétère n'a été mis en évidence.

La prévalence des inflammations endométriales pathologiques ($\geq 6\%N$) était de 43% ($n = 93$). Treize pourcent des vaches présentaient une inflammation utérine seule, contre 30% avec une inflammation conjointe du col et du corps de l'utérus.

2.2. Impact à long terme de l'inflammation génitale

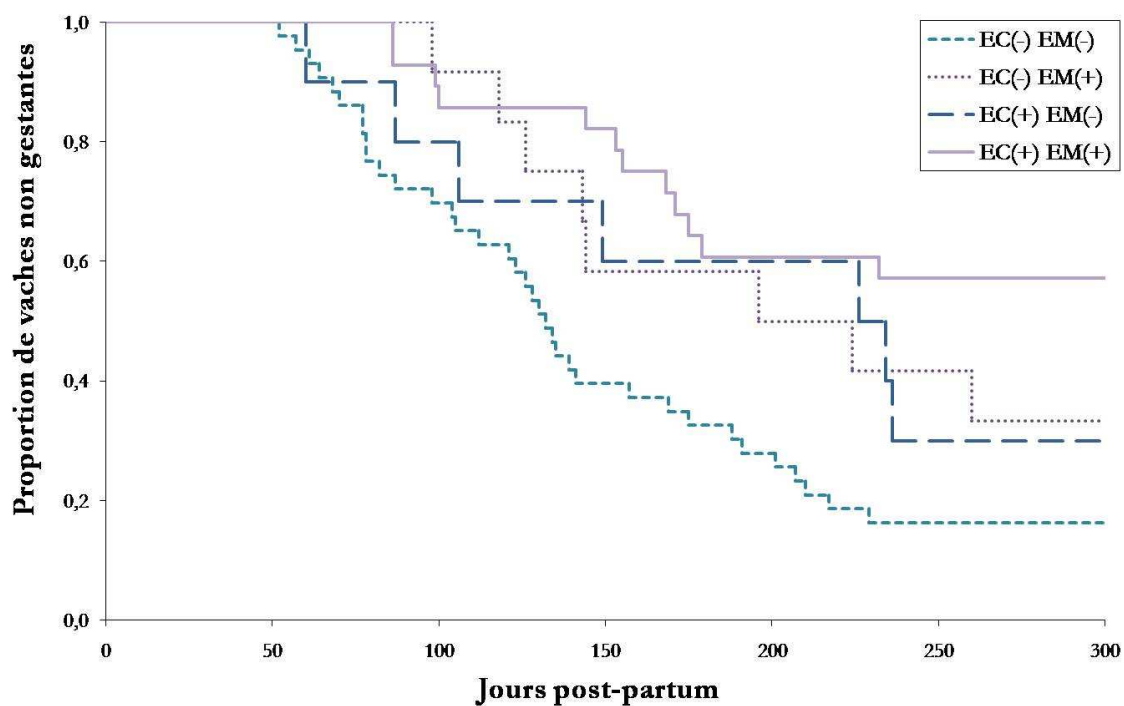
Les courbes de Kaplan-Meier (figure 21) illustrent l'impact de l'inflammation endométriale mais aussi endocervicale sur le délai de gestation. De plus, cette figure a révélé que l'IVIF dépendait de la partie du tractus génital inflammé ($P_{logrank} < 0,01$). En effet, 61% des vaches saines (*i.e.*, $< 5\%N$ sur frottis endocervical et $< 6\%N$ sur frottis endométrial ; $n = 43$) étaient gestantes à 150 JPP, contre uniquement 40% des vaches présentant une inflammation endocervicale seule (*i.e.*, $\geq 5\%N$ sur frottis endocervical et $< 6\%N$ sur frottis endométrial ; $n = 10$) et 42% des vaches avec une inflammation endométriale seule (*i.e.*, $< 5\%N$ sur frottis endocervical et $\geq 6\%N$ sur frottis endométrial ; $n = 12$). Enfin, la figure montre l'effet additif des inflammations des deux compartiments : seules 18% des vaches présentant les deux compartiments inflammés (*i.e.*, $\geq 5\%N$ sur frottis endocervical et $\geq 6\%N$ sur frottis endométrial ; $n = 28$) étaient gestantes à 150 JPP.

3. Discussion

Cette étude a montré que non seulement l'inflammation endométriale, évaluée par examen cytologique, mais aussi l'inflammation endocervicale, sont délétères pour les performances de reproduction ultérieures. Quel que soit le compartiment génital étudié, l'inflammation mesurée avant 35 JPP uniquement, s'est révélée diminuer la fertilité des animaux. D'autres auteurs ont considéré la date de 30 – 35 JPP comme limite de définition des seuils d'inflammation, utilisant

Figure 21 : Courbes de Kaplan-Meier représentant la proportion de vaches non gestantes, selon leurs taux d'inflammation génitale avant 35 JPP (n = 93).

%N : taux de neutrophiles ; EC(+) : inflammation endocervicale (définie par 5%N ou plus sur un frottis endocervical) ; EC (-) : < 5%N sur un frottis endocervical ; EM(+) : inflammation endométriale (définie par 6%N ou plus sur un frottis endométrial) ; EM(-) : < 6%N sur un frottis endométrial



Impact de l'inflammation génitale sur la fertilité

Impact à long terme de l'inflammation génitale

des seuils distincts avant et après ce délai [4,131,132]. Notre étude indique que pour être prédictif des performances de reproduction ultérieures, le statut inflammatoire génital est à évaluer dans le post-partum précoce, soit entre 21 JPP (début d'apparition des inflammations superficielles de la muqueuse utérine [1]) et 35 JPP (fin des remaniements de la période post-partum [11]). Cette précocité permettrait également une mise en œuvre anticipée d'un traitement.

En ce qui concerne l'inflammation endométriale, notre étude a montré un effet délétère au-delà d'une valeur de 6%N avant 35 JPP. Notre seuil est proche de ceux proposés dans la littérature avant 35 JPP, compris entre 6,5% et 18% [4,133,134], définis sur la base d'une altération significative des performances de reproduction [4,133] par utilisation d'une courbe ROC (Receiver Operating Characteristic). Ici, le critère d'Akaike a été utilisé en tant qu'indicateur de la pertinence du modèle [110] pour le choix du plus petit seuil inflammatoire significativement associé à une altération du taux de gestation. Le critère d'Akaike est considéré comme un indicateur fiable de la pertinence d'un modèle et est couramment utilisé dans la sélection des modèles ou dans la détermination des valeurs seuils de référence [135,136].

Concernant l'examen cytologique endocervical, nous avons calculé un seuil de 5%N, donc très proche de celui observé chez les mêmes femelles par examen cytologique utérin. Stephens *et al.* [113] ont été les premiers à proposer un seuil cytologique limite d'inflammation endocervicale tolérable, mais sans démonstration particulière, seulement par extension de celui utilisé pour l'utérus.

Peu d'études ont cherché à caractériser chez les bovins, la prévalence ou l'impact d'une inflammation endocervicale sur la reproduction. Les premiers travaux prenaient en compte les cervicites cliniques. La prévalence dans l'étude de Dobler, cité par Gloor [130], était de 15% (26 cas sur 170). L'Ecole Vétérinaire de Munich (Allemagne) rapportait que 2 à 4% des appareils génitaux collectés à l'abattoir présentaient des lésions cervicales [130]. Enfin, dans les cas d'échec à l'insémination, Knüsel, cité par Gloor [130], a observé 126 cervicites sur 1000 cas et Gloor [130] a comptabilisé 42 cas de cervicite clinique sur 199 cas d'infertilité. La cervicite était définie dans son étude lors de l'examen au speculum par un œdème de l'orifice postérieur du col, associé à une congestion de la muqueuse, un élargissement et une induration du col, ainsi que la présence de sécrétions purulentes dans le vagin. Après examen histologique de l'endocol (infiltration de la muqueuse endocervicale par des cellules inflammatoires), Gonzalez *et al.* [113] ont observé une prévalence de la cervicite de 44%. Dans notre étude, en se basant sur l'examen cytologique, la prévalence de l'inflammation endocervicale était élevée, avec 41% de notre échantillon présentant une inflammation supérieure à 5%N.

Impact de l'inflammation génitale sur la fertilité

Impact à long terme de l'inflammation génitale

A la lumière de nos résultats, il apparaît que l'inflammation endocervicale, de fréquence élevée dans notre échantillon, est associée à une altération des performances de reproduction ultérieures de la vache. Ce travail est le premier à utiliser l'examen cytologique pour caractériser l'impact de l'inflammation endocervicale. Les rares études qui l'ont utilisé s'en servaient comme marqueur indirect de la santé de l'endomètre utérin [100,116,120]. Or nous avons mis en évidence dans notre travail, que l'inflammation du col n'était pas systématiquement associée à une inflammation endométriale. De plus, notre étude a démontré que l'inflammation endocervicale, au seuil de 5%N, était aussi délétère que l'inflammation utérine, au seuil de 6%N (les courbes de Kaplan-Meyer sont similaires pour les femelles EC(+) EM(-) et EC(-) EM(+); figure 21). Au-delà d'un impact de l'inflammation isolée de chaque compartiment sur l'IVIF, cette étude a révélé un effet cumulatif : les vaches affectées par les deux sources d'inflammation étaient significativement moins fertiles que celles présentant l'une ou l'autre des inflammations.

Bien que totalement négligé dans la littérature, l'impact de l'inflammation endocervicale nécessite d'être pris en considération, en raison de sa forte prévalence (plus de 40% des vaches avant 35 JPP) et de son effet marqué sur la fertilité ultérieure. Le col ne doit donc pas être considéré uniquement comme une barrière physique entre le vagin et l'utérus [12], mais comme un organe à part entière. C'est bien l'inflammation génitale, et non l'inflammation endométriale seule, qui a un effet sur la fertilité ultérieure. Les deux compartiments ayant un statut inflammatoire distinct, il est nécessaire de conserver l'évaluation cytologique de chacune des deux entités dans la prédiction de la fertilité à court et à long terme.

B. Impact à court terme de l'inflammation génitale

Publications et travaux associés

Article publié

- Chastant-Maillard S, **Deguillaume L.** (2009) Endométrites subcliniques : la partie immergée de l'iceberg. *Repro Mag*, n°5, Intervet, Beaucauzé, France, 8-11.

Thèse de Doctorat Vétérinaire (encadrement)

- Lamorinière D, Lecossais H. (en préparation ; soutenance prévue au second semestre 2011) *Impact d'une inflammation génitale sept jours avant l'insémination artificielle chez la vache Prim'Holstein.* Thèse Méd Vét., Alfort.
- Amate C, Godard A. (2010) *Influence de l'inflammation génitale sur la réussite à l'insémination chez la vache laitière.* Thèse Méd Vét., Alfort, 50p.

Impact de l'inflammation génitale sur la fertilité

Impact à court terme de l'inflammation génitale

Les inflammations génitales (*i.e.*, endométriale et endocervicale) évaluées vers 30 JPP ont un impact sur la fertilité ultérieure des animaux de 150 à 300 JPP. Mais outre cet effet à long terme, on peut envisager que l'inflammation génitale au moment de l'insémination soit prédictive de la réussite même de cette insémination. Les formes cliniques d'inflammation endométriales sont d'ailleurs connues comme une cause d'échec de l'insémination et sont en particulier mises en cause dans les échecs répétés à l'IA en élevage laitier ou syndrome repeat breeding (vaches à expression des chaleurs normale, non gestantes après trois inséminations ou plus [137]). Ce syndrome est associé à une forte dégradation des performances de reproduction (IVIF augmenté de 211 ± 10 j en moyenne et augmentation du nombre d'IA de $4,7 \pm 0,2$ par IA fécondante [138]). Il convient donc de s'interroger sur la place des formes subcliniques d'inflammation dans les échecs à l'insémination.

L'objectif de notre étude était donc d'évaluer l'impact à court terme de l'inflammation génitale, autrement dit, le lien entre le niveau d'inflammation au moment de l'insémination et la réussite de cette insémination. Nous avons cherché à mettre en évidence un seuil d'inflammation au-delà duquel la fécondation était compromise.

1. Protocole

Les vaches étaient recrutées dans quatre élevages Prim'Holstein. Pour être incluse dans le protocole, une vache devait avoir vêlé plus de 50 JPP auparavant, présenter un corps jaune le jour de l'examen, validé par échographie ovarienne (Tringa® ou Agrosan®) et appartenir à l'une des catégories suivantes : vache mise à la reproduction, en subœstrus (absence d'observation des chaleurs par l'éleveur chez une vache normalement cyclée) ou en échec à l'insémination (constaté par examen échographique entre 30 et 45 jours post-insémination). Les vaches présentant des écoulements vaginaux purulents ou mucopurulents (catégories [3] et [4], selon la classification décrite dans la section Matériels et méthodes, figure 9), suite au recueil des sécrétions à l'aide d'un gant, étaient exclues de l'étude.

Le jour du recrutement, un examen cytologique endocervical, suivi d'un examen cytologique endométrial était pratiqué. La parité et la NEC étaient enregistrées.

Les vaches étaient ensuite inséminées après protocole d'induction de l'œstrus. En première intention, un analogue de la $PGF_{2\alpha}$ (dinoprost - Enzaprost T®, Ceva Santé Animale, Libourne, France ; 25 mg par voie intramusculaire - ou cloprosténol - Estrumate®, Intervet, Beaucauzé, France, 500 µg par voie intramusculaire) était administré pour induire la lutéolyse et l'apparition

Impact de l'inflammation génitale sur la fertilité

Impact à court terme de l'inflammation génitale

de l'œstrus. En seconde intention (*i.e.*, si la vache n'était pas inséminée suite à l'injection de prostaglandines), les chaleurs étaient induites à l'aide de progestagènes (implant auriculaire : Crestar SO®, Intervet; ou dispositif intravaginal : Prid®, Ceva Santé Animale). Pour un implant auriculaire, le jour de la pose de l'implant une injection de 10 µg de buséréline (Receptal®, Intervet) était pratiquée, l'implant restait en place 10 jours. Une injection de PGF2α deux jours avant le retrait de l'implant et une injection d'eCG (equine Chorionic Gonadotropin ; 500 UI, Chronogest PMSG®, Intervet) le jour du retrait, étaient réalisées. Pour un dispositif intravaginal, la spirale restait en place sept jours et une injection de PGF2α était effectuée 24 h avant le retrait. Les traitements étaient réalisés le jour du recrutement des animaux par l'équipe de l'Unité de Reproduction de l'ENVA ou l'éleveur.

L'insémination était effectuée en totale ignorance des résultats des examens cytologiques. Lors d'un traitement par les PGF2α, l'insémination avait lieu après l'observation des chaleurs par l'éleveur, dans les deux à six jours suivant l'injection. Lors de la pose d'un implant Crestar SO®, l'insémination avait lieu de façon systématique, 48 h après le retrait de l'implant. Chez les vaches ayant reçu une spirale vaginale, l'insémination était pratiquée 56 h après le retrait, sans détection de l'œstrus. La gestation était constatée par un examen échographique entre 30 et 45 jours post-insémination.

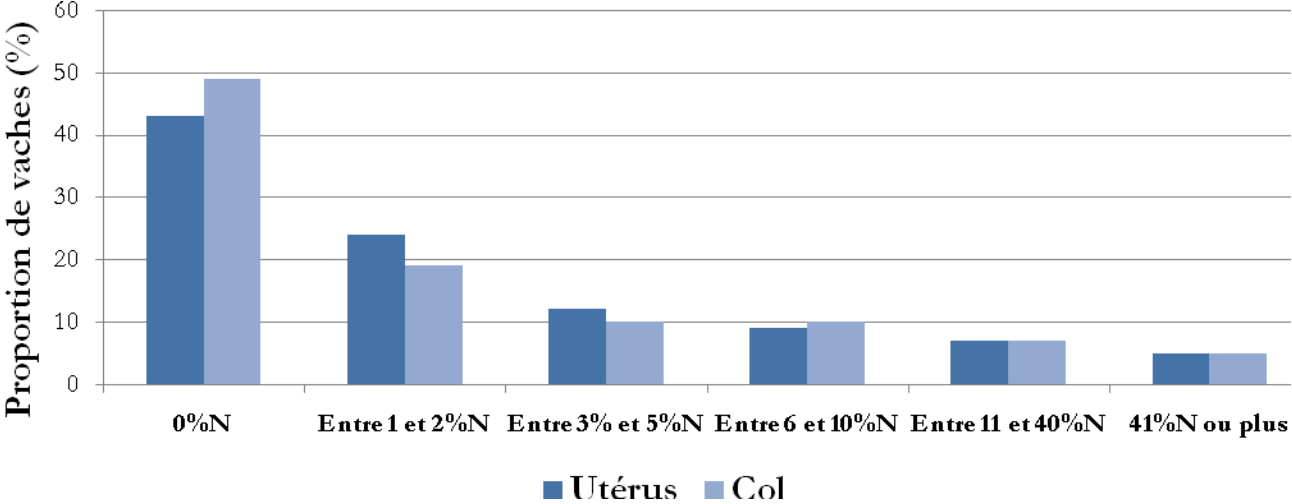
L'association entre le statut inflammatoire génital et la réussite à l'insémination a été testée à l'aide de la procédure Catmod (SAS, version 9.2, SAS Institute Inc), après inclusion dans le modèle de facteurs de confusion potentiels, identifiés lors d'une analyse univariée préalable (*i.e.*, variables associées avec le statut inflammatoire, ainsi qu'avec la réussite à l'insémination, au seuil de $P < 0,20$). Les variables incluses dans le modèle multivarié étaient la NEC, la parité et l'élevage d'origine.

2. Résultats

Au total 200 vaches ont été incluses dans l'étude, 91 ont été inséminées dans les 7 jours après l'examen cytologique, 168 dans les 25 j et 15 au-delà. Dix sept vaches n'ont jamais été inséminées. Notre échantillon d'étude a été restreint aux vaches inséminées dans les 7 jours ($n = 91$) afin de disposer d'une mesure de l'état inflammatoire du tractus génital le plus près possible du moment de l'IA. Dans notre échantillon, la médiane (EIQ) de l'intervalle entre l'examen cytologique et l'IA était de 4 j (3 – 5 j).

Figure 22 : Distribution des taux de neutrophiles parmi les 91 vaches prélevées, en fonction du site de prélèvement (utérus *vs.* col).

%N : taux de neutrophiles



Impact de l'inflammation génitale sur la fertilité

Impact à court terme de l'inflammation génitale

Les vaches examinées étaient majoritairement en subœstrus (55%). La grande majorité (87%) des vaches incluses ont été traitées par des PGF2 α . Le délai post-partum avait pour médiane (EIQ) 100 JPP (79 - 132 JPP). Au moment du prélèvement, le numéro d'insémination avait pour médiane 2 (EIQ ; 1 - 2), avec 10% de l'effectif à trois inséminations ou plus.

Les médianes (EIQ) d'inflammations endocervicale et endométriale étaient de 0%N (0 - 4%N) et 1%N (0 - 4%N) respectivement (n = 91). Dans notre échantillon, 43% de l'effectif présentait une inflammation endométriale nulle et 49% une inflammation endocervicale nulle (figure 22). Seuls 5% des animaux présentaient des inflammations endométriale ou endocervicale intenses (> 40%N).

L'étude de l'association entre l'inflammation endométriale et la réussite à l'insémination a montré une diminution du taux de gestation au-delà d'un seuil de 1%N, à niveau égal de parité, de NEC et d'élevage ($P < 0,01$). Le taux de réussite à l'insémination était de 59% (n = 39) pour les vaches avec une inflammation utérine nulle, contre seulement 30% (n = 44) pour les vaches avec un frottis endométrial compris entre 1% et 15%N et 13% pour les cas d'inflammation $\geq 15\%N$ (n = 8 ; $P < 0,01$). Au seuil de 1%N, la prévalence de l'inflammation endométriale était de 57%.

Deux tiers (n = 6) des vaches repeat breeders (*i.e.*, ≥ 3 IA le jour du recrutement ; n = 9) présentaient une inflammation endométriale $\geq 1\%N$, contre 56% des vaches à moins de trois inséminations.

En ce qui concerne l'inflammation endocervicale, le modèle multivarié a révélé un impact significatif au-delà d'un seuil de 2%N. Le taux de réussite à l'insémination était de seulement 15% (5/33) chez les vaches $\geq 2\%N$, contre 55% (32/58) pour les vaches $< 2\%N$. Plus d'un tiers des bovins (36%) présentait une inflammation endocervicale $\geq 2\%N$. Parmi les vaches à inflammation endocervicale $\geq 2\%N$ (n = 33), 73% présentaient également une inflammation endométriale $\geq 1\%N$. Le taux de réussite à l'insémination était significativement associé à la proportion de neutrophiles sur les frottis. Ici, 53% des vaches à inflammation endocervicale nulle (n = 45) étaient gestantes, contre seulement 37% des vaches présentant une inflammation entre 1% et 15%N (n = 35 ; $P < 0,01$). Enfin, la réussite à l'insémination était nulle pour les vaches avec une inflammation supérieure à 15%N (n = 10).

La grande majorité (88%) des vaches repeat breeders (n = 9) présentaient une inflammation du col supérieure au seuil de 2%N, contre seulement 30% des vaches à moins de trois IA.

3. Discussion

Notre étude a révélé un lien entre le statut inflammatoire au moment de la mise à la reproduction (diagnostiqué par examen cytologique, dans les sept jours qui précèdent l'IA) et le succès de l'insémination. Notre hypothèse d'un impact à court terme de l'inflammation génitale a donc été vérifiée. Les deux seuils mis en évidence (1% et 2%N) sont inférieurs à ceux proposés dans la littérature autour de 30 JPP [4,60,61,113,133]. Peu d'études fournissent un seuil pathologique pour les vaches mises à la reproduction [73,129,139]. Pour un examen cytologique de l'endomètre à 56 et 63 JPP, Bacha *et al.* [139] et Chapwanya *et al.* [10] ont utilisé un seuil de 5%N. Kaufmann *et al.* [129] qui ont réalisé la seule étude actuellement disponible visant à établir une relation entre l'inflammation endométriale et la réussite à l'IA, ont travaillé avec trois classes de taux de neutrophiles (0%N ; 1 – 14%N ; \geq 15%N). Néanmoins, dans aucune de ces trois études, les seuils n'avaient été justifiés. Au mieux, ils étaient déclarés choisis par analogie par d'autres auteurs à d'autres délais post-partum [4,45]. Dans notre étude, le calcul des seuils d'inflammation reposait sur une validation fonctionnelle, à savoir la mise en évidence d'une diminution significative du taux de réussite à l'insémination.

Les traitements d'induction de l'œstrus réalisés par les éleveurs n'étaient pas toujours contrôlés et la mise en œuvre de la thérapeutique n'a pas toujours fidèlement suivi les prescriptions. Ainsi l'intervalle entre le prélèvement et l'insémination s'est trouvé allongé pour certains animaux. Ces animaux ont été exclus de l'étude de façon à ce que les examens cytologiques soient le plus représentatifs possible de l'état inflammatoire au moment de l'insémination.

Malgré une réduction de notre effectif initial, la prise en compte des inséminations réalisées dans un délai de sept jours seulement après l'examen cytologique a mis en évidence un seuil d'inflammation tolérable participant au succès ou à l'échec de l'insémination. L'inclusion des vaches inséminées dans les 25 jours suivant l'examen cytologique ne permettait pas de définir de seuil limite (données non présentées). La proportion de neutrophiles est donc prédictive de la réussite à l'insémination, seulement si elle est évaluée moins de sept jours avant la mise à la reproduction.

L'étude de Kaufmann *et al.* [129] a montré une influence de l'inflammation utérine 4 h après l'IA sur la réussite à cette dernière. Dans cette étude, le taux de réussite à la première insémination était significativement meilleur chez les vaches à inflammation moyenne (1 - 14%N)

Impact de l'inflammation génitale sur la fertilité

Impact à court terme de l'inflammation génitale

que dans le groupe à inflammation élevée ($\geq 15\%N$). Il est plus surprenant de constater que le groupe à inflammation moyenne présentait une meilleure fertilité que celui des vaches à inflammation nulle. Le taux de réussite faible dans le groupe à inflammation nulle est exactement contraire à nos résultats. Ici, nous observons une dégradation significative des paramètres de reproduction évoluant dans le même sens que la gravité de l'inflammation.

Chez beaucoup de mammifères, l'insémination crée une inflammation transitoire physiologique dirigée contre les spermatozoïdes [129,140,141]. La réponse neutrophile atteint son pic entre 6 et 12 h après l'insémination chez la jument et la truie [140,142]. Chez la vache, un afflux de neutrophiles est observé dans l'utérus lors de l'œstrus [80]. Kaufmann *et al.* [129] expliquent la potentielle infertilité des vaches à inflammation nulle par une faible concentration en œstradiol qui diminuerait les capacités immunologiques nécessaires au maintien de la gestation. Cette hypothèse reste cependant à nuancer sachant que la catégorie de vaches sans inflammation représente plus de 50% de leur échantillon.

La prévalence des inflammations génitales était très élevée dans notre étude, plus d'une vache sur deux présentant une inflammation endométriale et une vache sur trois pour le col, malgré un délai post-partum important (médiane, 100 JPP). Cette forte prévalence repose cependant sur un seuil limite inférieur à celui obtenu autour de 30 JPP (se reporter au chapitre précédent). Avec un seuil utérin de 15%N, Kaufmann *et al.* [129] ont observé une prévalence de 13% au moment de l'IA. On peut néanmoins noter que 29% des animaux présentaient une inflammation utérine entre 1 et 14%N, ce qui correspond en somme à 42% d'animaux avec une inflammation endométriale $\geq 1\%N$, donc un chiffre similaire au nôtre.

Il a été montré que les endométrites cytologiques contribuent aux échecs successifs d'insémination [99]. Notre étude révèle que non seulement les inflammations endométriales, mais aussi endocervicales, étaient plus fréquentes chez des vaches repeat breeders. Reste à savoir à quel moment clé, l'inflammation contribue à l'échec de la gestation. Il aurait été intéressant de réaliser l'examen cytologique dans les jours qui suivent le passage de l'embryon de l'oviducte dans l'utérus (vers J5 à J7 post-insémination). Nous n'avons cependant pas pu caractériser, pour des raisons d'innocuité, l'effet d'une inflammation du tractus génital sur la fécondation (J0), le développement embryonnaire précoce, ou l'implantation (J16 à J20) [129,143].

Les deux types d'inflammations génitales, endométriale et endocervicale, affectent donc à court et à long terme, la réussite à l'insémination. L'inflammation du compartiment cervical,

Impact de l'inflammation génitale sur la fertilité

Impact à court terme de l'inflammation génitale

pourtant complètement négligée par les vétérinaires praticiens et même les chercheurs, s'est révélée par sa forte prévalence (41% en post-partum précoce et 36% avant la mise à la reproduction) et son effet délétère pour les paramètres de reproduction, essentielle à diagnostiquer.

La suite de notre travail s'est intéressée aux variations physiologiques de l'inflammation génitale.

III. Evolution de l'inflammation génitale

Evolution de l'inflammation génitale

Au moment du vêlage et lors de la réouverture du col une dizaine de jours suivant le part, les barrières physiques protectrices de l'utérus sont compromises et offrent l'opportunité à des bactéries de l'environnement de remonter le tractus génital jusqu'à contaminer la lumière utérine [15]. La flore bactérienne est progressivement amendée par la mobilisation du système immunitaire inné. Les granulocytes neutrophiles correspondent à la sous-population leucocytaire majoritairement et rapidement recrutée de la circulation périphérique vers la lumière utérine, en réponse à la colonisation bactérienne [91]. Cet afflux de neutrophiles marque le début des processus de nettoyage et des remaniements caractérisant l'involution utérine. L'endomètre redevient normalement stérile en une quarantaine de jours [6,15,145] et fournit alors de nouveau un environnement approprié pour mener à bien une nouvelle gestation. Avec la reprise de la cyclicité post-partum, la santé de l'utérus est essentielle pour le rétablissement du potentiel reproducteur de la vache [146].

Contrairement à la colonisation bactérienne [5,15] ou à l'évolution de la formule leucocytaire plasmatique [30,33], le statut immunitaire utérin au cours du post-partum n'a jamais été décrit chez la vache laitière. L'évolution de la population leucocytaire du col est également complètement inconnue [116,120].

L'objectif de cette étude était donc de décrire l'évolution de l'inflammation génitale au cours du post-partum. Nous avons également examiné son évolution au cours du cycle œstral ainsi que l'influence de facteurs de risque, propres à l'animal ou à la conduite d'élevage.

A. Au cours du post-partum

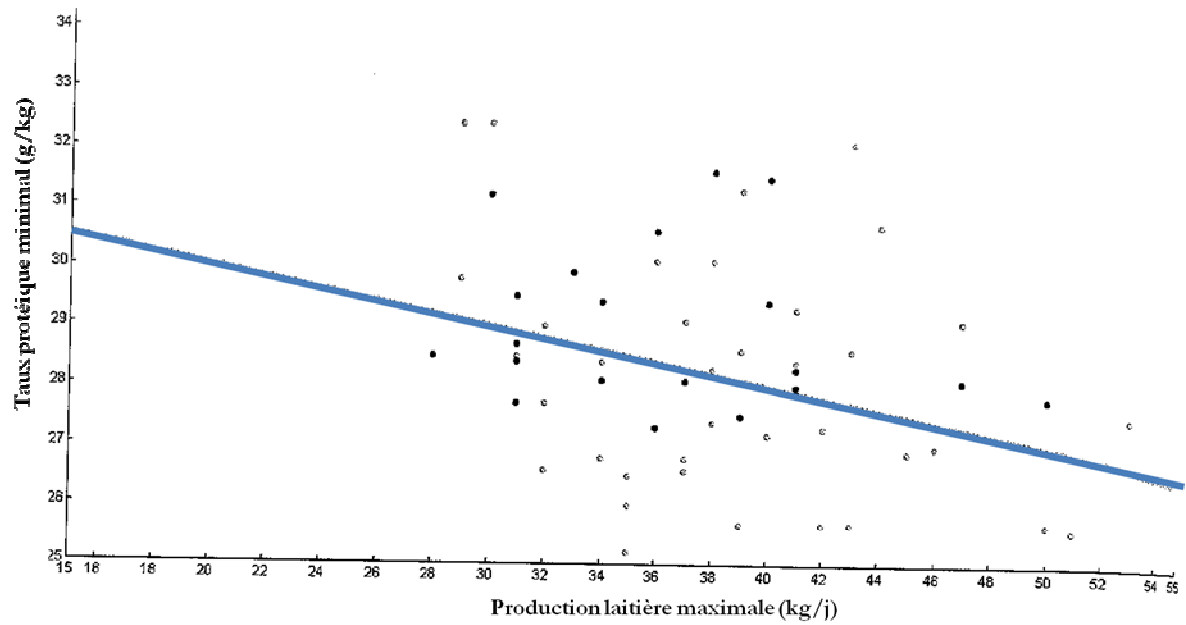
Publications et travaux associés

Article publié

- Chastant-Maillard S, **Deguillaume L.** (2009) Endométrites subcliniques : la partie immergée de l'iceberg. *Repro Mag*, n°5, Intervet, Beaucozéz, France, 8-11.

Figure 23 : Distribution des taux protéiques minimaux en fonction de la production laitière au pic de lactation (d'après Ennuyer, [148]).

La courbe bleue représente les valeurs minimales du taux protéiques définissant l'équilibre énergétique. En dessous de ces valeurs, la vache est considérée en déficit énergétique



Evolution de l'inflammation génitale

Au cours du post-partum

Durant l'involution utérine, des remaniements anatomiques, histologiques et immunologiques fondamentaux ont lieu. Macroscopiquement, le col constitue la portion la plus tardive à évoluer. Alors que le processus est complet sur le plan anatomique pour l'utérus en 30 à 45 jours, l'involution du col nécessite une quinzaine de jours supplémentaires [11]. Nous avons cherché à savoir comment évoluait l'involution cytologique des muqueuses dans le corps et le col utérins.

Par ailleurs, l'inflammation endométriale repose sur un équilibre complexe entre la contamination bactérienne initiale (quantité et pathogénicité des contaminants) et la réponse immunitaire de l'hôte (en particulier diapédèse, phagocytose et pouvoir bactéricide de la population neutrophile) [1]. Or, l'équilibre énergétique, facteur limitant de l'immunité, est difficilement maintenu au cours des premiers mois de lactation, en raison de la forte production laitière [88].

L'objectif de notre étude était de décrire le profil inflammatoire génital post-partum, depuis le vêlage jusqu'à la mise à la reproduction, en tenant compte du statut énergétique des animaux via des paramètres métaboliques.

1. Protocole

Afin de décrire l'évolution du profil inflammatoire après le vêlage, 40 vaches d'un même élevage ont été recrutées. Les animaux étaient inclus à 15 JPP, puis suivis par examens cytologiques endocervical et endométrial toutes les semaines, jusqu'à la réforme ou la mise à la reproduction.

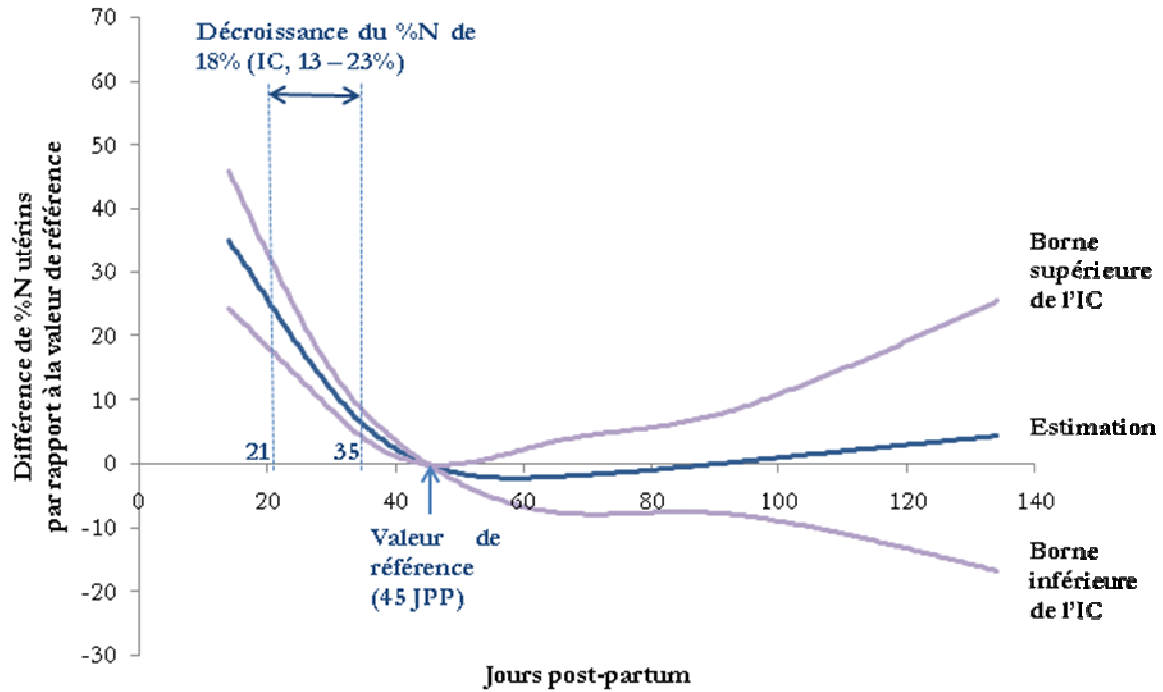
Lors des examens réalisés de 15 à 35 JPP, une prise de sang à la veine coccygienne était effectuée, en vue du dosage de la progestéronémie. La note d'état corporel était évaluée à 35 ± 7 JPP. Parallèlement à l'examen des animaux, les données de production laitière (PL), taux protéique du lait (TP) et taux butyreux du lait (TB) étaient recueillies pour les trois premiers contrôles laitiers (*i.e.*, trois premiers mois post-partum).

La reprise de la cyclicité post-partum était définie comme précoce si au moins un dosage de progestérone plasmatique était supérieur à 1 ng/ml (*i.e.*, 3,2 nmol/l) au cours des 35 premiers JPP [147]. Une vache était considérée haute productrice si l'une des productions laitières des trois premiers contrôles était ≥ 35 kg de lait par jour (médiane de production dans l'échantillon). Le diagnostic de cétose subclinique reposait sur les valeurs des TB et TP des trois premiers contrôles mensuels : si l'un des TP était inférieur à la valeur préconisée par Ennuyer [148], tenant compte de la production laitière de l'animal (figure 23), ou si l'un des

Figure 24 : Modélisation de l'évolution du taux de neutrophiles endométriaux en fonction du délai post-partum.

%N : taux de neutrophiles ; IC : intervalle de confiance ; JPP : jours post-partum

La ligne horizontale (axe des abscisses) correspond à une différence nulle du %N par rapport à la valeur de référence du %N mesurée pour un délai de 45 JPP.



Evolution de l'inflammation génitale

Au cours du post-partum

rapports TB/TP était supérieur à 1,5, la vache était considérée en cétose subclinique (*i.e.*, déficit énergétique).

L'évolution du %N génital en fonction du délai post-partum a été modélisée à l'aide d'une fonction polynôme (modèle à 4 nœuds). Les variables (binaires) incluses dans chacun des deux modèles (un pour l'utérus et un pour le col) jouant un rôle de facteur de confusion potentiel étaient la NEC à 35 ± 7 JPP, la production laitière et la présence d'un déficit énergétique au cours des trois premiers contrôles. Après une représentation globale de l'estimation du %N en fonction du temps, l'analyse a été stratifiée selon la variable reprise précoce de la cyclicité après vêlage.

Parallèlement à la modélisation par une fonction polynôme, les inflammations endométriale et endocervicale de 168 vaches issues de trois élevages laitiers ont été représentées en fonction du délai post-partum. Dans cet essai, chacune des vaches n'était prélevée qu'une seule fois, entre 21 et 60 JPP.

2. Résultats

2.1. Evolution physiologique de l'inflammation endométriale

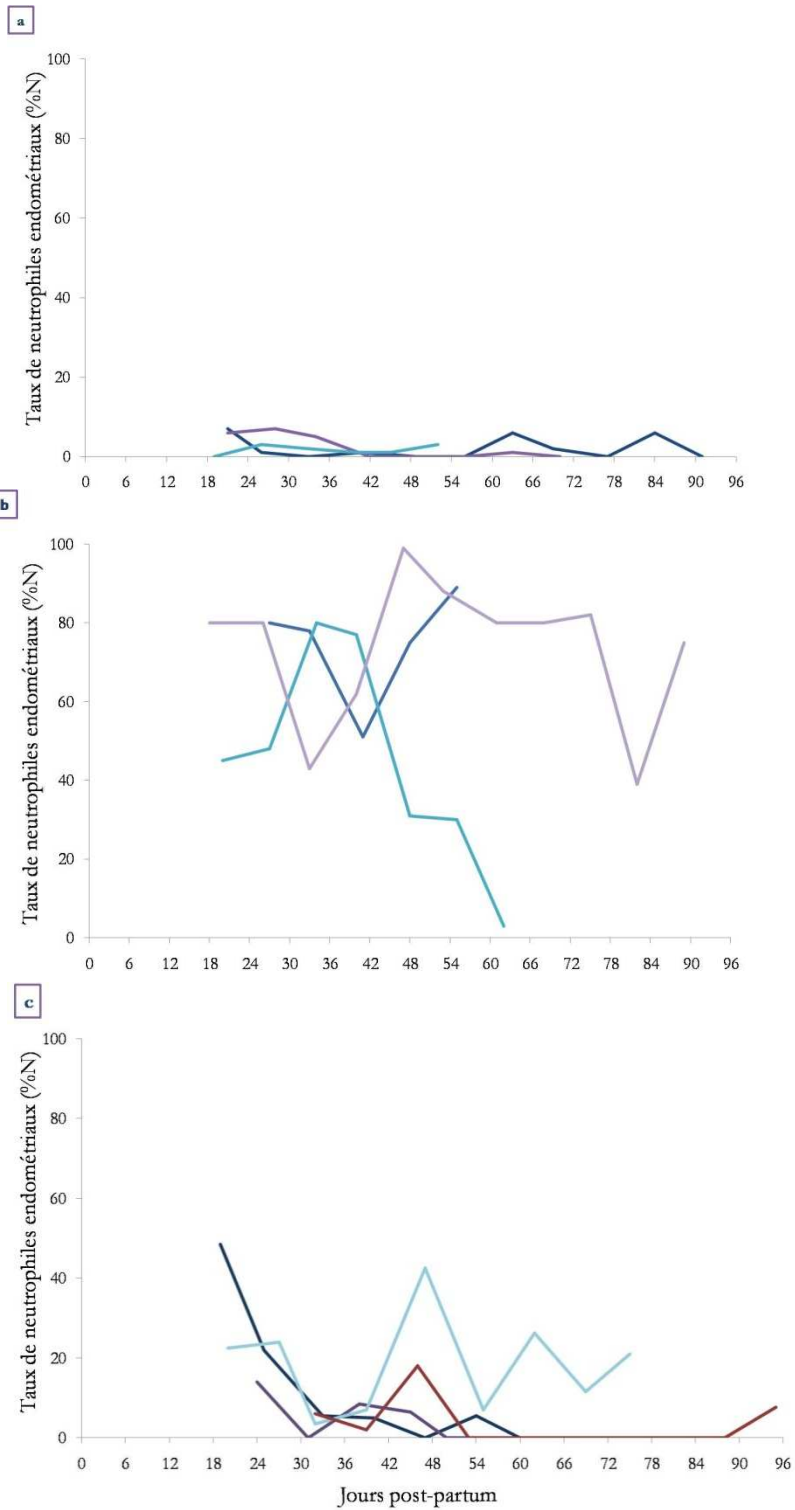
Dans la première étude, les 40 vaches ont été suivies de 15 JPP jusqu'à 47 à 135 JPP. Seuls 25% de l'échantillon étaient encore prélevés au-delà de 64 JPP. A 21 ± 7 JPP, la médiane d'inflammation utérine était élevée (médiane, 24%N ; EIQ, 6 – 60%N). Les médianes d'inflammation n'étaient pas significativement différentes selon le moment de reprise de la cyclicité ovarienne (médiane, 24%N ; EIQ, 6 – 68%N chez les vaches avec une reprise précoce de la cyclicité, *vs.* médiane, 22%N ; EIQ, 6 – 49%N lors de reprise tardive de la cyclicité ; $P = 0,66$). Trois vaches n'ont jamais dépassé le seuil de 6%N au cours des 35 premiers JPP. Parmi les 37 vaches restantes, neuf n'ont présenté qu'un seul prélèvement endométrial $\geq 6\%N$. Les 28 autres en ont présenté au moins deux.

Les neutrophiles constituaient la population leucocytaire majoritaire quelque soit le délai post-partum. Leurs proportions variaient entre 79 et 100% des leucocytes totaux selon les dates de prélèvement. Les autres sous-populations cellulaires étaient constituées par les monocytes et les lymphocytes, dont la proportion, minimale, ne présentait pas de variation significative au cours du temps. Les granulocytes éosinophiles étaient absents de 95% des frottis.

Figure 25 : Profils d'évolution du taux de neutrophiles endométriaux au cours du post-partum.

- a. Inflammation de niveau constant et faible (n = 3)
- b. Inflammation de niveau élevé (n = 3)
- c. Inflammation initialement décroissante avec pics de réactivation (n = 4)

Chaque courbe représente l'évolution individuelle d'une femme.



Evolution de l'inflammation génitale

Au cours du post-partum

D'une façon générale, l'inflammation endométriale montrait une décroissance progressive au cours du temps (figure 24). La diminution du %N était forte (réduction du %N utérin de 19% entre 21 et 35 JPP) jusqu'au nadir de la courbe situé entre 45 et 60 JPP. Au-delà, la proportion de neutrophiles était constante au cours du temps.

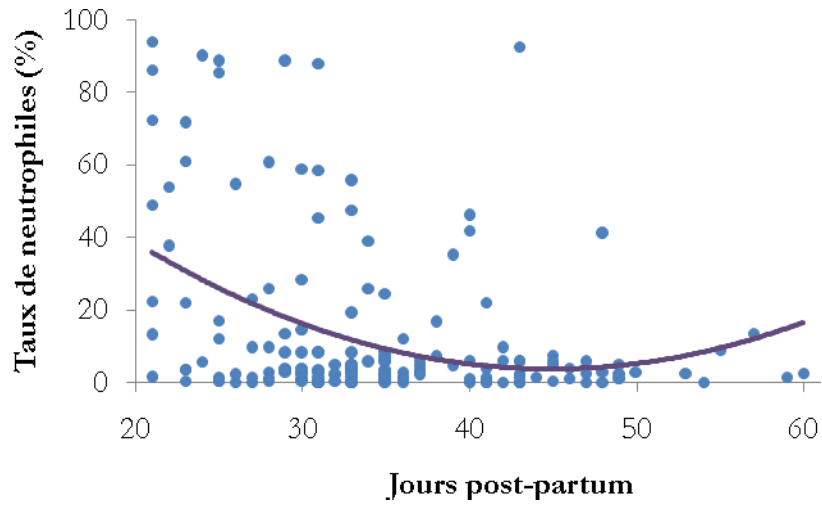
Les variables incluses en tant que facteurs de confusion potentiels (NEC, production laitière et cétose) dans la modélisation par la fonction polynôme n'étaient pas significativement associées à la variation du %N utérin. L'évolution du %N utérin en post-partum précoce était similaire que les vaches aient repris ($n = 26$) ou non ($n = 14$) leur cyclicité avant 35 JPP (annexe 1). Cependant, la décroissance initiale (entre 21 et 35 JPP) semblait moins rapide chez les vaches sans reprise précoce de la cyclicité. La proportion de neutrophiles atteinte à $J45 \pm 7$ JPP n'était pas significativement différente selon le moment de reprise de la cyclicité (médiane, 8%N ; EIQ, 3 – 38%N chez les vaches avec une reprise précoce de la cyclicité, *vs.* médiane, 9%N ; EIQ, 2 – 33%N lors de reprise tardive de la cyclicité ; $P = 0,45$). Malgré une variation non significative du %N, la modélisation suggérait une augmentation du %N au-delà de 60 JPP chez les vaches présentant une reprise précoce de la cyclicité (annexe 1).

Au sein des 40 animaux suivis, nous avons pu distinguer, outre le modèle général décrit par la fonction polynôme (à savoir, une décroissance initiale du %N jusqu'à atteindre un seuil basal et constant au cours du post-partum tardif ; $n = 5$; figure 24), trois profils différents d'évolution du statut inflammatoire. Pour faciliter la lecture, seuls certains animaux ont été représentés en figure 25. Le premier profil ($n = 8$; figure 25.a.) se distingue par un %N utérin faible pendant toute la durée du suivi et notamment en post-partum précoce (avant 35 JPP). Inversement, la figure 25.b. représente les individus ($n = 5$) dont l'inflammation utérine, initialement élevée ($> 30\%N$), était persistante au cours du temps. Les périodes de décroissance de l'inflammation individuelle, si elles avaient lieu, étaient courtes et suivies d'une augmentation brusque du %N. Enfin, le troisième profil (figure 25.c. ; $n = 22$) décrit des dynamiques d'évolution similaires à celles de la modélisation générale (figure 24), mais à la décroissance initiale du %N faisaient suite des pics de réactivation de l'inflammation. Ces pics apparaissaient à des délais post-partum variables. Une vache pouvait présenter un ou plusieurs pics de réactivation au cours du temps. Ces réactivations de l'inflammation étaient généralement fortes ($+ 10\%N$ entre deux prélèvements) et fugaces (d'une durée inférieure à sept jours).

Dans une seconde étude, les taux de neutrophiles endométriaux de 168 vaches ont été représentés en fonction du délai de prélèvement, compris entre 21 et 60 JPP (figure 26). D'une

Figure 26 : Représentation du taux de neutrophiles (%N) endométriaux en fonction du nombre de jours post-partum (JPP) ; (n = 168).

La fonction polynôme est d'équation : $\%N = 118 - 5,07 \times JPP + 0,056 \times JPP^2$, pour $21 \leq JPP \leq 60$.



Evolution de l'inflammation génitale

Au cours du post-partum

façon générale, les taux de neutrophiles diminuaient au cours du post-partum, selon une fonction polynôme de deuxième degré ($\%N = 118 - 5,07 \times JPP + 0,056 \times JPP^2$, pour $21 \leq JPP \leq 60$).

2.2. Evolution physiologique de l'inflammation endocervicale

A 21 ± 7 JPP, la médiane (EIQ) d'inflammation cervicale des quarante vaches recrutées pour la première étude était de 8%N (3 – 33%N). Chez les vaches présentant une reprise précoce de la cyclicité, la médiane (EIQ) d'inflammation, à 21 ± 7 JPP, était de 8%N (3 – 38%N), contre 9%N (2 -33%N) pour les vaches présentant une reprise tardive de la cyclicité ($P = 0,99$). En se basant sur le seuil d'inflammation pathologique avant 35 JPP défini dans la partie II.A., la prévalence des cervicites était élevée, sachant que seulement sept vaches n'avaient présenté aucun prélèvement cytologique supérieur à 5%N dans les 35 JPP. Douze vaches présentaient un seul prélèvement $\geq 5\%N$, alors que chez la majorité d'entre elles ($n = 21$), on comptait au moins deux prélèvements $\geq 5\%N$ dans les 35 premiers jours post-partum.

La population leucocytaire des frottis cervicaux était composée en grande majorité de granulocytes neutrophiles quelque soit le délai post-partum. Le taux de neutrophiles était compris entre 88 et 100% des leucocytes totaux.

La dynamique d'évolution générale du taux de neutrophiles endocervicaux (figure 27) était similaire à celle de l'utérus (figure 24). Le nadir de la courbe était atteint vers 45 JPP, ensuite la fonction dessinait un plateau. Avant ce délai de 45 JPP, la courbe présentait une décroissance légèrement moins marquée que celle de l'utérus, sachant que la proportion de neutrophiles endocervicaux diminuait en moyenne de 12% entre 21 et 35 JPP.

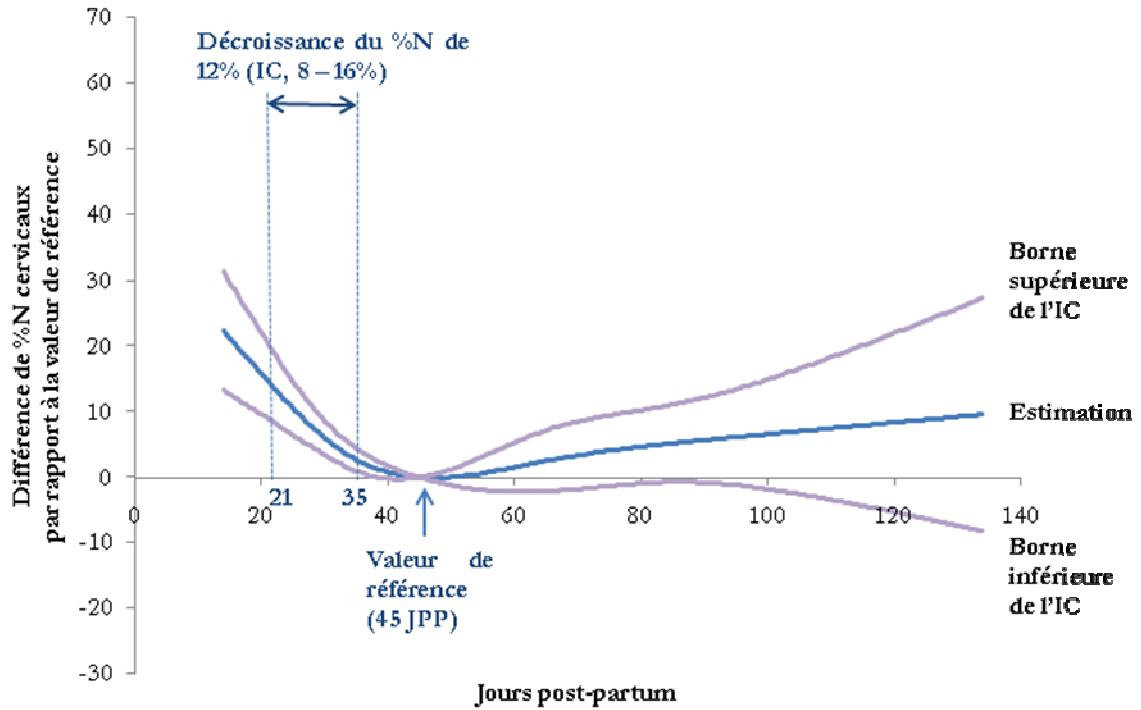
Les variables incluses dans le modèle (NEC, production laitière et cétose subclinique) n'étaient pas significativement associées au %N endocervical. Comme pour l'utérus, on notait une tendance à une moindre décroissance du %N entre 21 et 35 JPP chez les vaches ayant repris leur cyclicité avant 35 JPP (annexe 2). Le taux de neutrophiles atteint au nadir de la courbe (*i.e.*, 45 ± 7 JPP) n'était pas significativement différent selon que l'animal ait présenté une reprise précoce (médiane, 1%N ; EIQ, 0 – 8%N) ou tardive (médiane, 1%N ; EIQ, 0 – 8%N ; $P = 0,65$) de la cyclicité ovarienne. Contrairement à la dynamique d'évolution du %N endocervicaux des vaches sans reprise précoce de la cyclicité, la modélisation suggérait une augmentation du %N à partir de 60 JPP pour les cas de reprise précoce de la cyclicité ovarienne (annexe 2).

Les dynamiques individuelles des courbes étaient semblables à celles décrites pour l'utérus. Les individus pouvaient être regroupés selon les mêmes profils, à savoir une décroissance initiale

Figure 27 : Modélisation de l'évolution du taux de neutrophiles endocervicaux en fonction du délai post-partum (n = 40).

%N : taux de neutrophiles ; IC : intervalle de confiance ; JPP : jours post-partum

La ligne horizontale (axe des abscisses) correspond à une différence nulle du %N par rapport à la valeur de référence du %N mesurée pour un délai de 45 JPP.



Evolution de l'inflammation génitale

Au cours du post-partum

de l'inflammation jusqu'à atteindre un niveau basal et constant ($n = 5$), une inflammation à niveau constant et faible ($n = 6$), une inflammation à niveau élevé et constant ($n = 4$) ou le profil le plus fréquent ($n = 25$), celui d'une inflammation initialement décroissante présentant un ou plusieurs pics de réactivation.

Concernant les cas de réactivation de l'inflammation au cours du post-partum, l'évolution comparée des %N cervicaux et utérins de trois individus a été représentée (figure 28). Nous avons pu remarquer dans certains cas, une parfaite juxtaposition des courbes d'inflammation du col et de l'utérus (figure 28.a.), signalant une réactivation concomitante des deux compartiments. La figure 28.b. décrit un %N endocervicaux basal de 40 à 55 JPP, initiant une croissance 15 jours suivant l'apparition d'un pic d'inflammation dans le corps utérin. Inversement, la figure 28.c. présente le cas d'un pic d'inflammation endocervicale à 35 JPP qui a été suivi 14 jours après d'une réactivation de l'inflammation endométriale, elle-même accompagnée 21 jours plus tard d'une augmentation du %N endocervicaux. Notons que dans les trois cas présentés, la réactivation de l'inflammation génitale était toujours de forte intensité (variation du %N) et fugace.

Dans une deuxième étude, nous avons représenté l'inflammation endocervicale en fonction du délai post-partum (figure 29). Similairement à l'évolution du statut inflammatoire endométrial, le taux de neutrophiles endocervicaux décrivait une décroissance en fonction du temps (%N = $47 - 1,69 \times \text{JPP} + 0,016 \times \text{JPP}^2$, $21 \leq \text{JPP} \leq 60$).

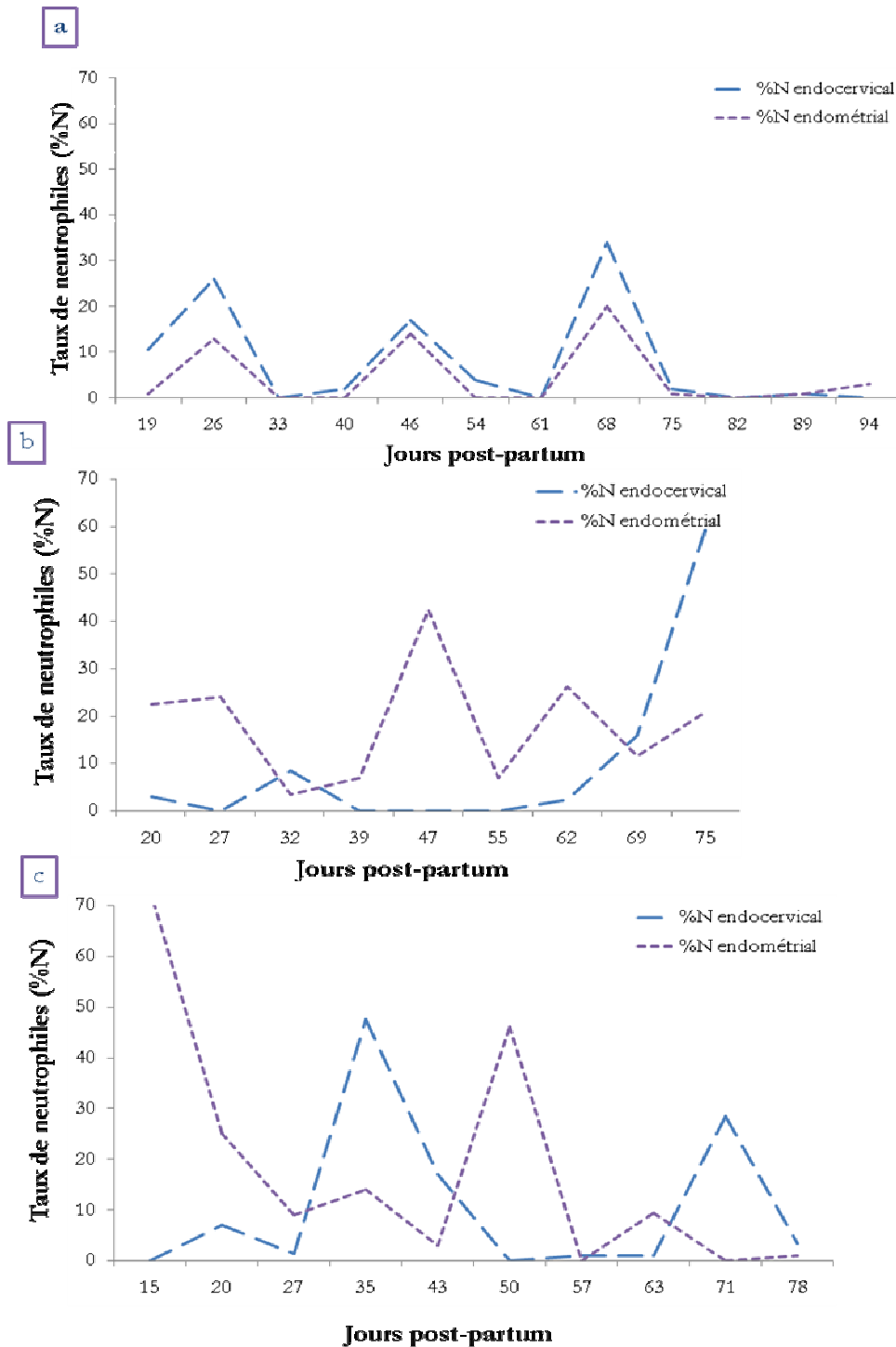
3. Discussion

L'objectif de cette étude était de décrire chez la vache laitière, l'évolution du %N génitaux au cours du post-partum. La dynamique générale suggérait une décroissance du niveau d'inflammation en début d'évolution, puis la stabilisation du taux de neutrophiles en post-partum tardif.

La décroissance physiologique de l'inflammation endométriale a été suggérée chez la vache allaitante jusqu'à 50 JPP, les animaux examinés au-delà de cette date présentant une inflammation cytologique basale [73]. Chez la vache laitière, cette décroissance a été suggérée par la diminution des seuils d'inflammation tolérable en fonction du délai post-partum. Les études qui recrutent des animaux sur un délai étendu proposent généralement différents seuils de neutrophiles en fonction du temps. C'est le cas de Kasimanickam *et al.* [4] qui calculent un seuil d'inflammation tolérable de 18%N entre 20 et 33 JPP, puis de 10% entre 34 et 47 JPP. Les seuils de Galvao *et al.* [133], bien qu'inférieurs à ceux de l'étude précédente, diminuent en fonction du délai post-partum

Figure 28 : Evolution comparée du taux de neutrophiles endocervicaux et endométriaux au cours du post-partum : profils individuels.

- a. Juxtaposition des pics de réactivation d'inflammations endocervicale et endométriale
- b. Retard de l'inflammation endométriale sur l'inflammation endocervicale
- c. Retard de l'inflammation endocervicale sur l'inflammation endométriale



Evolution de l'inflammation génitale

Au cours du post-partum

(seuils de 8,5 ; 6,5 et 4%N pour les durées de 21, 35 et 49 JPP, respectivement). L'évolution du statut inflammatoire cytologique cervical n'avait quant à elle jamais été décrite, sachant que cet examen n'a été que rarement étudié chez les bovins. En plus de prélèvements réalisés à différents moments post-partum, comme réalisés par Santos *et al.* [73], nous avons procédé ici à un suivi individuel de la cytologie post-partum du tractus génital femelle.

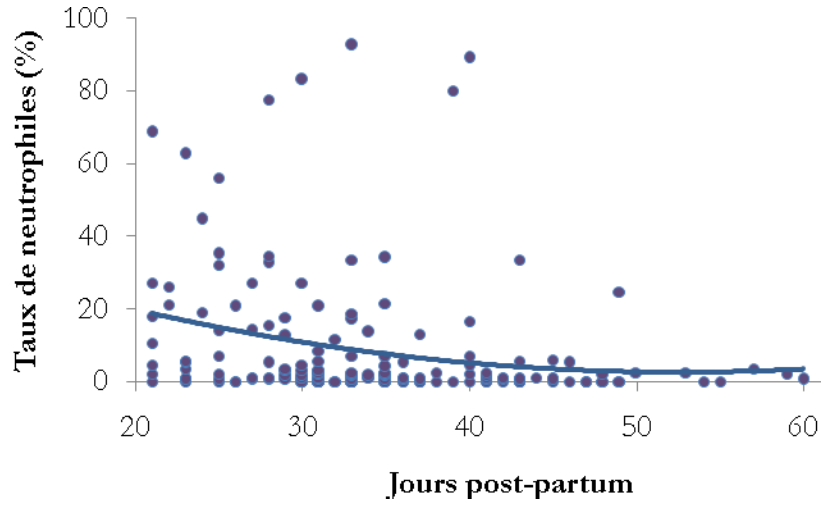
L'objectif premier de l'étude était de décrire l'évolution du %N au cours du post-partum. L'utilisation d'une fonction polynôme a permis la modélisation d'une variable quantitative (la proportion de neutrophiles) en fonction du temps. Par rapport aux fonctions par morceaux (*i.e.*, définies pour certains intervalles de temps) en escaliers, la modélisation par une fonction polynôme autorise une représentation plus souple de l'évolution du taux de neutrophiles en lissant la courbe entre deux intervalles de temps [111].

L'involution utérine correspond au retour de l'utérus à son état normal après le vêlage. Ce processus se compose de remaniements anatomiques, histologiques, bactériologiques, biochimiques et cytologiques, qui évoluent simultanément. L'involution anatomique correspond à la réduction de la taille de l'utérus jusqu'à sa taille initiale (pré-gravidique), atteinte en 30 et 45 jours. Celle du col est plus longue : elle s'achève entre 50 et 60 JPP [11]. La diminution considérable du volume du tractus génital à l'échelle macroscopique se traduit par des remaniements microscopiques correspondant histologiquement à une dégénérescence suivie d'une régénération de l'épithélium caronculeux. La partie superficielle des caroncules desquamé à partir du dixième JPP. La régénération de l'épithélium utérin se développe alors par-dessus le vestige de la masse caronculeuse [54]. Le retour au statut histologique normal nécessite une vingtaine de jours de plus que le retour à un statut macroscopique normal [54]. L'involution histologique de l'endomètre est donc complète vers 50 à 65 JPP. Enfin, alors que 90% des utérus sont contaminés par des bactéries au moment du vêlage, il n'en reste plus que 9% entre 45 et 60 jours post-partum. La cavité utérine redevient finalement stérile en six à sept semaines [6,145]. Donc globalement, si on rassemble les différents aspects de l'involution utérine, ce phénomène atteint son terme entre 50 et 60 JPP.

Les neutrophiles constituent la population leucocytaire prédominante des frottis génitaux tout au long du post-partum. Notre étude montre que la proportion de neutrophiles diminue au cours du temps, jusqu'à atteindre un niveau basal vers 45 à 60 JPP. L'évolution de l'inflammation cytologique correspond donc parfaitement aux délais des autres remaniements de la période d'involution. Contrairement à la réduction anatomique du volume du tractus génital [11], la durée de l'involution cytologique semble similaire pour le compartiment cervical et le compartiment

Figure 29 : Représentation du taux de neutrophiles (%N) endocervicaux en fonction du nombre de jours post-partum (JPP) ; (n = 168).

La fonction polynôme est d'équation : $\%N = 47 - 1,69 \times JPP + 0,016 \times JPP^2$, avec $21 \leq JPP \leq 60$.



Evolution de l'inflammation génitale

Au cours du post-partum

utérin. De vitesse de décroissance équivalente, les proportions de neutrophiles endocervicaux et endométriaux atteignent un niveau basal peu avant la mise à la reproduction des animaux.

Cette diminution physiologique du %N peut expliquer la diminution de la prévalence des endométrites cytologiques au moment de la mise à la reproduction. En vaches laitières, la prévalence de 67% à 21 JPP (au seuil de 8,5%), n'est plus que de 37% à 49 JPP, avec un seuil pathologique néanmoins inférieur à celui utilisé en post-partum précoce (4%N) [133]. Chez des vaches allaitantes et au seuil de 5,5%N, la prévalence évolue de 82% avant 50 JPP à 17% après cette date [73]. Gautam *et al.* [132] observent la guérison spontanée de la plupart des endométrites cliniques de gravité moyenne, ce qui renforce l'hypothèse d'une diminution du statut inflammatoire utérin au cours du temps.

Avant 45 JPP, malgré une dynamique globale de décroissance du %N, certains animaux présentaient une inflammation génitale faible et constante sur toute la durée de l'étude. Nous pouvons émettre l'hypothèse que ce profil correspond aux 10% d'animaux épargnés par la contamination de la lumière utérine au moment du vêlage [15], qui ne font pas l'objet d'une mobilisation de l'immunité cellulaire dans l'utérus.

En post-partum tardif, l'évolution de l'inflammation génitale est apparue plus variable en fonction des animaux. La dynamique générale correspondait à une stabilisation du %N génital au niveau inflammatoire atteint vers 45 JPP. Mais notre étude a décrit des animaux dont le %N élevé persistait au cours du post-partum. Ces phénomènes de persistance de l'inflammation, au moins sous leur forme clinique (identification de sécrétions mucopurulentes ou purulentes), sont associés à une atteinte plus marquée des performances de reproduction que dans les cas de résolution spontanée du phénomène [132]. Enfin, certains animaux présentaient une décroissance initiale de l'inflammation, conforme au modèle général, mais suivie d'un ou plusieurs épisodes de réactivation en post-partum tardif. Cette réactivation, souvent sévère (associée à un %N élevé) et fugace (phénomène d'une durée de moins de sept jours), apparaissait à divers moments du post-partum, ce qui conférait au modèle global un aspect plat. Le seul cas de réactivation de l'inflammation identifié dans la littérature a été rapporté sous une forme clinique [132] : parmi les animaux déclarés affectés d'endométrite clinique lors d'un premier diagnostic entre 15 et 60 JPP (identification de pus au vaginoscope ou présence de liquide dans l'utérus lors de PTR), dont les sécrétions redevenaient claires lors d'un second examen un mois plus tard, 9% présentaient à nouveau un mucus vaginal anormal à l'un des contrôles suivants.

La comparaison des évolutions du %N en post-partum tardif du col et de l'utérus suggère un lien entre ces deux compartiments. Certains profils correspondent à une parfaite

Evolution de l'inflammation génitale

Au cours du post-partum

concomitance des pics de réinflammation. D'autres suggèrent une antériorité de l'inflammation endocervicale, ou au contraire une diffusion du processus inflammatoire de l'endomètre utérin vers la muqueuse cervicale. Notre étude semble indiquer une communication à double sens entre le compartiment cervical et le compartiment utérin.

Les différents profils d'évolution des taux de neutrophiles reposent peut-être sur des statuts individuels immunitaires ou énergétiques distincts, favorisés par certains facteurs de risque. L'intensification de la production laitière est associée à un déficit énergétique marqué, suggéré par une note d'état corporel insuffisante et l'apparition de cétose subclinique [51,88]. Dans notre étude, les trois variables incluses dans le modèle (NEC, production laitière et cétose subclinique) ne se sont finalement pas révélées associées au %N génitaux. Pourtant certaines études ont montré que le statut énergétique post-partum pouvait interférer avec l'immunité génitale et notamment la capacité de l'animal à résoudre la contamination bactérienne initiale [132]. Une étude plus orientée cherchant à caractériser les facteurs associés à une inflammation génitale a été réalisée dans la suite du travail (partie IV.C.).

L'influence des stéroïdes sexuels a également été testée. Nous n'avons observé aucune différence majeure entre les profils d'évolution des vaches avec reprise précoce ou tardive de la cyclicité. Seule une légère augmentation du %N en post-partum tardif était suggérée (variation non significative) chez les vaches présentant une reprise précoce de la cyclicité ovarienne. Certaines études ont montré que les stéroïdes sexuels avaient un impact sur la fonction immunitaire générale ou génitale, *in vivo* ou *in vitro* [42,83,149]. Nous avons donc réalisé le suivi des examens cytologiques endocervicaux et endométriaux au cours du cycle, en parallèle de dosages d'œstradiol et de progestérone, pour essayer d'évaluer l'effet des stéroïdes sur l'immunité génitale.

B. Au cours du cycle œstral

Publications et travaux associés

Congrès international (communication orale)

- **Deguillaume L**, Pineau C, Choukroun H, Fournier R, Chastant-Maillard S. Influence of the estrus cycle stage on post-partum endometrial inflammation in the cow. *In : 14th annual conference of the European Society of Domestic Animal Reproduction*. Eger, Hongrie, 15-18 Septembre 2010, 61.

Thèse de Doctorat Vétérinaire (encadrement)

- Choukroun H., Pineau C. (2010) *Influence du cycle œstral sur l'inflammation génitale chez la vache Prim'Holstein*. Thèse Méd. Vét., Alfort, 94p.

Evolution de l'inflammation génitale

Au cours du cycle œstral

La contamination bactérienne de la lumière utérine post-partum perturbe la croissance folliculaire ovarienne, trouble l'ovulation et la reprise de la cyclicité post-partum [57,150]. Inversement, les hormones stéroïdiennes influencent le système de défense de l'utérus, modifiant la réponse aux agents agresseurs et l'intensité du phénomène inflammatoire [81]. Plusieurs études, de résultats contradictoires, se sont intéressées au rôle des stéroïdes sexuels dans l'immunité génitale. Certaines montrent que l'utérus est résistant aux infections durant la phase folliculaire, lorsque la progestéronémie est basale [42,80,83,91]. D'autres indiquent à l'opposé que le chimiotactisme et l'activité phagocytaire des neutrophiles augmentent sous l'action de la progestérone [149,151].

Notre objectif était de savoir de quelle façon l'immunité génitale évoluait au cours du cycle œstral. Nous avons donc quantifié les taux de neutrophiles endométriaux et endocervicaux en parallèle des variations des concentrations plasmatiques de progestérone et d'œstradiol, au cours du cycle œstral.

1. Protocole

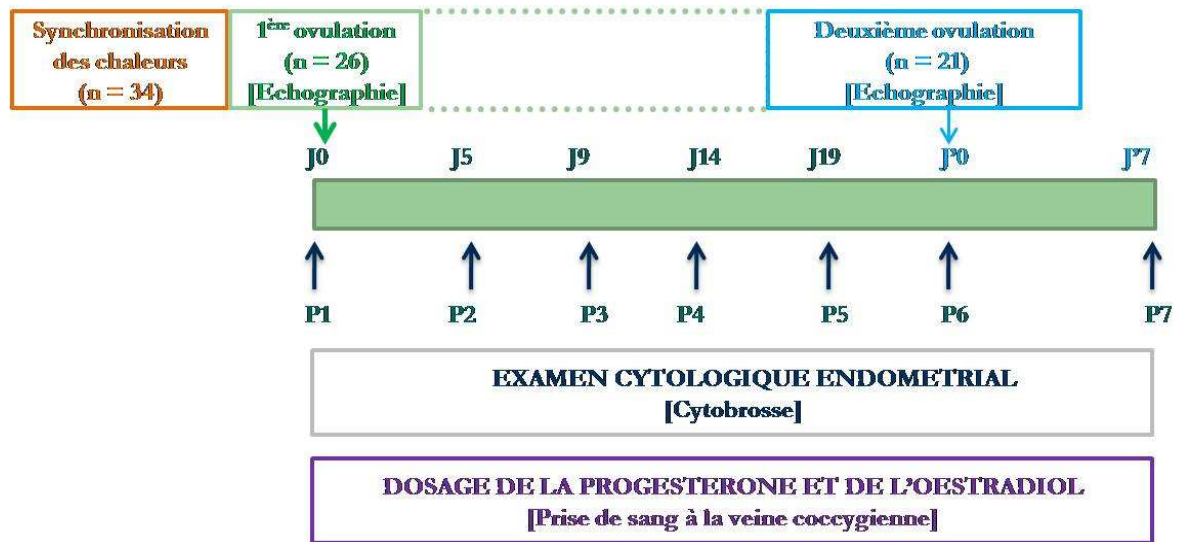
1.1. Recrutement et synchronisation des chaleurs

L'étude s'est déroulée sur deux périodes de dix semaines, dans un élevage de vaches Prim'Holstein. Pour être recrutée, une vache devait se trouver entre 20 et 75 JPP et présenter un corps jaune de plus de 2 cm de diamètre identifié par échographie transrectale. La NEC était évaluée à l'inclusion. Le jour du recrutement, les vaches présentant des sécrétions mucopurulentes ou purulentes à l'examen vaginal à l'aide d'une main gantée n'ont pas été incluses dans l'étude.

Les protocoles de synchronisation des chaleurs étaient différents pour les deux périodes de recrutement. Lors de la première période, les 14 vaches recrutées recevaient une injection de PGF2 α par voie intramusculaire (500 μ g cloprosténol, Estrumate®, Intervet, Beaucauzé, France). Lors de la deuxième période, les 20 vaches étaient synchronisées à l'aide d'un protocole GPG (OVSYNCH). Elles recevaient, le jour même, une injection intramusculaire d'un analogue de GnRH, la buséréline (100 μ g, Receptal®, Intervet), puis sept jours plus tard, une injection intramusculaire de PGF2 α (500 μ g cloprosténol, Estrumate®) et enfin deux jours plus tard, une nouvelle injection de buséréline (100 μ g, Receptal®).

Figure 30 : Protocole d'étude de l'impact des stéroïdes sexuels sur l'immunité génitale de la vache.

J : jour ; P : prélèvement.



Evolution de l'inflammation génitale

Au cours du cycle œstral

Les ovaires étaient examinés par échographie transrectale (Tringa®, Pie Medical, Hospimed) pendant quatre à huit jours après la dernière injection, afin de réaliser une cartographie ovarienne (mesure de diamètre des follicules en croissance) et de repérer le moment de l'ovulation (noté J0). L'ovulation a été définie comme le jour de disparition d'un follicule mesuré à environ 2 cm de diamètre le jour précédent. Suite à l'ovulation, les animaux n'étaient pas inséminés. La mise à la reproduction était reportée à la fin de l'étude.

1.2. Détermination de la phase du cycle œstral et du statut inflammatoire génital

Une fois le moment de l'ovulation déterminé après le traitement d'induction des chaleurs, des prélèvements cytologiques endocervicaux et utérins étaient effectués à J0, J5, J9, J14, J'0 et J'7, avec une variabilité de plus ou moins un jour. Un frottis supplémentaire était effectué à $J19 \pm 1$ jour si l'animal n'avait pas encore ovulé à cette date. J'0 correspondait à la nouvelle ovulation en fin de cycle, définie par la disparition d'un follicule de 2 cm de diamètre, à l'échographie ovarienne. Une prise de sang accompagnait chaque prélèvement cytologique. Le schéma expérimental est présenté en figure 30.

Les taux d'œstradiol 17β et de progestérone ont été mesurés par ELISA et chemiluminescence. Les taux de neutrophiles endocervicaux et endométriaux ont été calculés selon la méthode précédemment décrite.

1.3. Analyses statistiques

Une analyse de données répétées (Proc Mixed, SAS, ajustement de Bonferroni) a été effectuée, afin de décrire l'évolution des courbes moyennes de progestéronémie, d'œstradiolémie et des taux de neutrophiles génitaux.

L'influence des hormones stéroïdiennes sur les %N génitaux a été modélisée par des fonctions polynômes par morceaux, de quatre ou cinq nœuds. Pour l'étude de l'influence de la progestéronémie sur l'inflammation, la valeur de référence choisie était celle de 1 ng/ml (3,2 nmol/l). Les valeurs de référence pour les études concernant l'impact de l'œstradiolémie [E2] et du ratio E2/P4 ont été fixées aux valeurs médianes, soit 25,5 pg/ml et 0,94, respectivement.

Figure 31 : Evolution des taux moyens de progestérone (—) et d'œstradiol (—) au cours du cycle œstral (n = 26 aux jours J0, J5, J9 et J14 ; n= 14 à J19, n = 18 à J'0 et n = 17 à J'7).

Les barres verticales correspondent à la valeur de l'erreur standard de la moyenne (ou SEM). Les valeurs portant des lettres différentes sont significativement différentes ($P < 0,01$, par analyse de données répétées).

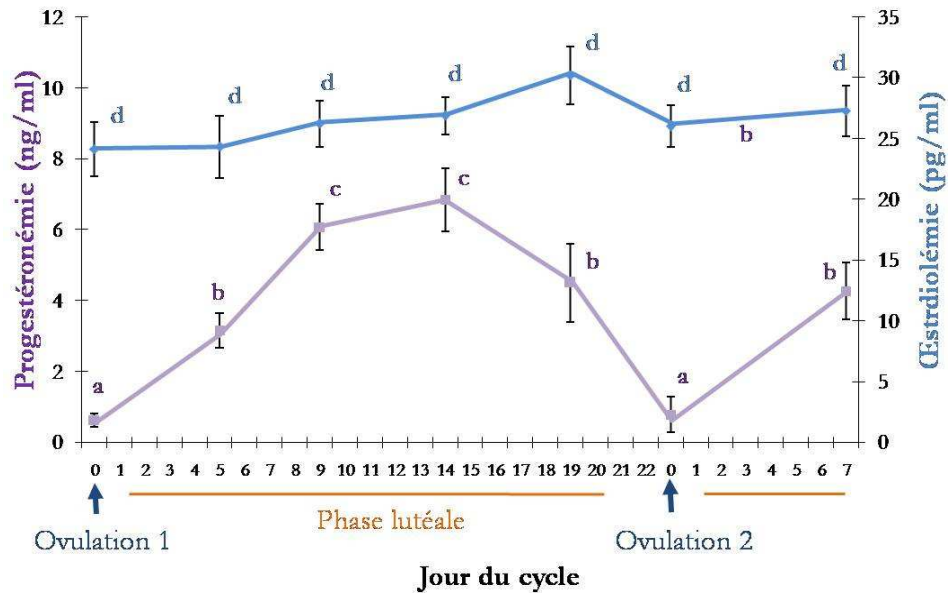
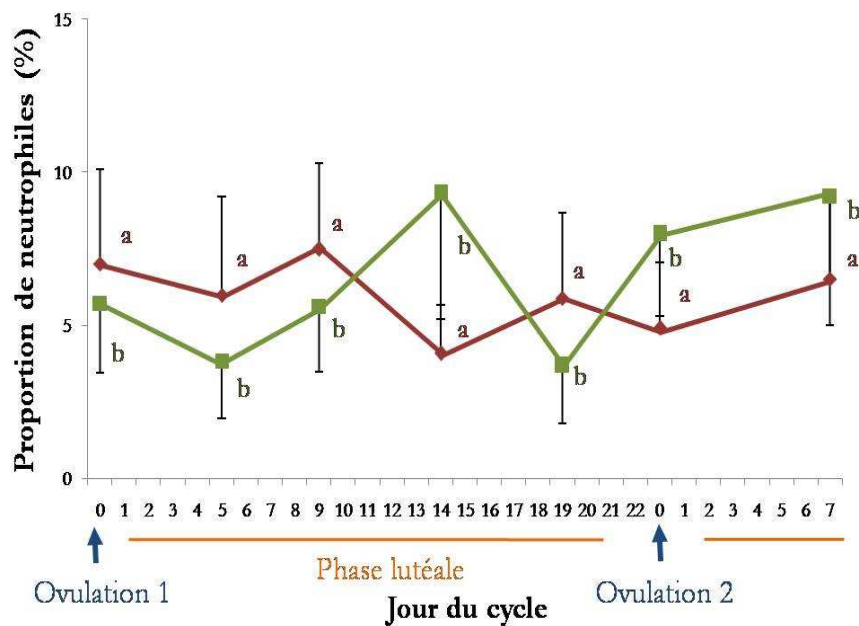


Figure 32 : Evolution des taux moyens de neutrophiles utérins (—) et cervicaux (—) au cours du cycle œstral (n = 26 aux jours J0, J5, J9 et J14, n=14 à J14, n= 18 pour J'0 et n = 17 pour J'7).

Les barres verticales correspondent à la valeur de l'erreur standard de la moyenne (ou SEM).



2. Résultats

2.1. Evolution des taux d'hormones stéroïdes et de neutrophiles génitaux au cours du cycle œstral

2.1.1. Evolution de la progestéronémie et de l'œstradiolémie

Au total, 26 vaches ont été incluses dans l'étude (médiane NEC, 2 ; EIQ, 1,5 – 2), dont neuf au cours de la première période de recrutement et 17 au cours de la seconde. Suite au protocole d'induction de l'œstrus par les PGF 2α , 64% des vaches ont ovulé (9/14), contre 85% (17/20) après traitement OVSYNCH. A la fin de l'étude, cinq des 26 vaches qui avaient initialement répondu au traitement n'avaient pas manifesté de nouvelle ovulation en fin de cycle : deux présentaient un corps jaune persistant et trois ne montraient aucune structure ovarienne de diamètre supérieur à 10 mm. Pour les autres, la durée du cycle œstral (intervalle entre les deux ovulations) était de médiane (EIQ) 23 j (19 – 27 j).

Pendant la durée du protocole, des écoulements purulents à la vulve ont été diagnostiqués chez quatre vaches. Elles ont été exclues de l'étude, en raison du traitement (céfapirine 500 mg, par voie intrautérine, METRICURE®, Intervet).

Les courbes représentant l'évolution des taux moyens d'hormones stéroïdes au cours du cycle œstral (figure 31) ont été réalisées à effectif variable, en fonction des données disponibles à chaque prélèvement (dépendant de la durée du cycle et de l'exclusion d'animaux traités).

La progestéronémie augmentait d'une valeur de 0,62 ng/l à J0, à une valeur de 6,07 ng/ml à J9 ($P < 0,05$). La courbe formait ensuite un plateau de J9 à J14. Le taux de progestérone diminuait ensuite entre J14 et J'0 (de 6,84 ng/ml, à 0,78 ng/ml, $P < 0,05$), avant d'augmenter de nouveau de J'0 à J'7 (de 0,78 ng/ml, à 4,26 ng/ml, $P < 0,05$). Il n'existait pas de différence significative entre les valeurs de progestéronémie à J0 et J'0, ni entre J5 et J'7.

Nous n'avons pas observé de variation significative du taux moyen d'œstradiol au cours du cycle étudié. La médiane (EIQ) d'œstradiolémie était de 25,5 pg/ml (19,9 – 29,9 pg/ml).

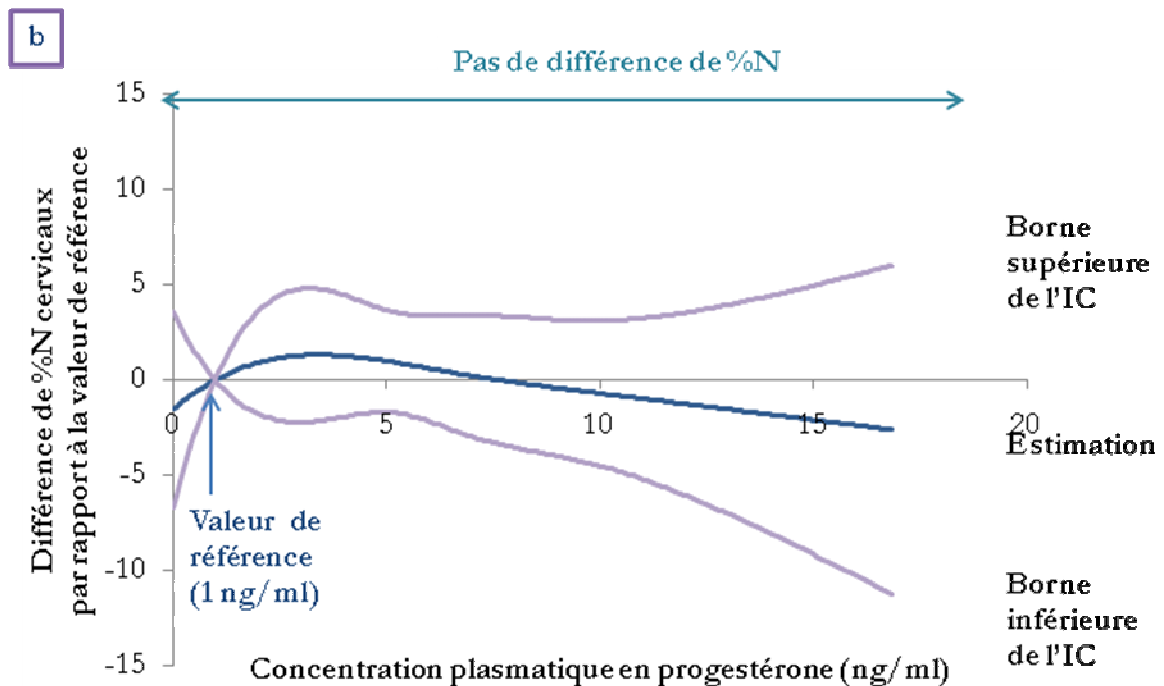
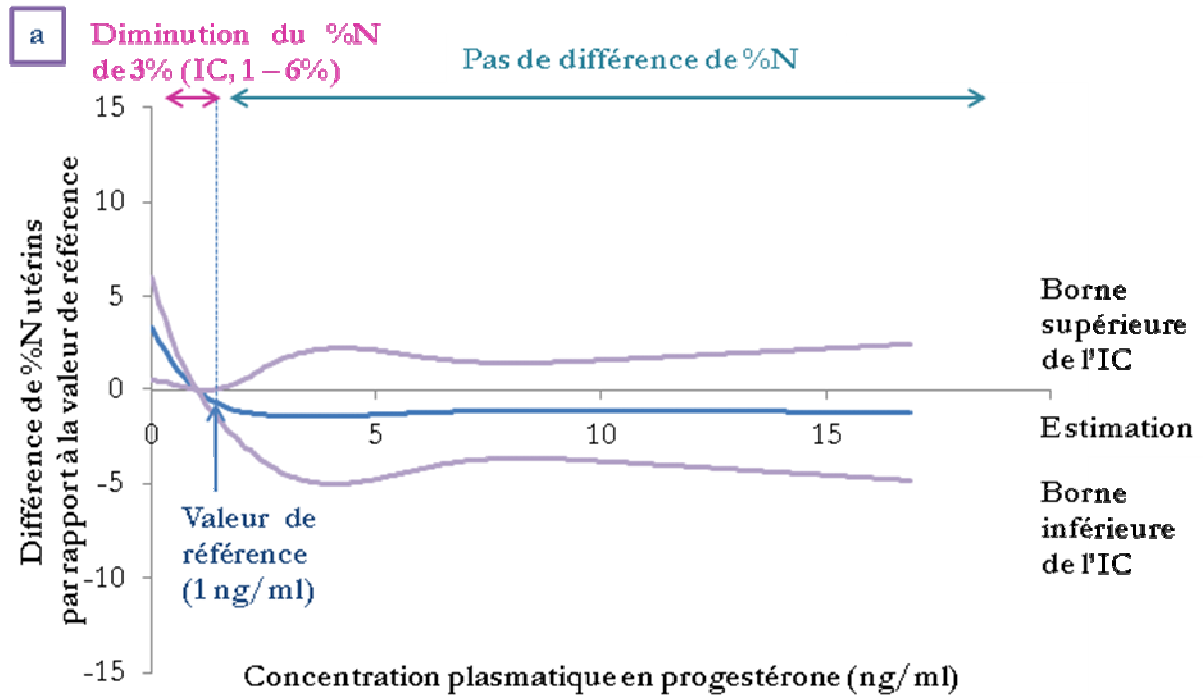
2.1.2. Evolution des taux de neutrophiles génitaux

Le jour du recrutement (médiane, 46 JPP ; EIQ, 38 – 60 JPP ; $n = 26$), sept vaches (27%) présentaient un %N utérins $\geq 6\%$. Toutes les vaches positives à l'inclusion présentaient un %N utérins $< 6\%$ à J5. Cependant, seules deux vaches sont ensuite restées négatives toute la durée du cycle. Les autres ($n = 5$) ont toutes présenté un pic de réactivation de l'inflammation $\geq 6\%$ N sur

Figure 33 : Evolution du taux de neutrophiles en fonction de la progestéronémie ; modélisation par une fonction polynôme.

- a. Taux de neutrophiles utérins
- b. Taux de neutrophiles endocervicaux

%N : Taux de neutrophiles ; IC : Intervalle de confiance



un des prélèvements suivants. Sur les 19 vaches négatives à l'inclusion, seules cinq le sont restées toute la durée du cycle œstral. Les autres ont présenté un ou plusieurs pics de réactivation de l'inflammation, qui ne dépassait jamais trois prélèvements consécutifs et était dans la majorité des cas observé sur un seul prélèvement cytologique.

Concernant l'examen cytologique endocervical, sept vaches étaient $\geq 5\%N$ à J0 (dont quatre animaux positifs pour l'examen cytologique endométrial à J0). Parmi les animaux présentant une inflammation le jour d'inclusion, trois sont restés $\geq 5\%N$ au moins deux prélèvements consécutifs. Les autres ($n = 4$), $< 5\%N$ à J5, ont toutes présenté au moins un autre prélèvement $\geq 5\%N$ au cours du cycle. Ces réactivations de l'inflammation étaient généralement de courte durée (moins de deux prélèvements consécutifs). Chez les 19 vaches négatives le jour du recrutement, six le sont restées toute la durée du cycle. Les autres ont présenté des pics d'inflammation fugace, l'inflammation étant redevenue basale lors du prélèvement suivant.

L'analyse des données répétées n'a pas montré de variation significative des moyennes des $\%N$ génitaux au cours du cycle œstral (figure 32).

2.2. Influence des stéroïdes sexuels sur l'inflammation génitale

2.2.1. Influence de la progestéronémie

La fonction polynôme modélisant l'évolution du $\%N$ utérins en fonction de la concentration plasmatique en P4 (figure 33.a.) a montré une décroissance de 4,5% (IC95% ; 0,8 – 8,1%) du taux de neutrophiles entre les valeurs de P4 de 0 et 2 ng/ml. La courbe formait ensuite un plateau au-delà d'une concentration en progestérone de 2 ng/ml. Le niveau d'inflammation endométriale observée était significativement plus élevé pour une progestéronémie faible (< 1 ng/ml) que pour des valeurs de P4 > 1 ng/ml.

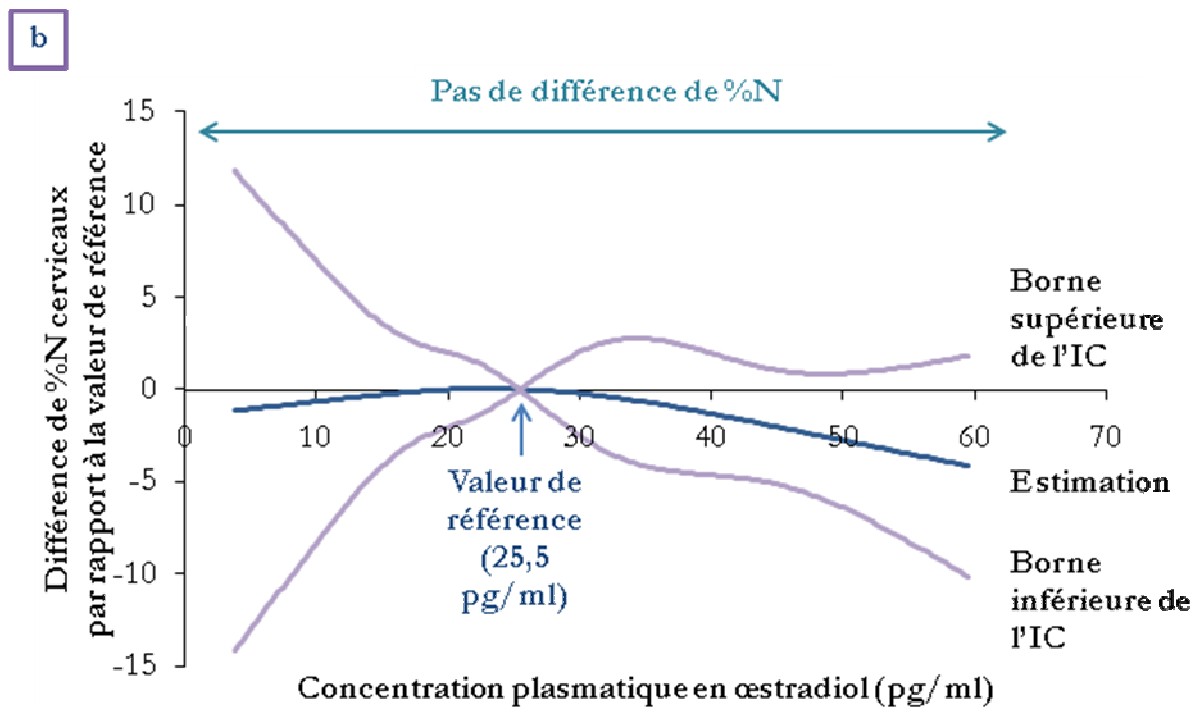
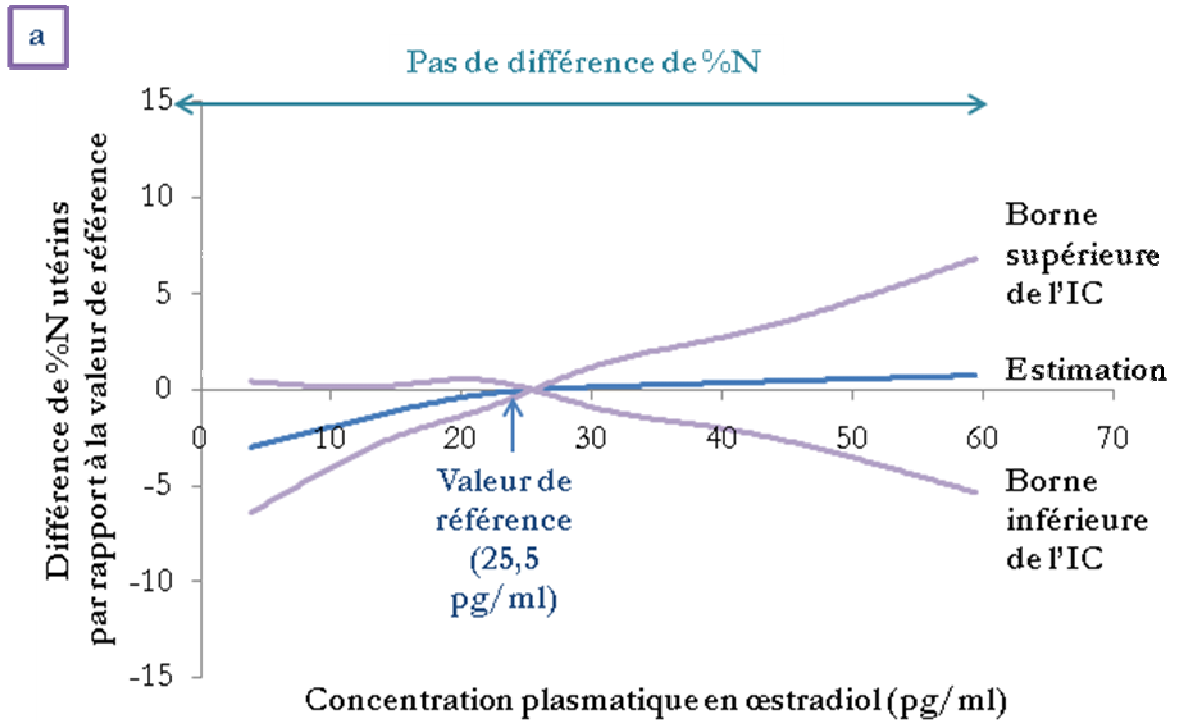
Concernant l'examen cytologique endocervical, nous n'avons pas observé de variation significative du $\%N$ en fonction de la concentration en P4 par rapport à l'inflammation cervicale mesurée pour une progestéronémie de 1 ng/ml (figure 33.b.).

Afin de rechercher un effet retard de la concentration de P4 sur l'inflammation génitale, nous avons modélisé la variation du $\%N$ aux prélèvements $[p + 1]$ et $[p + 2]$, en fonction de la concentration plasmatique de P4 à un prélèvement $[p]$. Aucun impact du taux de P4 sur le statut inflammatoire génital ultérieur n'a été mis en évidence.

Figure 34 : Evolution du taux de neutrophiles en fonction de l'œstradiolémie ; modélisation par une fonction polynôme.

- a. Taux de neutrophiles utérins
- b. Taux de neutrophiles endocervicaux

%N : Taux de neutrophiles ; IC : Intervalle de confiance



2.2.2. Influence de l'œstradiolémie

Les deux courbes modélisant l'évolution des %N endométriaux et endocervicaux en fonction de l'œstradiolémie étaient de profils similaires (figure 34). Aucun impact significatif du taux d'E2 sur le %N n'a été mis en évidence.

Similairement à l'étude de l'influence de la progestéronémie, l'impact de l'œstradiolémie à un prélèvement [p] sur l'inflammation génitale aux prélèvements [p + 1] et [p + 2] a été évalué. Aucun effet du taux d'E2 sur l'inflammation génitale ultérieure n'a été mis en évidence.

2.2.3. Influence du ratio œstradiol sur progestérone

L'étude de l'influence du $\log(E2/P4)$ sur l'inflammation génitale a révélé des courbes d'allures similaires pour le col et pour l'utérus (figure 35). De forme globalement plate, la modélisation révélait néanmoins une augmentation du %N utérin au-delà d'une valeur du ratio supérieure à 2 environ. La dynamique d'évolution de l'inflammation était similaire pour le col, bien que l'augmentation du %N ne fût pas significative pour les valeurs élevées du ratio.

L'influence du ratio à un prélèvement [p] sur le statut génital ultérieur (*i.e.*, [p + 1] et [p + 2]) n'était pas significative.

3. Discussion

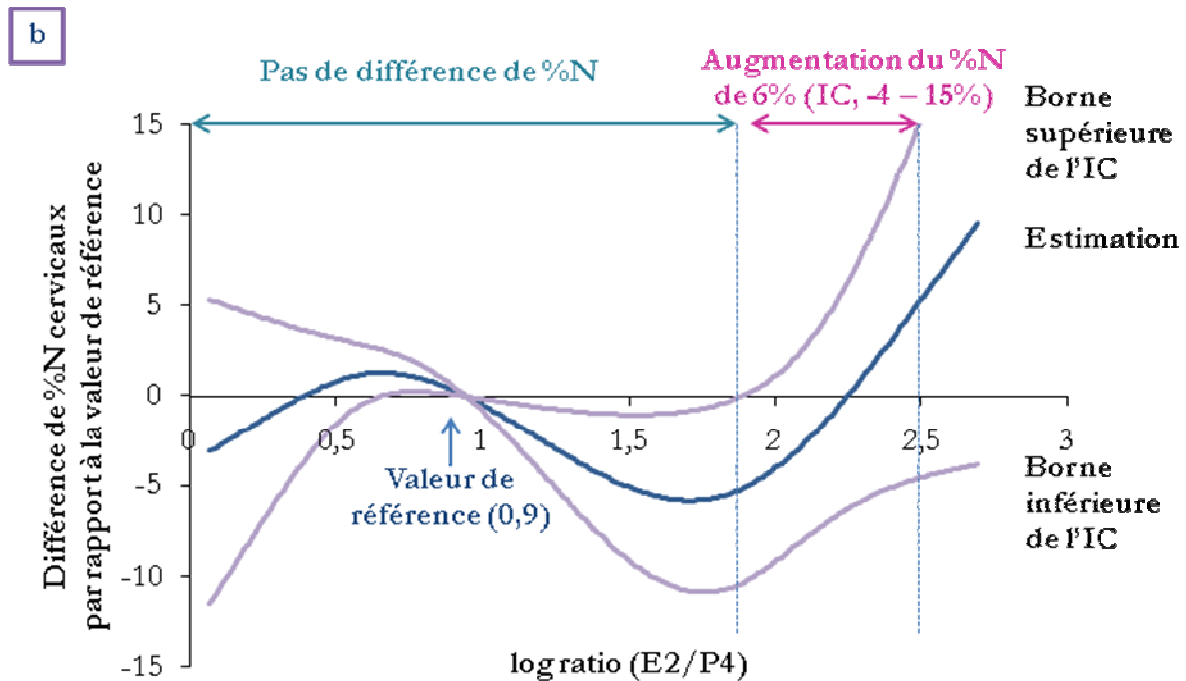
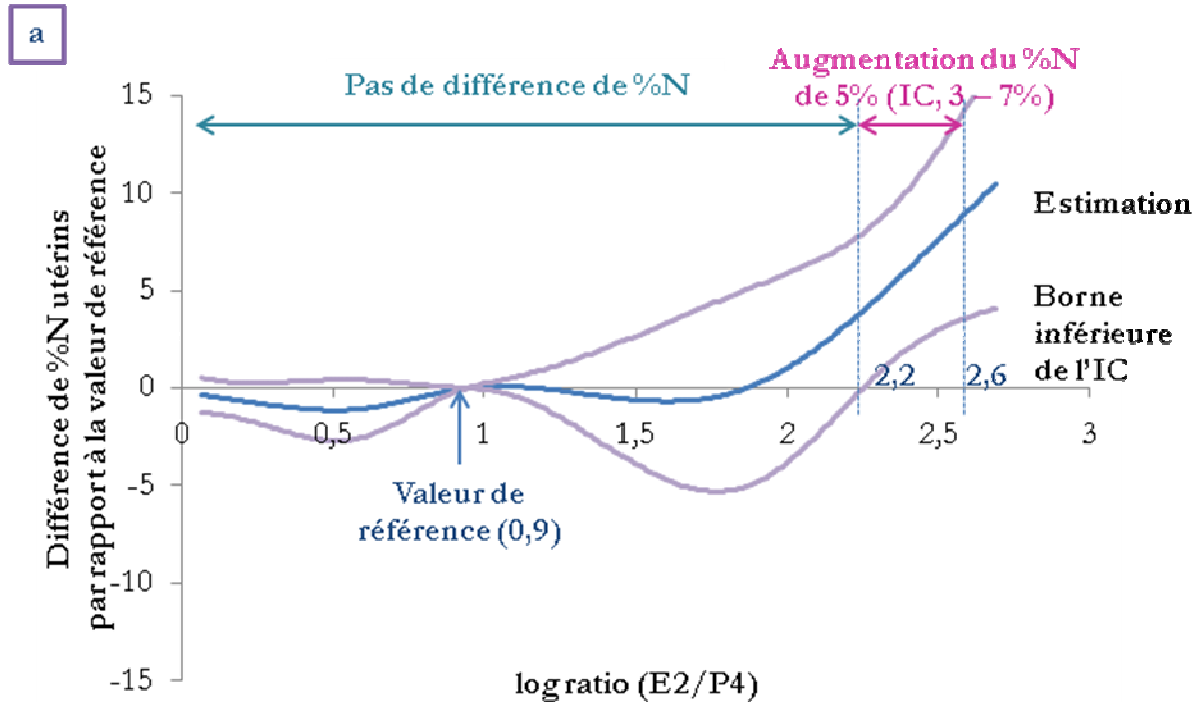
Notre étude a montré que le taux de neutrophiles génitaux variait en fonction des concentrations circulantes en stéroïdes sexuels, plus particulièrement en fonction de la concentration de progestérone plasmatique.

La courbe de progestéronémie moyenne suit l'évolution décrite par Noakes [152]. Les deux cycles sexuels étaient équivalents. Les jours J0 et J'0 correspondaient à la phase folliculaire ($P4 < 1\text{ng/ml}$) et les jours J5, J9, J14 et J'7 à la phase lutéale ($P4 \geq 1\text{ng/ml}$). La fréquence des prises de sang explique que la courbe d'œstradiolémie au cours du cycle étudié n'ait pas montré d'inflexion significative en rapport avec les vagues folliculaires. Pour observer des variations significatives du taux d'œstradiol circulant, il est recommandé de multiplier les prises de sang. Ainsi, Wolfenson *et al.* [153] ont dosé l'œstradiol toutes les trois heures à partir du début de l'expression des chaleurs jusqu'au moment de l'ovulation et toutes les huit heures en dehors de cette période. Par ailleurs, dans notre étude, cinq des 34 vaches suivies n'ont pas réovulé. Deux de ces vaches ont eu une interruption de la cyclicité et trois ont présenté un corps jaune persistant. Ces affections

Figure 35 : Evolution du taux de neutrophiles (%N) en fonction du log ratio œstradiol (E2) sur progestérone (P4) ; modélisation par une fonction polynôme.

- a. Taux de neutrophiles utérins
- b. Taux de neutrophiles endocervicaux

%N : Taux de neutrophiles ; IC : intervalle de confiance



représentent respectivement selon une méta-étude (regroupant 12 études) de 1 à 10% et de 1 à 20% des anomalies de la reprise d'activité sexuelle après le vêlage [154]. Pour les autres, la durée du cycle œstral était conforme à la littérature qui décrit une durée moyenne comprise entre 21,8 et 25,3 jours selon le nombre de vagues folliculaires [155].

L'influence de la phase du cycle œstral sur l'immunité génitale de la vache a été largement étudiée depuis les 50 dernières années [80,81,83,85,149,156]. On peut aussi faire le parallèle avec un récent travail sur l'immunité mammaire et notamment le comptage cellulaire somatique [157]. Il est admis que l'utérus présente une sensibilité réduite aux infections en phase folliculaire [80,83,91]. Après inoculation intra-utérine de pathogènes tels qu'*Arcanobacterium pyogenes* ou *Escherichia coli* en début de la phase lutéale, la vache développe une infection utérine, alors qu'elle est résistante à la contamination si l'inoculation a lieu pour un niveau basal de P4 [156]. De plus, sur des vaches ovariectomisées, l'apport exogène de progestérone crée un milieu favorable à la croissance bactérienne, alors que l'administration d'œstradiol rend l'utérus relativement résistant aux infections [83]. Suite à ces observations, les PGF2 α ont d'ailleurs été proposées dans le traitement des infections utérines chez des vaches présentant un corps jaune, pour leurs propriétés lutéolytiques et inductrices d'œstrus [38].

Malgré le concept général de plus grande résistance à l'infection en phase folliculaire, différentes études apportent des résultats contradictoires (tableau 10 ; [158-164]). Celles qui mettent en évidence une augmentation de la migration leucocytaire lors de concentration élevée en P4 [84,120,149] expliquent la plus grande susceptibilité de l'utérus aux infections en phase lutéale par une diminution de l'activité phagocytaire des neutrophiles [81,120].

Notre étude a montré que la progestérone constituait le stéroïde ovarien majeur du contrôle de la capacité de l'utérus à résister aux infections. L'évolution du %N utérin en fonction du ratio E2/P4 confirmait cette observation. Cette évolution n'est cependant pas constatée pour l'inflammation endocervicale. Le %N endocervical n'était pas affecté par les taux de stéroïdes sexuels, ce qui justifie de comparer séparément le compartiment cervical et le compartiment utérin.

Par ailleurs, notre étude n'a pas révélé d'influence décalée des concentrations en P4 et E2 sur la diapédèse génitale. Seule l'association entre les taux de stéroïdes et les résultats de l'examen cytologique à un moment donné a été mise en évidence. L'immédiateté de l'effet des stéroïdes sexuels est confirmée par des études *in vitro*. En effet, l'augmentation du chimiotactisme utérin est

Tableau 10 : Influence de la phase du cycle œstral sur la population leucocytaire.

Référence	Population cellulaire	Chimiotactisme cervical	Chimiotactisme utérin	Activité phagocytaire	Activité bactéricide	Variation hormonale
Hawk <i>et al</i> , [158]	Neutrophile			Maximum en phase folliculaire		Physiologique
Killingbeck et Lamming, [159]	Neutrophile			Maximum en phase folliculaire		Physiologique
Roth <i>et al</i> , [83]	Neutrophile				Maximum en phase folliculaire	Physiologique
Anderson <i>et al</i> , [160]	Neutrophile			Pas de variation		Exogène
Lander Chacin <i>et al</i> , [84]	Neutrophile		Maximum en phase lutéale	Pas de variation	Pas de variation	Physiologique
Subandrio et Noakes, [149]	Neutrophile		Maximum en phase lutéale			Exogène
Faundez <i>et al</i> , [161]	Neutrophile		Maximum en phase folliculaire			Exogène
Subandrio <i>et al</i> , [81]	Neutrophile		Maximum en phase lutéale			Exogène
Subandrio <i>et al</i> , [80]	Neutrophile			Pas de variation		Exogène
Dhaliwal <i>et al</i> , [91]	Neutrophile			Minimum sous progestérone		Physiologique
Ahmadi <i>et al</i> , [151]	Neutrophile	Maximum en phase lutéale				Physiologique
Vander Wielen et Kind, [162]	Lymphocyte		Pas de variation			Physiologique
Cobb et Watson, [42]	Lymphocyte		Maximum en phase folliculaire			Physiologique
Stinson <i>et al</i> , [163]	Mastocyte		Maximum en phase lutéale			Physiologique
Stinson <i>et al</i> , [163]	Plasmocyte		Pas de variation			Physiologique
Matsuda <i>et al</i> , [164]	Eosinophile		Augmente à partir de l'œstrus			Physiologique

Evolution de l'inflammation génitale

Au cours du cycle œstral

observée 15 à 18 heures après traitement des animaux par de l'œstradiol exogène et inoculation intra-utérine de glycogène [81,84].

Notre étude a montré une proportion supérieure de neutrophiles dans l'endomètre utérin en phase folliculaire par rapport à la phase lutéale. D'autres expériences sont nécessaires pour déterminer si cette infiltration a un effet délétère sur les performances de reproduction et s'il faut tenir compte de ce résultat dans l'interprétation d'un frottis cytologique. Les seuils d'inflammation limite tolérable ont été généralement définis sur la base d'une altération des paramètres de reproduction, sans tenir compte des concentrations en œstradiol et progestérone plasmatiques au moment du prélèvement utérin. La question est de savoir s'il faut augmenter le seuil d'inflammation pathologique lorsque la progestéronémie est basse ou le rapport (E2/P4) élevé, pour ne pas établir à tort un diagnostic d'inflammation utérine. Une autre solution serait de restreindre la mise en œuvre du prélèvement cytologique à un stade donné du cycle œstral pour standardiser les conditions, comme cela est proposé chez la jument notamment (milieu de l'œstrus ; [69]).

C. Facteurs favorisant l'inflammation génitale

Publications et travaux associés

Mémoire de fin d'Etudes Agronomiques (encadrement)

- Gondran C, (2009) *Approche globale des inflammations du tractus génital chez la vache laitière*. Mémoire, ENITA, Clermont-Ferrand, 44p.

Plusieurs facteurs de risque sont connus pour favoriser l'apparition d'infections utérines (tableau 11 ; [165-171,171-177]). Ils sont principalement liés au vêlage et au déficit énergétique post-partum, mais les différentes études ne peuvent être facilement comparées en raison de la pluralité des définitions d'infection utérine qu'elles utilisent. Certaines font référence aux métrites (*i.e.*, écoulements vaginaux nauséabonds, accompagnés d'une atteinte de l'état général de l'animal dans les 21 JPP), d'autres aux endométrites cliniques (*i.e.*, écoulements vaginaux purulents au-delà de 21 JPP) ou aux inflammations cytologiques (*i.e.*, forte proportion de leucocytes dans l'endomètre au-delà d'un seuil pathologique, en l'absence de signes cliniques, après 21 JPP) [1]. Les critères utilisés pour quantifier les effets de ces infections utérines sont également variables : apparition de symptômes cliniques d'infection utérine ou, indirectement, diminution des performances de reproduction. La récente utilisation de l'examen cytologique utérin [4] a permis une caractérisation plus fine de l'inflammation génitale, mais ce changement de niveau d'analyse nécessite une réévaluation des facteurs de risque. D'autre part, les agents favorisant l'inflammation endocervicale, qu'elle soit clinique ou cytologique, n'ont jamais été décrits.

Notre étude avait donc pour objectif d'identifier les facteurs associés à une inflammation utérine ou endocervicale. Les variables étudiées étaient constituées de critères propres à l'animal (parité, élevage), au vêlage (gémellité, conditions de vêlage), aux affections post-partum (rétention placentaire, déplacement de caillette, coma vitulaire, métrite, hypocalcémie, mammite clinique et subclinique), ou à la présence d'un déficit énergétique au cours des trois premiers mois de lactation (NEC, PL, TP et TB).

1. Protocole

Quatre vingt treize vaches issues de trois élevages laitiers ont été prélevées par examen cytologique entre 21 et 35 JPP. Leur NEC a été évaluée le jour de l'examen. Parallèlement, le recueil des commémoratifs concernait les données de parité, d'élevage d'origine, de conditions de vêlage (sans aide, aide facile ou aide difficile) et d'affections post-partum, telles que rétention placentaire (*i.e.*, incapacité à expulser les enveloppes fœtales dans les 24 premières heures post-partum), métrite, coma vitulaire, déplacement de caillette ou mammite clinique. A partir des données du Contrôle Laitier, les TP, TB, PL et taux cellulaires des trois premiers mois de lactation ont été enregistrés.

Une vache laitière a été considérée comme haute productrice si sa production laitière était supérieure à 35 kg/j à l'un des contrôles. Une cétose subclinique a été définie par la présence à au moins un des contrôles d'un TP inférieur au seuil limite défini par Ennuyer [148] en fonction de

Tableau 12 : Médianes (écart interquartile) des données du Contrôle Laitier au cours des trois premiers mois de lactation (n = 106).

Variable	1er mois	2ème mois	3ème mois
Production laitière (kg/j)	36,5 (31,8 - 42,3)	38,4 (33,7 - 44,6)	37,2 (33,0 - 41,1)
Taux cellulaire (*1000 cellules/ml)	118 (54 - 430)	111 (46 - 372)	157 (53 - 469)
Taux protéique (g/kg)	30,2 (28,5 - 32,2)	28,6 (27,1 - 30,2)	29,7 (28,3 - 31,5)
Taux butyreux (g/kg)	41,6 (37,1 - 47,5)	35,6 (32,6 - 39,0)	35,1 (33,1 - 39,0)

la production laitière ou un rapport TB/TP $\geq 1,5$. Les mammites subcliniques étaient définies par la présence d'au moins un comptage cellulaire $\geq 300\ 000$ cellules/ml.

Trois analyses ont été conduites de façon similaire, afin de caractériser les facteurs associés spécifiquement à chaque inflammation génitale (*i.e.*, col et utérus). Les médianes d'inflammation génitale ont été comparées par les tests de Willcoxon et de Kruskal-Wallis. Dans un second temps, le taux de neutrophiles a été classé qualitativement selon le seuil d'inflammation pathologique défini dans la partie II.a. (*i.e.*, 6%N pour l'utérus et 5%N pour le col). Le test du chi-deux a permis la comparaison des prévalences des inflammations cytologiques en fonction des différents facteurs testés. Enfin, nous avons quantifié l'association entre l'inflammation génitale entre 21 et 35 JPP et des facteurs propres à l'animal ou au vêlage par le calcul des Odds Ratios (brut et ajusté ; Proc Logistic ; SAS® 9.2). Seules les expositions précédant l'examen cytologique ont été testées, soit les cinq variables suivantes : la ferme, la parité, les conditions de vêlage, la gémellité et la NEC.

2. Résultats

Le jour de l'examen (médiane, 30 JPP ; EIQ, 25 – 32 JPP), les taux de neutrophiles endocervicaux et utérins avaient pour médiane (EIQ) 3% (1 – 15%) et 5% (1 – 24%), respectivement. La NEC était de 2,5 (EIQ, 2 - 2,5).

Notre échantillon comptait seulement 25 vaches primipares. Les vêlages s'effectuaient en majorité sans aide : seuls 27% des vêlages avaient nécessité une aide (facile ou difficile) sur l'ensemble des trois élevages. Cependant, dans l'un des élevages, les interventions humaines étaient largement plus fréquentes que dans les deux autres (57% de vêlages assistés). La proportion de jumeaux était très faible (6%). Les affections post-partum restaient relativement peu fréquentes sur l'échantillon : 8% de rétention placentaire, 4% d'hypocalcémie, 2% de déplacement de caillette, 3% de métrite et 12% de mammite clinique, soit un total de seulement 20 vaches (19%) qui avait développé au moins une pathologie post-partum.

Les médianes (EIQ) des résultats du Contrôle Laitier sont présentées en tableau 12. Au pic de lactation, la médiane (IQR) de production par vache et par jour était de 38,4 kg de lait. Seules 15 vaches n'étaient pas définies haute productrice. Le TP était alors minimal (médiane, 28,6 g/kg ; EIQ, 27,1 – 30,2 g/kg). Le taux butyreux diminuait au cours des trois premiers mois pour atteindre un minimum de 35,1 g/kg au troisième mois de lactation. La médiane du taux cellulaire variait entre 110 000 et 156 500 cellules/ml sur les trois premiers mois de lactation.

Tableau 13 : Comparaison des médianes d'inflammations utérine et cervicale en fonction de certains facteurs (test de Willcoxon); (n = 93 vaches).

NEC : note d'état corporel ; affections PP : affections post-partum ; VLHP : vache laitière haute productrice ; mammite SC : mammite subclinique

Facteur	Inflammation utérine			Inflammation cervicale		
	Avec facteur	Sans facteur	P	Avec facteur	Sans facteur	P
NEC	5%	4%	0,14	4%	2%	0,44
Parité	4%	2%	0,32	3%	3%	0,83
Vêlage assisté	9%	4%	0,40	4%	2%	0,10
Affections PP	5%	4%	0,94	3%	3%	0,72
Jumeaux	24%	4%	0,29	9%	3%	0,33
VLHP	4%	5%	0,74	3%	2%	0,53
Cétose	5%	4%	0,36	3%	2%	0,37
Mammite SC	5%	4%	0,78	2%	3%	0,74

Tableau 14 : Prévalence des inflammations utérine $\geq 6\%N$ (n = 40) et cervicale $\geq 5\%N$ (n = 38) en fonction de certains facteurs (test du Chi-deux).

Facteur	Inflammation utérine			Inflammation cervicale		
	Avec facteur	Sans facteur	P	Avec facteur	Sans facteur	P
NEC	47%	40%	0,49	47%	35%	0,27
Parité	47%	32%	0,19	41%	40%	0,92
Velage assisté	59%	34%	0,02	50%	36%	0,19
Affections PP	40%	44%	0,76	50%	38%	0,35
Jumeaux	67%	41%	0,23	50%	40%	0,64
VLHP	42%	47%	0,75	42%	33%	0,52
Cétose	49%	38%	0,27	47%	35%	0,27
Mammite SC	48%	38%	0,33	42%	40%	0,87

Tableau 15 : Etude des facteurs de risque d'inflammations utérine et cervicale (n = 106 vaches).

ORb : Odd ratio brut ; ORa : Odd ratio ajusté

Facteur	Inflammation utérine				Inflammation cervicale			
	ORb	IC 95%	ORa	IC 95%	ORb	IC 95%	ORa	IC 95%
NEC	0,75	0,33 - 1,71	2,32	0,83 - 6,50	0,48	0,21 - 1,10	2,28	0,87 - 5,97
Parité	0,53	0,20 - 1,39	1,96	0,64 - 5,94	0,95	0,37 - 2,42	1,05	0,38 - 2,93
Velage assisté	2,78	1,15 - 6,72	2,76	0,91 - 8,39	1,77	0,74 - 4,22	1,84	0,62 - 5,42
Jumeaux	2,83	0,49 - 16,31	3,80	0,60 - 24,30	1,49	0,28 - 7,79	1,63	0,28 - 9,40
Elevages								
Elevage 1	1,00		1,00		1,00		1,00	
Elevage 2	0,69	0,07 - 7,32	1,10	0,09 - 13,25	1,86	0,24 - 14,64	2,19	0,25 - 19,17
Elevage 3	2,35	0,99 - 5,59	2,36	0,74 - 7,48	1,51	0,64 - 3,57	1,65	0,53 - 5,13

La comparaison des médianes d'inflammation endométriale et endocervicale par le test de Willcoxon est présentée en tableau 13. Le test de Kruskal-Wallis a été utilisé pour comparer les médianes des %N dans les trois élevages. Les médianes d'inflammation utérines étaient de 4, 3 et 8%N pour les fermes 1, 2 et 3, respectivement ($P = 0,55$). Les médianes des taux de neutrophiles endocervicaux étaient de 2, 5 et 3%N pour les fermes 1, 2 et 3, respectivement ($P = 0,40$). L'analyse quantitative n'a révélé aucun facteur significativement associé au taux de neutrophiles utérins ou cervicaux (tableau 13).

L'analyse qualitative (test du chi-deux ; tableau 14) des taux de neutrophiles endométriaux et endocervicaux n'a pas non plus montré de facteurs liés à l'animal (parité, ferme, production laitière) ou au statut énergétique et métabolique (NEC, cétose, affections du post-partum) associé à l'inflammation cytologique entre 21 et 35 JPP. Seul le nombre de cas d'inflammation endométriale était significativement différent en fonction des conditions de vêlage. En effet, 59% des vaches dont le vêlage avait nécessité une aide facile ou difficile ($n = 32$) présentaient une inflammation supérieure à 6%N, contre seulement 34% des vaches dont le vêlage n'avait pas été assisté ($n = 61$; $P < 0,05$; tableau 14). Ce constat n'a pas été observé concernant la prévalence des inflammations endocervicales.

Le calcul des Odds Ratios est présenté dans le tableau 15. Pour la majorité des expositions testées, le calcul des OR n'était pas significativement différent de 1, avec des valeurs d'intervalles de confiances très étendues. Seule l'association entre les conditions de vêlage et l'inflammation endométriale possédait un OR brut > 1 . Suite à l'ajustement par les autres facteurs (élevage, NEC, parité et jumeaux), l'OR ajusté, d'une valeur similaire à l'OR brut, n'était néanmoins plus significativement différent de zéro (ORa, 2,76 ; IC95%, 0,91 – 8,39 ; tableau 15).

3. Discussion

Notre étude n'a pas révélé l'existence de facteurs propres à l'animal, à son statut énergétique ou métabolique significativement associés à la présence d'une inflammation génitale entre 21 et 35 JPP. Un manque de puissance statistique en est probablement une cause, comme le reflète les intervalles de confiance du calcul des OR. Des critères sont communément identifiés dans la littérature (durée de gestation, mortalité embryonnaire, présence de jumeaux, dystocies ou rétention placentaire), mais ils sont le plus souvent associés à la présence de métrite, et non d'inflammation utérine au-delà de 21 JPP [177]. Par ailleurs, comme pour d'autres variables (tableau 10), l'effet de la parité en tant que facteur de risque est controversée. Certaines études rapportent une fréquence plus élevée d'inflammations endométriales chez les primipares [166],

d'autres chez les vaches de parités élevées [47]. Bruun *et al.* [178] expliquent la plus forte prévalence chez les primipares par des difficultés de vêlages plus fréquentes et ils attribuent la plus grande susceptibilité des vaches de parité trois par rapport à celles de parité deux, en raison d'un processus d'involution retardé de l'utérus.

Un grand nombre d'études s'accorde sur le lien entre la dystocie et les infections utérines, la prévalence des endométrites étant généralement plus élevée chez les vaches ayant présenté un vêlage difficile [172,177,179]. L'assistance au vêlage est décrite par Potter *et al.* [177] comme l'un des principaux facteurs de risque d'endométrite clinique (OR = 2,1 ; IC95%, 1,0 – 4,4), avec la rétention placentaire (OR = 40,3 ; IC95%, 5,0 – 326,4). En raison d'un manque de puissance statistique, nous n'avons pu mettre en évidence ici l'association entre les conditions de vêlage et l'inflammation endométriale cytologique. La plus forte prévalence des endométrites en cas de vêlage dystocique (tableau 14), ainsi que la similitude entre les valeurs des OR bruts et ajustés sont en faveur d'un rôle des conditions de vêlage dans l'apparition des cas d'endométrite.

Dans notre étude, la proportion de vaches ayant présenté des affections lors du post-partum précoce (rétention placentaire, déplacement de caillette, métrite, hypocalcémie et mammite clinique) était faible. Même si chacune de ces affections peut modifier l'immunité de l'animal, nous avons été contraints de les regrouper dans une variable « affection du péri-partum », qui n'est pas apparue associée au statut inflammatoire. Cette variable incluant certaines affections apparues dans le premier mois post-partum, soient postérieures à l'examen cytologique, leur rôle en tant que facteur de confusion n'a pas pu être quantifié par le calcul d'un OR. Dans la littérature, la rétention placentaire apparaît comme le principal facteur de risque d'endométrite, l'odd-ratio atteignant la valeur surprenante de 34,29 [177]. Il peut être logique de penser que les débris nécrotiques présents lors de rétention des annexes fœtales créent un excellent milieu de culture pour les bactéries, favorisent la perméabilité du col et retardent le processus d'involution utérine.

Outre les complications pathologiques, l'alimentation joue un rôle clé dans la reproduction. Un déséquilibre énergétique post-partum est identifié comme un facteur de risque d'infection utérine (tableau 10). Le statut énergétique post-partum peut être évalué par des marqueurs au cours des premiers mois de lactation. La lipomobilisation, quasiment systématique chez la vache laitière, peut être expliquée via la NEC et le taux butyreux. Une vache maigre au moment du vêlage (NEC < 2) possède peu de réserves lipidiques et le TB du premier contrôle est généralement bas. Au contraire, un animal gras au moment du vêlage (NEC ≥ 4) mobilise fortement ses réserves. Or, la lipomobilisation des graisses en post-partum enrichit le lait en

acides gras longs : le TB du premier contrôle est alors élevé et s'accompagne d'un amaigrissement de l'animal, mis en évidence par une perte de NEC supérieure à un point au cours du premier mois post-partum [148]. Les taux protéiques reflètent également la couverture énergétique et le fonctionnement ruminal. L'essentiel de la matière protéique synthétisée par la mamelle provient des acides aminés circulants. La valeur minimale du taux protéique des trois premiers contrôles laitiers est corrélée à la perte d'état corporel. En dessous de la valeur seuil de 28 g/kg (à moduler en fonction de la production laitière qui joue un rôle de dilution du TP), l'énergie devient un facteur limitant pour la fertilité [148]. La cétose subclinique se traduit par une augmentation de la valeur du TB (lipomobilisation des graisses) et une diminution de celle du TP (apport énergétique insuffisant). Elle peut donc être évaluée par l'étude du rapport TB sur TP, qui dépasse le ratio de 1,5. Malgré la fréquente incrimination de la production laitière et du statut énergétique dans les cas d'endométrite clinique [51,177], le lien entre ces facteurs et le statut inflammatoire génital n'a pas été mis en évidence dans ce travail.

Nous avons enfin étudié la relation entre une affection subclinique de la mamelle (au seuil de 300 000 cellules/ml) et la fréquence des inflammations génitales. La littérature établit un lien entre déficit énergétique et infection utérine [51-53], mais aussi avec les infections mammaires [139,177]. Nous pouvons imaginer que les toxines produites lors du processus inflammatoire viennent perturber les défenses immunitaires de l'animal ou qu'un déficit immunitaire général le prédispose au développement d'infections en plusieurs sites (mamelle et utérus). Cependant, cette étude n'a pas permis de confirmer nos hypothèses initiales d'un lien entre l'inflammation mammaire et génitale.

Outre l'association entre les conditions de vêlage et l'examen cytologique utérine, notre étude n'a pas mis en évidence de critères post-partum significativement associés à la présence d'une inflammation génitale. Outre la recherche de facteurs de risque, initialement définis pour les formes cliniques d'endométrite, d'autres investigations semblent nécessaires pour caractériser les facteurs associés à la présence d'une cervicite cytologique.

Cette partie a permis de caractériser l'inflammation endométriale et endocervicale de la vache post-partum et certains de ses facteurs de variation, tels que le délai post-partum et les stéroïdes sexuels. Compte tenu de l'impact de l'inflammation génitale sur les performances de reproduction, aussi bien à court terme qu'à long terme, une inflammation génitale, il est alors nécessaire de définir les méthodes de diagnostic de ces inflammations cytologiques.

IV. Expression clinique et diagnostic des inflammations génitales

En raison de leur forte prévalence en post-partum et de leur impact à court et à long terme sur la fertilité de la vache (se reporter à la partie II.), les inflammations génitales doivent être diagnostiquées en vue de la mise en œuvre d'une thérapeutique.

Contrairement aux métrites, qui apparaissent généralement dans les quinze premiers jours post-partum (au plus tard dans les 21 JPP) et s'accompagnent d'une atteinte de l'état général de l'animal, les endométrites sont caractérisées par des symptômes uniquement locaux, dont l'expression cytologique repose sur la présence d'une inflammation superficielle de l'épithélium utérin au-delà de 21 JPP [1]. En fonction de leur association ou non à des signes génitaux, les inflammations endométriales se divisent en formes clinique et subclinique d'endométrites [1], le diagnostic des cas subcliniques reposant nécessairement sur la mise en œuvre d'un examen cytologique [2]. Par généralisation de l'endométrite, nous pouvons imaginer que la cervicite, inflammation de l'endocol, se divise en une expression clinique et subclinique.

Un grand nombre de techniques sont disponibles pour l'exploration de la santé de l'utérus (se reporter à la partie II.C. de la synthèse bibliographique). L'éleveur et le vétérinaire en font usage en s'appuyant sur la mise en œuvre d'une ou plusieurs techniques.

L'objectif de cette partie de notre travail était tout d'abord d'évaluer les valeurs diagnostiques de techniques macroscopiques par rapport à l'examen cytologique. Vu sous un autre angle, il s'agissait de décrire l'expression clinique de l'inflammation avérée sur le plan cytologique. Dans un second temps, nous avons cherché à décrire à travers deux enquêtes les techniques et critères utilisés actuellement sur le terrain par les éleveurs et les vétérinaires français pour le diagnostic des endométrites.

A. Valeurs diagnostiques des techniques

Publications et travaux associés

Articles publiés

- **Deguillaume L.**, Chastant-Maillard S. (2009) Comment bien diagnostiquer les endométrites de la vache ? *Bull. GTV*, **49**, 101-105.
- Hanzen C, Theron L, Simon A, **Deguillaume L.** (2009) Infections utérines : définitions, symptômes et diagnostic. *Point Vét.*, **299**, 41-46.
- **Deguillaume L.**, Fournier R, Chastant-Maillard S. (2008) Les méthodes de diagnostic des endométrites chez la vache. *Repro Mag*, **n°2**, Intervet, Beaucauzé, France, 6-8.

Congrès international (communication orale)

- **Deguillaume L.**, Boulouis HJ, Thoumire S, Vornière C, Constant F, Geffré A, Fournier R, Chastant-Maillard S. (2008) Comparative evaluation of various techniques for diagnosis of chronic endometritis in cows. *In : XXVth World Buiatrics Congress*. Budapest, Hongrie, 6–11 Juillet 2008, 186.

Congrès national (conférence invitée)

- **Deguillaume L.**, Constant F., Boulouis HJ, Thoumire S, Vornière C, Constant F, Geffré A, Fournier R, Chastant-Maillard S. (2008) Comment évaluer la santé de l'utérus post-partum ? *In : Journées Nationales des GTV*, Nantes, France, 28-30 mai 2008. 25-30.

Thèse de Doctorat Vétérinaire (encadrement)

- Dizien A. (2008) *Etude interspécifique des cytologies génitales pour le diagnostic de l'endométrite. Intérêt diagnostique chez la vache*. Thèse Méd. Vét., Alfort, 97p.

Lauréate de la Faculté de Médecine de Créteil, médaille de bronze.

Thèse de Doctorat Vétérinaire (réalisation)

- **Deguillaume L.** (2007) *Etude comparative des différentes techniques de diagnostic des métrites chroniques chez la vache*. Thèse Méd. Vét., Alfort, 109p.

Lauréate de la Faculté de Médecine de Créteil, médaille d'argent.

Lauréate de l'Académie de Médecine Vétérinaire, médaille d'or.

Mémoire de fin d'Etudes Agronomique (encadrement)

- Gondran C., (2009) *Approche globale des inflammations du tractus génital chez la vache laitière*. Mémoire, ENITA, Clermont-Ferrand, 44p.

Expression clinique et diagnostic de l'inflammation génitale

Valeurs diagnostiques des techniques

Un grand nombre de techniques sont disponibles pour l'évaluation de la qualité (au sens de l'aptitude à permettre la fécondation et la gestation) de l'environnement génital, tels que l'examen histologique ou bactériologique, la palpation transrectale, l'échographie transrectale et l'examen des sécrétions vaginales [39,60,75,88,100]. La biopsie utérine est une technique de choix dans l'évaluation du statut inflammatoire de l'endomètre, mais la complexité de sa mise en œuvre restreint son utilisation à l'étude de cas isolés. Le manque de concordance entre les examens bactériologiques et cytologiques (se reporter à la partie I.D.) n'est pas non plus en faveur d'une utilisation de la culture bactériologique dans le diagnostic des inflammations génitales. Sur le terrain, les vétérinaires praticiens préfèrent généralement des techniques macroscopiques, plus simples de mise en œuvre et caractérisées par la rapidité de leur résultat diagnostique, telles que la palpation transrectale, l'échographie utérine et l'examen macroscopique du mucus vaginal.

Dans le but de caractériser l'expression clinique de l'inflammation génitale post-partum, notre étude a déterminé les valeurs diagnostiques des techniques précédemment citées et s'est intéressée à l'influence de leur ordre de mise en œuvre dans le diagnostic final d'inflammation. Pour finir, le caractère pathogène des sécrétions vaginales en fonction de la proportion de pus a été évaluée à travers une étude bactériologique et une analyse des performances de reproduction.

1. Valeurs diagnostiques des techniques macroscopiques

Les valeurs diagnostiques de trois techniques macroscopiques (palpation transrectale, échographie transrectale et examen des sécrétions vaginales) ont été testées pour l'évaluation du statut inflammatoire génital, le résultat de l'examen cytologique étant considéré comme la référence.

1.1. Protocole

Au total, 93 vaches entre 21 et 35 JPP ont été examinées par cinq techniques, mises en œuvre dans l'ordre suivant : palpation transrectale, échographie transrectale, examen des sécrétions vaginales (recueil par le dispositif Metrichick®), examen cytologique endocervical puis endométrial. Deux analyses ont été conduites séparément pour étudier l'expression clinique d'une inflammation endométriale d'une part et endocervicale d'autre part. Pour chacune d'elles, plusieurs critères diagnostiques spécifiques (reposant sur des données de la littérature) ont été testés, d'abord seuls puis en combinaison (de deux à cinq critères simultanément). Le résultat de l'examen cytologique a été pris comme référence : une femelle était considérée comme atteinte

d'une inflammation utérine si son taux de neutrophiles endométriaux était supérieur ou égal à 6% ; d'une inflammation endocervicale si son %N était supérieur ou égal à 5% ; d'une inflammation génitale si son %N endométriaux était $\geq 6\%$ ou si son %N endocervicaux était $\geq 5\%$.

Les critères testés étaient en palpation transrectale : un diamètre cervical supérieur à 7,5 cm [11,63], une mesure d'au moins une des cornes utérines (à sa base) supérieure à 4 cm de diamètre [126], une consistance anormale des cornes (ferme, dure ou pâteuse, évaluée à l'aide de modèles en silicone, se référer à la partie Matériels et Méthodes) [11]. A l'échographie transrectale, ont été évaluées les valeurs diagnostiques des images d'accumulation de liquide clair (images en ligne ou en étoile) [4,60] et pour l'examen vaginal, le recueil d'un mucus vaginal clair contenant des flocons de pus ou des sécrétions mucopurulentes ou purulentes à plus de 50% [63,176].

Les valeurs diagnostiques de chacun des critères ont été calculées. Elles reposaient sur le calcul de la sensibilité (Se), spécificité (Sp), valeur prédictive positive (VPP) et négative (VPN) de chaque critère. La sensibilité évalue la capacité de la technique testée à donner un résultat positif lorsque l'inflammation est présente. Elle s'oppose à la spécificité, qui correspond à l'obtention d'un résultat négatif en l'absence d'inflammation [180]. Les valeurs prédictives reflètent la confiance que l'on peut accorder au résultat du test. La VPP correspond à la probabilité d'être effectivement en présence d'une inflammation génitale lorsque la technique utilisée donne un résultat positif. A l'inverse, la VPN calcule la probabilité d'une absence d'inflammation quand le résultat du test est négatif [181].

L'impact de sécrétions vaginales purulentes sur le taux de gestation a été caractérisé jusqu'à 300 JPP, à l'aide d'une analyse de survie, utilisant les courbes de Kaplan-Meier et le modèle de Cox ajusté pour la parité, la NEC et l'élevage d'origine [109].

1.2. Résultats

1.2.1. Expression clinique de l'inflammation endométriale

Les valeurs diagnostiques des critères utilisés seuls ou en combinaison, par rapport au résultat de l'examen cytologique endométrial, sont présentées dans le tableau 16. Les critères issus d'une PTR étaient de faible valeur diagnostique. Moins de 50% des vaches présentant une inflammation endométriale avaient un utérus de consistance anormale (43%) ou une augmentation du diamètre d'une corne (25%) ou du col (36%). L'utilisation de l'échographie utérine ou l'observation des sécrétions vaginales améliorait le pourcentage de cas d'inflammation

Tableau 16 : Valeurs diagnostiques des différents critères, utilisés seuls ou en combinaison, dans le diagnostic d'une inflammation endométriale (plus de 6% de neutrophiles), endocervicale (plus de 5% de neutrophiles) ou génitale pathologique (plus de 6% de neutrophiles sur un frottis endométrial ou plus de 5% de neutrophiles sur un frottis endocervical).

Se : sensibilité ; Sp : spécificité ; VPP : valeur prédictive positive ; VPN : valeur prédictive négative ; Diam : diamètre ; Echo : échographie

Critères diagnostiques* (simples ou combinés)	Inflammation endométriale				Inflammation endocervicale				Inflammation génitale			
	Se	Sp	VPP	VPN	Se	Sp	VPP	VPN	Se	Sp	VPP	VPN
Diamètre du col \geq 7,5 cm	36	89	70	64	37	89	70	67	32	91	80	53
Diamètre d'au moins une corne utérine \geq 4 cm	25	85	56	60	21	82	44	60	24	86	67	49
Consistance anormale de l'utérus (ferme, dure ou pâteuse)	43	47	38	52	58	58	49	67	50	54	56	48
Liquide claire détecté à l'échographie (image de ligne ou de lumière)	69	42	47	64	64	39	42	61	62	37	53	45
Sécrétions vaginales [3] ou [4]	60	83	73	73	61	82	70	75	56	88	85	63
Sécrétions vaginales [2], [3] ou [4]	80	53	56	78	84	55	56	83	80	61	70	72
Diam corne ut \geq 4 cm ou diam col \geq 7,5 cm	45	76	59	65	45	75	55	66	44	79	71	55
Diam col \geq 7,5 cm ou liquide à l'échographie	74	36	47	64	75	37	45	67	70	34	55	50

*La description des techniques utilisées est présentée dans la partie Matériels et méthodes.

diagnostiqués : on identifiait chez 69% des vaches du liquide à l'échographie et plus des deux tiers des animaux inflammés présentaient du pus, en plus ou moins grande proportion, dans leurs sécrétions vaginales. Cependant, ces valeurs élevées de Se s'accompagnaient de faibles valeurs de VPP. Lorsque l'on identifiait des images liquidiennes à l'échographie utérine, l'animal ne présentait en réalité d'inflammation cytologique que dans moins d'un cas sur deux. Le mucus vaginal de catégorie [2] à [4] possédait une VPP nettement inférieure à celle du mucus de catégorie [3] et [4] (56% vs 73% respectivement). Parallèlement à l'augmentation de la valeur de Se, la prise en compte des flocons (catégorie [2]) dans le diagnostic faisait diminuer les Sp et VPP (tableau 16). Enfin, la combinaison de critères diagnostiques améliorait l'identification des cas d'inflammation (valeurs de sensibilité), au détriment des VPP (tableau 16).

Au final, l'examen du mucus vaginal avec observation de sécrétions mucopurulentes ou purulentes était le critère de meilleures valeurs diagnostiques (Se = 60%, Sp = 83%, VPP = 73% et VPN = 73%, tableau 16). Aucune combinaison de critères n'atteignait de meilleures valeurs diagnostiques que celles de l'examen vaginal utilisé seul. La multiplication de critères ne permettait pas l'amélioration du diagnostic de l'inflammation cytologique.

1.2.2. Expression clinique de l'inflammation endocervicale

Les valeurs des critères utilisés pour le diagnostic d'une inflammation cervicale sont tout à fait similaires à celles du diagnostic des inflammations cytologiques de l'utérus (tableau 16). Seuls 37% des cas où le diamètre du col était supérieur à 7,5 cm correspondaient à une cervicite. L'examen vaginal de catégories [2] à [4] (*i.e.*, identification de rares flocons de pus jusqu'à un mucus purulent à plus de 50%) possédait une forte valeur de Se (84%), mais sa VPP était faible (56%). L'utilisation comme critère de positivité des sécrétions de catégories [3] ou [4] offrait une exactitude du diagnostic (*i.e.*, VPP) dans deux tiers des cas et une VPP et VPN de 70 et 75% respectivement. La combinaison de plusieurs critères en PTR ou de la PTR avec l'examen échographique n'améliorait pas les valeurs diagnostiques (tableau 16).

1.2.3. Expression clinique de l'inflammation génitale

L'identification conjointe de l'inflammation du col ou de l'utérus par les techniques macroscopiques est présentée dans le tableau 16. Les valeurs diagnostiques des critères testés étaient très comparables à celles du diagnostic d'une inflammation endométriale ou endocervicale seule. L'examen vaginal possédait les meilleures valeurs diagnostiques par rapport aux autres techniques testées. Il permettait, en considérant comme pathologique la présence de pus dans les

secrétions (catégories [3] ou [4]), l'identification de près de 60% des animaux affectés par une inflammation génitale avec une exactitude du diagnostic dans 85% des cas (tableau 16).

1.3. Discussion

Notre objectif était de déterminer l'expression clinique d'une inflammation génitale cytologique. Pour cela, nous avons recherché les critères diagnostiques, seuls ou combinés, qui identifiaient la majorité des cas d'inflammation, sans pour autant générer un grand nombre d'animaux faux positifs. En effet ces animaux déclarés à tort présenter une inflammation génitale feraient l'objet de la mise en œuvre d'une thérapeutique par excès. En parallèle, il est important de détecter un maximum d'animaux réellement atteints afin de pouvoir les traiter. Alors que l'évaluation d'une technique diagnostique repose généralement sur les valeurs de Se et Sp [60,63,118], nous avons donc ajouté ici les valeurs prédictives afin de mesurer les risques de sur- (VPP) et sous-diagnostic (VPN) [181].

Un retard d'involution utérine, au sens anatomique du terme, est considéré comme un signe d'endométrite et d'altération des performances de reproduction [11,63,182]. Or, la mesure du diamètre du col, des cornes ou l'évaluation de la consistance de l'utérus ne permettaient l'identification que de moins de 50% des cas d'inflammation endométriale. Par ailleurs, une augmentation du diamètre du col était loin d'être systématique lors d'une inflammation endocervicale : si pour Gloor [130], l'expression clinique de la cervicite est une congestion de la muqueuse, associée à une augmentation du diamètre et une induration du col, l'augmentation du diamètre du col ne concernait, dans notre étude, que 37% des animaux. Les critères plus spécifiquement évalués sur les cornes utérines (diamètre, consistance) ne possédaient pas de bonne valeur diagnostique dans l'identification d'une inflammation cervicale.

L'identification d'une image liquidienne à l'échographie utérine identifiait plus des deux tiers des cas d'inflammation utérine, mais elle s'accompagnait d'un fort taux d'animaux faux positifs (52%). Dans l'étude de Barlund *et al.* [60], l'échographie possédait des valeurs de sensibilité faibles de 39 et 31%, selon que l'image liquidienne avait pour épaisseur plus de 3 ou 8 mm, respectivement. Le taux d'animaux faux-positifs n'étaient pas précisés dans ce travail. Le taux élevé d'animaux faux-positifs dans notre étude peut expliquer la forte prévalence des endométrites subcliniques rapportée par Kasimanickam *et al.* [4] (45,1% entre 20 et 33 JPP), qui combinaient les examens échographique et cytologique dans le diagnostic des formes subcliniques.

Expression clinique et diagnostic de l'inflammation génitale

Valeurs diagnostiques des techniques

L'examen des sécrétions vaginales est de bonne valeur diagnostique dans l'identification des cas d'inflammations aussi bien utérine qu'endocervicale. Il est admis que l'aspect et l'odeur des sécrétions vaginales sont associés à l'importance de la contamination bactérienne utérine et à la gravité de l'endométrite clinique en termes de performances de reproduction [23,57,63,176,183]. Par contre la valeur diagnostique des flocons de pus reste encore controversée [39,63]. Alors que les mucus clairs contenant quelques flocons de pus sont associés à une augmentation de l'intervalle vêlage-insémination première et vêlage – insémination fécondante dans l'étude de Williams *et al.* [39], ils ne sont en revanche pas associés à une réduction significative du taux de gestation chez LeBlanc *et al.* [63]. Dans notre travail, l'observation de pus lors de l'examen vaginal (de quelques flocons de pus jusqu'à des sécrétions purulentes à plus de 50%) s'accompagnait d'une identification de la majorité des cas d'inflammation génitale, mais aussi d'un grand nombre de faux-positifs. L'expression clinique de l'inflammation cytologique semble donc reposer sur une proportion de pus dans les sécrétions vaginales supérieure à celle d'un mucus trouble ou ne contenant que de rares flocons de pus.

Enfin, il est apparu que la combinaison de critères diagnostiques n'améliore pas l'identification des cas d'inflammation par rapport à la mise en œuvre seule de l'examen des sécrétions vaginales. Les associations de plus de deux critères diagnostics n'ont pu être testées en raison de l'absence d'animaux négatifs pour l'association de chacun des critères. L'examen du contenu vaginal, bien que de meilleures valeurs diagnostiques, conduit néanmoins à quelques animaux faux-positifs, expliqués sans doute par des cas de vaginite, de cystite ou moins fréquemment de pyélonéphrite [2]. La présence d'animaux faux-négatifs est inévitable, en raison des cas subcliniques d'endométrite ou de cervicite, pour lesquels le diagnostic requiert la mise en œuvre d'un examen cytologique. Si l'on considère l'expression clinique de l'inflammation génitale comme la présence de sécrétions muco-purulentes à purulentes dans la cavité vaginale, alors la proportion de formes subcliniques serait de 44% (*i.e.*, 100 - Se).

Bien que les cas d'inflammation cytologique endométriale ne sont généralement pas associés aux inflammations endocervicales (dans près d'un cas sur deux [41%], un animal n'est atteint que par une seule de ces affections ; se reporter à la partie I.C. des résultats), cette étude a révélé une similitude d'expression clinique des deux entités, qui peuvent être regroupées sous le terme d'inflammation génitale (*i.e.*, frottis endométrial $\geq 6\%N$ et/ou frottis endocervical \geq

Expression clinique et diagnostic de l'inflammation génitale

Valeurs diagnostiques des techniques

5%N). L'examen des sécrétions vaginales possède alors les meilleures valeurs diagnostiques dans l'identification des cas d'inflammations génitales autour de 30 JPP.

Tableau 17 : Répartition des sécrétions selon leur aspect macroscopique, suite aux deux examens vaginaux (E1 et E2), séparés par une palpation transrectale (n = 157).

E1 : Examen vaginal précédant la mise en œuvre d'une palpation transrectale ; E2 : Examen vaginal succédant à la mise en œuvre d'une palpation transrectale

Classification des sécrétions vaginales selon leur aspect macroscopique : [0] Absence de sécrétion ; [1] Sécrétions claires ou translucides ; [2] Mucus trouble ou présence de rares flocons de pus blancs ; [3] Mucus contenant moins de 50% de pus blanchâtre ; [4] Mucus contenant plus de 50% de pus blanchâtre

Le diagnostic d'absence d'inflammation génitale repose sur l'identification de sécrétions des catégories [0] à [2]. Celui de présence d'inflammation génitale, sur un mucus de catégories [3] ou [4]

		Absence d'inflammation			Inflammation		Total E2
		E1 [0]	E1 [1]	E1 [2]	E1 [3]	E1 [4]	
Absence d'inflammation	E2 [0]	10	2	2	0	0	14
	E2 [1]	6	56	2	0	0	64
	E2 [2]	2	21	8	2	0	33
Inflammation	E2 [3]	6	3	2	6	0	17
	E2 [4]	0	1	1	2	25	29
Total E1		24	83	15	10	25	157

2. Influence de la palpation transrectale

Le travail précédent a révélé que l'examen des sécrétions vaginales était le meilleur signe de l'expression clinique de l'inflammation génitale. Cependant, dans cette étude, le recueil des sécrétions avait été effectué après mise en œuvre d'une palpation transrectale. Hormis Petit *et al.* [125], la grande majorité des auteurs qui effectuent les deux examens procèdent au recueil des sécrétions vaginales avant de réaliser la PTR [39,60,63,176].

L'objectif de ce travail était de déterminer si la manipulation de l'utérus par voie transrectale pouvait favoriser l'extériorisation des sécrétions utérines ou cervicales vers la cavité vaginale et ainsi influencer le résultat de l'examen vaginal, à la fois en termes de quantité et d'aspect de mucus collecté.

2.1. Protocole

L'échantillon comptait un total de 157 vaches examinées entre 21 et 35 JPP. Le protocole comprenait deux examens successifs des sécrétions vaginales (E1 et E2), séparés par la réalisation d'une PTR. L'examen vaginal consistait en un recueil des sécrétions à l'aide d'une main gantée, puis une classification macroscopique du contenu selon les cinq catégories définies dans la partie Matériels et Méthodes. Lors de l'examen transrectal, l'utérus était soigneusement palpé depuis l'extrémité des cornes jusqu'à sa base (col). La palpation s'accompagnait d'une échographie ovarienne, afin de rechercher la présence d'un corps jaune de plus de 10 mm de diamètre.

La concordance entre les résultats des deux examens vaginaux (précédant et suivant la PTR) a été analysée par le calcul du coefficient de concordance kappa. L'influence de la PTR sur le diagnostic final (présence ou absence d'inflammation génitale) a été analysée par le test du chi-deux. L'expression clinique de l'inflammation génitale était définie par l'identification de sécrétions mucopurulentes (*i.e.*, catégorie [3]) ou purulentes (*i.e.*, catégorie [4]) dans le vagin.

2.2. Résultats

Le coefficient de concordance évaluant les résultats des deux examens vaginaux successifs (*i.e.*, classification du contenu vaginal en cinq catégories) des 157 vaches était de valeur $\kappa = 0,54$. Avant et après la PTR, la classification du mucus changeait pour 34% ($n = 54$) des animaux (tableau 17). Dans la majorité des cas (82%), le numéro de la catégorie de mucus augmentait. La plupart des modifications d'aspect correspondaient à des sécrétions initialement translucides à E1 qui devenaient troubles à E2 (20/54). Concernant la quantité de sécrétions, sur les 24 vaches qui

Expression clinique et diagnostic de l'inflammation génitale

Valeurs diagnostiques des techniques

ne présentaient pas de mucus vaginal à E1, des sécrétions étaient recueillies chez 14 d'entre elles suite à la palpation transrectale.

Suite au premier examen vaginal, 22% des vaches étaient diagnostiquées atteintes d'une inflammation génitale, alors que le deuxième examen en identifiait 29%. Treize des 123 vaches considérées saines à E1 présentaient du pus (catégories [3] et [4]) suite à la PTR. Inversement, deux vaches avec des sécrétions mucopurulentes à E1 étaient diagnostiquées saines (catégorie [2]) à E2. Le test du chi-deux, comparant la proportion d'animaux déclarés atteints après E1 et après E2, s'est révélé non significatif ($P = 0,16$).

Enfin, 44% des vaches de l'étude présentaient un corps jaune le jour de l'examen. La présence d'une structure lutéale sur l'un des ovaires n'était pas associée à une augmentation de la fréquence des sécrétions mucopurulentes ou purulentes à E1 (présentes chez 58% des vaches en présence d'un CJ, contre 42% en son absence ; $P = 0,67$). La présence d'une structure lutéale ne modifiait pas non plus la fréquence des cas d'absence de recueil de sécrétions à E1 (56% en cas de présence d'un CJ, contre 44% en l'absence d'un CJ ; $P = 0,25$).

2.3. Discussion

Cette étude est la première à évaluer l'impact de la palpation transrectale sur le résultat de l'examen des sécrétions vaginales. Malgré une modification du classement macroscopique des sécrétions dans 34% des cas, ce travail n'a pas montré d'influence significative de la mise en œuvre de la PTR sur l'évaluation du statut inflammatoire génital à l'échelle d'une population.

Avec seulement 15% d'absence de sécrétion vaginale suite au premier examen, le classement du mucus selon son aspect macroscopique semble possible suite à un recueil manuel direct du contenu vaginal. Peu d'auteurs spécifient la catégorie « absence de sécrétion », par défaut d'observation de ce type de cas ou probablement par regroupement avec une autre catégorie de la classification, comme celle des sécrétions translucides. LeBlanc *et al.* [63] sont les seuls à préciser l'identification au vaginoscope de 40% de vaches sans sécrétion vaginale. D'un point de vue diagnostique, l'absence de mucus recueilli conduit à la conclusion d'un animal sain. La PTR fait apparaître des sécrétions dans le vagin chez 58% des animaux initialement sans sécrétion et a conduit à modifier le diagnostic chez 25% d'entre eux.

Expression clinique et diagnostic de l'inflammation génitale

Valeurs diagnostiques des techniques

Parallèlement à l'évaluation de l'influence de la PTR sur la quantité des sécrétions recueillies, notre étude avait principalement pour objectif de mesurer son impact sur le diagnostic final d'inflammation génitale. Deux vaches déclarées affectées à E1 (sécrétions mucopurulentes) se sont finalement révélées saines à E2 (sécrétions troubles), probablement en raison du retrait du contenu purulent lors de l'examen initial. On peut donc conclure que si le premier examen des sécrétions n'avait pas eu lieu (en somme, si un seul examen avait été effectué après PTR), ces deux animaux auraient été considérés affectés sur la base d'un recueil de sécrétions purulentes suite à une palpation transrectale.

D'autre part, après la mise en œuvre d'une PTR, le caractère pathologique des sécrétions (*i.e.*, le numéro de la catégorie, dans la classification) était généralement augmenté. D'ailleurs, 8% des vaches identifiées saines à E1 ont présenté des sécrétions purulentes à E2. D'un point de vue statistique, cet impact de la PTR sur le diagnostic d'inflammation génitale par examen vaginal n'était néanmoins pas significatif.

L'influence des stéroïdes sexuels a été étudiée sous deux angles : en tant que modulateurs de la quantité de mucus vaginal et de l'immunité génitale. La phase folliculaire est accompagnée d'une augmentation du volume des sécrétions cervico-vaginales [7]. La valeur prédictive positive de l'examen échographique est de plus de 91% par rapport au dosage de la progestérone dans le diagnostic d'un corps jaune fonctionnel [184]. La présence d'un corps jaune de diamètre supérieur à 10 mm est donc un indicateur fiable d'une progestéronémie supérieure à 1 ng/ml. Ici, l'identification d'un corps jaune n'a pas significativement modifié la quantité de mucus recueillie. Par ailleurs, le rôle immunosuppresseur de la progestérone sur l'immunité génitale n'a pas été confirmé par une augmentation de la prévalence des affections cliniques [88,185].

Les deux études précédentes ayant montré que l'examen transrectal n'est pas de bonne valeur diagnostique dans l'identification des formes cliniques d'inflammation génitale et que le massage de l'utérus ne facilite pas l'extériorisation du contenu de la lumière utérine et cervicale dans le vagin, sa mise en œuvre n'est donc pas à promouvoir dans le diagnostic des inflammations génitales. Il peut néanmoins présenter un intérêt chez les animaux pour lesquels les sécrétions vaginales sont absentes et ne permettent pas le diagnostic macroscopique de l'aspect des glaires. D'autre part, son utilité dans la recherche de la cyclicité ovarienne reste incontestable. Pour des raisons de facilité et d'hygiène, sa mise en œuvre doit succéder à celle de l'examen vaginal qui, s'il est réalisé dans de bonnes conditions, ne favorise pas la contamination

Expression clinique et diagnostic de l'inflammation génitale

Valeurs diagnostiques des techniques

ascendante de la sphère génitale [186]. L'identification des formes cliniques d'inflammation peut se limiter à l'appréciation macroscopique du mucus contenu dans la cavité vaginale.

Le dernier volet de cette partie de notre travail avait ensuite pour but d'évaluer le caractère pathologique des différentes catégories de mucus vaginal par une comparaison avec l'examen bactériologique et une analyse des performances de reproduction.

Tableau 18 : Distribution des animaux en fonction du résultat de l'examen des sécrétions vaginales et de l'examen bactériologique (n = 165).

Classification des sécrétions vaginales : [0] absence de sécrétions ; [1] mucus translucide ; [2] mucus trouble ou présence de rares flocons de pus blancs ; [3] mucus contenant moins de 50% de pus blanchâtre ; [4] mucus contenant plus de 50% de pus blanchâtre

Classification des germes en fonction de leur pouvoir pathogène : [0] absence de croissance bactérienne ; [1] présence de pathogène majeur ; [2] présence de pathogène mineur ; [3] présence de pathogène opportuniste

		Examen bactériologique				Total
		[0]	[1]	[2]	[3]	
Sécrétions vaginales	[0]	10	0	0	0	10
	[1]	60	1	2	2	65
	[2]	37	2	0	1	40
	[3]	16	1	1	3	21
	[4]	25	1	1	2	29
Total		148	5	4	8	165

3. Caractère pathologique des sécrétions vaginales

Les sécrétions vaginales sont classées en cinq catégories (se reporter à la partie Matériels et méthodes) selon la proportion de pus qu'elles contiennent.

Le caractère pathologique des différentes catégories de mucus vaginal a été étudié sous deux angles. Nous avons tout d'abord évalué la relation entre les résultats de l'examen bactériologique (en terme de pathogénicité des bactéries isolées) et l'appréciation macroscopique des sécrétions vaginales. Puis, dans un second temps, nous avons testé le lien entre la proportion de pus dans les sécrétions vaginales et les performances de reproduction ultérieures.

3.1. Protocole

Dans un premier temps, chez 165 vaches entre 21 et 60 JPP, chaque prélèvement bactériologique au niveau du corps utérin était associé à un recueil des sécrétions vaginales à l'aide du dispositif Metrichick®. La mise en culture était réalisée dans des conditions aéro- et anaérobies (se reporter au Matériels et méthodes).

Les colonies bactériennes isolées étaient hiérarchisées selon la classification de Williams *et al.* [39] en germes pathogènes majeurs, potentiellement pathogènes ou contaminants opportunistes (tableau 1). Le contenu de la cavité vaginale était hiérarchisé selon la classification présentée dans la partie Matériels et méthodes.

Dans un second temps, les sécrétions vaginales de 75 vaches de trois élevages entre 21 et 35 JPP ont été recueillies à l'aide du dispositif Metrichick® et classées selon la classification présentée dans la partie Matériels et méthodes.

La ferme d'origine, le numéro de lactation et la NEC étaient recueillies le jour de la visite. Les performances de reproduction des animaux ont été collectées jusqu'à 300 JPP.

L'impact de la catégorie des sécrétions vaginales sur le taux de gestation a été caractérisé à l'aide d'une analyse de survie utilisant les courbes de Kaplan-Meier et le modèle de Cox [109]. Les variables incluses dans le modèle étaient la catégorie du mucus vaginal, la parité, la NEC et la ferme d'origine.

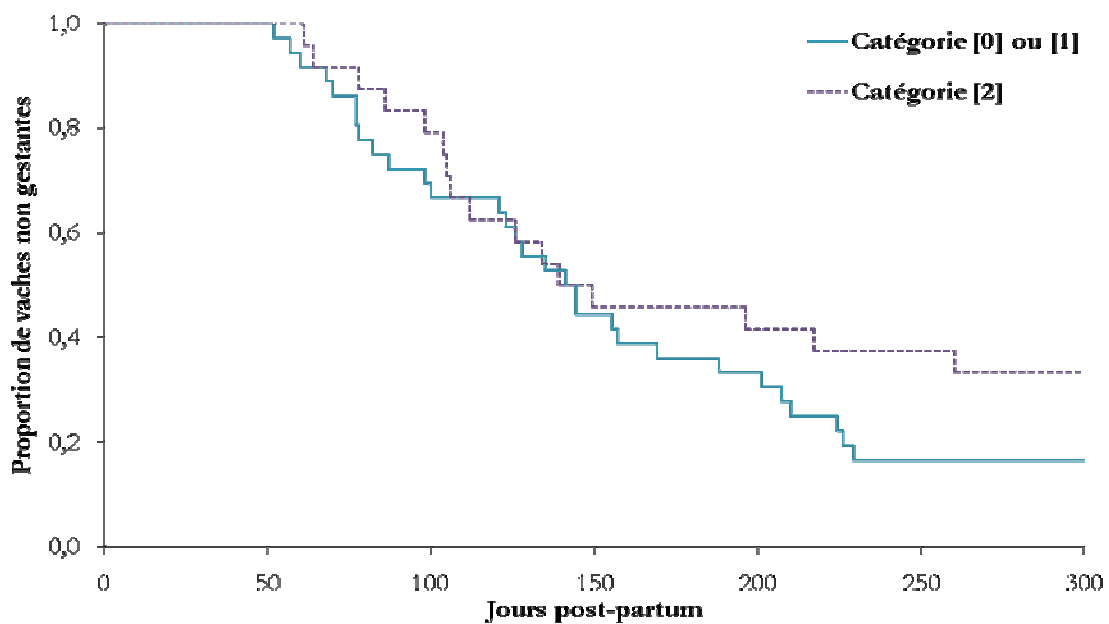
3.2. Résultats

La concordance entre les résultats de l'examen des sécrétions vaginales et de la culture bactériologique est présentée en tableau 18. L'isolement de germes par culture aéro- et anaérobie

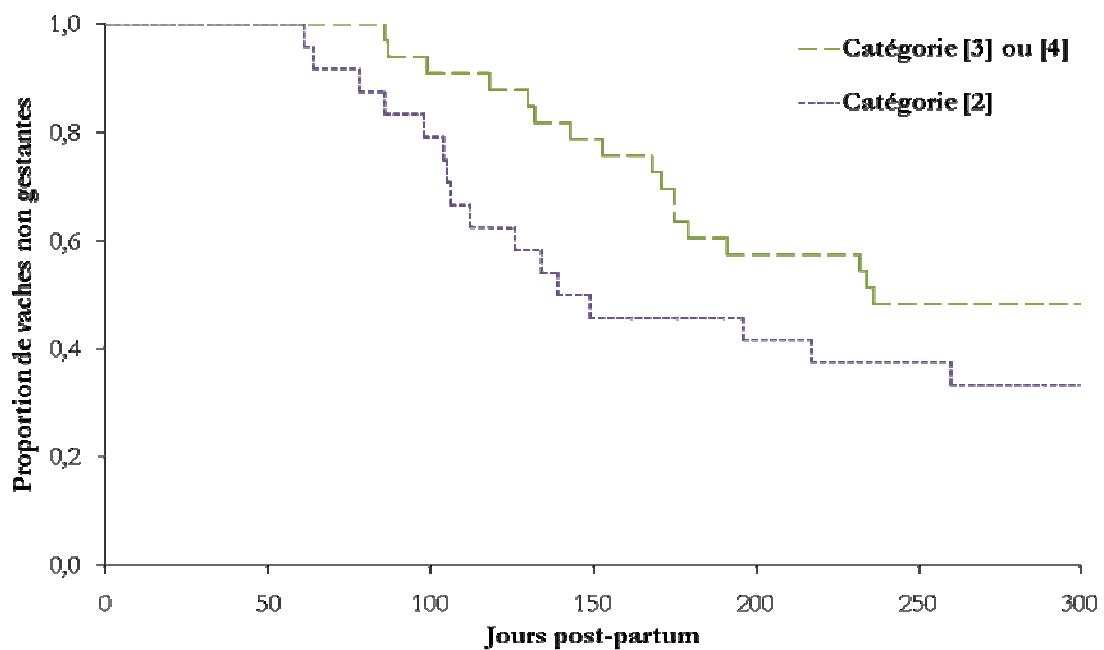
Figure 36 : Courbes de Kaplan-Meier représentant la proportion de vaches non gestantes, selon la proportion de pus identifiée dans les sécrétions vaginales (n = 157).

- a. Comparaison des vaches présentant des sécrétions translucides ou absentes (catégories [0] ou [1]), par rapport aux vaches présentant de rares flocons de pus (catégorie [2])
- b. Comparaison des vaches présentant des sécrétions purulentes (mucopurulentes à moins de 50% ou plus de 50% de pus blanc ; catégories [3] ou [4]) par rapport aux vaches présentant de rares flocons de pus (catégorie [2])

a



b



a été obtenu pour seulement 12% des échantillons. Parmi les 17 cultures positives, cinq utérus étaient contaminés par des germes pathogènes majeurs, quatre par des pathogènes mineurs et huit par des bactéries opportunistes.

Concernant le recueil des sécrétions vaginales, des sécrétions en quantité suffisante pour une appréciation macroscopique de la proportion de pus étaient présentes dans 94% des cas. Nous comptons 40 vaches avec des sécrétions troubles ou floconneuses et 50 vaches présentant du pus en plus grande proportion (*i.e.*, catégories [3] et [4]).

La pathogénicité des bactéries n'était pas significativement associée au type de sécrétion vaginale ($P = 0,31$).

L'association entre les flocons de pus et la fertilité ultérieure a été évaluée en comparant tout d'abord les performances de reproduction des vaches présentant de rares flocons de pus mélangés à un mucus clair (catégorie [2]), à celles des vaches présentant des sécrétions translucides ou absentes (catégories [0] ou [1]), puis à celles des vaches possédant du pus en plus grande proportion (catégories [3] ou [4]).

Les courbes de Kaplan-Meier mesurant l'impact du type de sécrétion vaginale sur le taux de gestation sont présentées en figure 36. Les évolutions des vaches présentant des flocons de pus n'étaient pas significativement différentes de celles présentant des sécrétions translucides ($P_{\logrank} = 0,23$; figure 36.a). En revanche, un rallongement de l'IVIF tendait à être significatif chez les vaches présentant un mucus purulent (catégories [3] ou [4]) par rapport aux flocons de pus. Ici, 54% des vaches présentant des flocons de pus entre 21 et 35 JPP étaient gestantes à 150 JPP, contre seulement 21% en cas de mucus purulent ($P_{\logrank} = 0,10$; $P_{Wilcoxon} = 0,05$; figure 36.b.).

L'analyse multivariée a confirmé ces résultats. Alors que le taux de gestation dans les 300 JPP n'était pas significativement altéré lorsque des flocons de pus étaient présents au lieu de sécrétions translucides (RRa = 0,59 ; IC95%, 0,30 – 1,16 ; $P = 0,13$; tableau 19), une diminution du taux de gestation tendait à être significative lors de l'observation de sécrétions nettement purulentes (catégories [3] ou [4]) par rapport à des flocons de pus (RRa = 2,16 ; IC95%, 0,99 – 4,70 ; $P = 0,050$; tableau 20).

3.3. Discussion

La mise en relation des caractéristiques macroscopiques du mucus vaginal avec la contamination bactérienne de l'utérus a montré une absence de concordance entre les deux techniques. Williams *et al.* [39], sur un échantillon plus important, ont observé une association entre la densité de croissance bactérienne des pathogènes majeurs et opportunistes et l'aspect des

Tableau 19 : Risque relatif ajusté du taux de gestation dans les 300 JPP, en fonction du résultat de l'examen des sécrétions vaginales : présence de rares flocons (catégorie [2]) *vs.* mucus translucide ou absent (catégories [0] ou [1]) (n = 75).

Le modèle est ajusté pour la parité, la note d'état corporelle (NEC) et l'élevage d'origine

Variable	Risque relatif	Intervalle de confiance à 95%	P
Parité (multipares <i>vs.</i> primipares)	1,4	0,7 - 2,8	0,36
NEC (≥ 2.5 <i>vs.</i> < 2.5)	6,6	2,7 - 15,8	<0.01
Elevages			
Elevage 1	1		
Elevage 2	0,8	0,1 - 5,8	0,78
Elevage 3	0,2	0,1 - 0,5	<0.01
Mucus vaginal (catégorie [2] <i>vs.</i> catégories [0] ou [1])	0,6	0,3 - 1,2	0,13

Tableau 20 : Risque relatif ajusté du taux de gestation dans les 300 JPP, en fonction du résultat de l'examen des sécrétions vaginales : présence de rares flocons (catégorie [2]) *vs.* mucus purulent (catégories [3] ou [4]) (n = 75).

Le modèle est ajusté pour la parité, la note d'état corporelle (NEC) et l'élevage d'origine

Variable	Risque relatif	Intervalle de confiance à 95%	P
Parité (multipares <i>vs.</i> primipares)	0,6	0,3 - 1,2	0,18
NEC (≥ 2.5 <i>vs.</i> < 2.5)	3,3	1,4 - 8,2	<0.01
Elevages			
Elevage 1	1		
Elevage 2	0,7	0,2 - 3,2	0,67
Elevage 3	0,3	0,1 - 0,77	0,01
Mucus vaginal (catégorie [2] <i>vs.</i> catégories [3] ou [4])	2,2	0,99 - 4,70	0,05

Expression clinique et diagnostic de l'inflammation génitale

Valeurs diagnostiques des techniques

sécrétions vaginales. L'isolement de bactéries pathogènes majeurs étaient en effet associées à une augmentation de la prévalence des sécrétions mucopurulentes (ratio de risque relatif [RRR], 1,50 ; $P < 0,01$) et purulentes (RRR, 1,89 ; $P < 0,01$). Les densités de croissance des bactéries potentiellement pathogènes étaient associées à une augmentation de la fréquence d'observation des mucus purulents (RRR, 1,89 ; $P < 0,01$). Quant à l'influence de l'espèce bactérienne, il semble que la présence d'*A. pyogenes*, *Proteus sp.* et *F. necrophorum* augmente le risque d'obtenir un mucus vaginal de type anormal (*i.e.*, mucus de type 3 ou 4), contrairement aux *Streptocoques* α -hémolytiques et aux *Staphylocoques* coagulase négative qui diminuent ce risque [39].

La faible proportion de cultures positives en conditions aéro- et anaérobies dans notre travail a probablement favorisé l'absence d'association entre l'examen des sécrétions vaginales et l'examen bactériologique de la lumière utérine. Mais qu'elle reflète la colonisation bactérienne de l'utérus ou non, la classification des sécrétions vaginales conserve une signification biologique étant donné qu'elle est prédictive des performances de reproduction.

L'impact de sécrétions vaginales purulentes sur les paramètres de reproduction a été montré à travers différentes études [7,39,63,132,176]. Notre essai s'est intéressé plus spécifiquement au caractère pathologique d'un mucus trouble ou contenant des flocons de pus, qui semble plus incertain dans la littérature : certaines études ne les trouvent pas associés à une diminution significative du taux de gestation [7,63], alors que d'autres mettent en évidence une réduction des paramètres de reproduction (IVIA1 et IVIF) chez des vaches présentant des flocons de pus par rapport aux mucus translucides [39].

Notre étude a confirmé que l'examen des sécrétions vaginales était un bon indicateur de la fertilité bovine dans les 300 JPP. L'échantillon de petite taille ne nous a pas permis d'obtenir la significativité statistique, néanmoins il est clairement apparu par l'analyse de survie, puis par l'analyse multivariée (modèle de Cox) que les sécrétions purulentes (catégories [3] et [4]) étaient associées à une réduction du taux de gestation (RRa = 2,2 ; tableau 20) et un allongement de l'IVIF, par rapport à des sécrétions contenant quelques flocons de pus. Les performances de reproduction étaient en revanche similaires entre les animaux présentant un mucus clair ou mélangé à des flocons blancs.

Nous pouvons donc conclure que la présence de flocons de pus dans les sécrétions vaginales entre 21 et 35 JPP ne semble pas pathologique. La mise en place d'un essai sur un plus grand échantillon d'animaux permettrait de confirmer cette observation.

Expression clinique et diagnostic de l'inflammation génitale

Valeurs diagnostiques des techniques

Bien que l'examen macroscopique du mucus soit, à lui seul, le meilleur reflet de la santé génitale, les éleveurs et les vétérinaires utilisent pour des raisons de commodité, tradition ou connaissances, des méthodes plus variées dans le diagnostic des inflammations utérines. Nous avons cherché à décrire les modalités de diagnostic des endométrites sur le terrain à travers deux enquêtes, menées auprès d'éleveurs et de vétérinaires.

B. Diagnostic des inflammations génitales sur le terrain en France

Publications et travaux associés

Articles publiés

- **Deguillaume L.** (2009) Votre opinion sur les infections utérines nous intéresse ! *PLM*, **402**, 6-7.
- Chastant-Maillard S, Gondran C, **Deguillaume L.** (2009) Infections utérines, attention aux erreurs d'autodiagnostic et d'automédication. *PLM*, **405**, 22-24.

Congrès national (poster accepté)

- **Deguillaume L**, Gondran C, Chastant-Maillard S. (2010) Attitude et opinion des éleveurs laitiers français face aux endométrites. *In : 17^e Journées 3R*, 8-9 Décembre 2010, Paris, France.

Thèse de Doctorat Vétérinaire (encadrement)

- Troitzky K. (2010) *Enquête sur les méthodes de diagnostic et de traitement des endométrites chez la vache en France*, Thèse Méd. Vét., 101p.

Mémoire de fin d'Etudes Agronomiques (encadrement)

- Gondran C. (2009) *Approche globale des inflammations du tractus génital chez la vache laitière*. Mémoire, ENITA, Clermont-Ferrand, 44p.

Comme nous venons de le voir dans la partie précédente, les outils disponibles pour le diagnostic de l'inflammation génitale sont variés. L'examen cytologique, bien qu'il permette une identification objective et quantifiable de l'inflammation microscopique, est d'utilisation limitée sur le terrain en raison de sa difficulté de mise en œuvre et du délai imposé avant l'obtention du résultat. Les vétérinaires praticiens préfèrent généralement des méthodes macroscopiques, dont le résultat est immédiat. L'éleveur est également un acteur clé du diagnostic des affections génitales : il participe avec le vétérinaire à la détection des animaux malades et au suivi des performances de reproduction de son troupeau.

Nous avons donc réalisé deux enquêtes afin de dresser un bilan, sur le territoire français, des pratiques des vétérinaires et des éleveurs en termes de diagnostic et de suivi des endométrites de la vache laitière.

1. Enquête auprès des vétérinaires français

La première partie de l'étude a consisté en un sondage auprès des vétérinaires ruraux français ciblé sur l'endométrite clinique (*i.e.*, symptômes génitaux après 21 JPP, non associés à une atteinte de l'état général de l'animal).

1.1. Protocole

La population cible était l'ensemble des vétérinaires ayant un exercice professionnel en médecine bovine. Au total, 1752 vétérinaires, exerçant sur le territoire français, ont été contactés par courrier électronique.

L'enquête reposait sur un questionnaire de 19 questions fermées (annexe 3) qui nécessitait pas plus de 10 minutes pour être complété. Après une brève introduction exposant les principaux objectifs, l'enquête abordait trois axes principaux : les techniques diagnostiques généralement mises en œuvre, les critères sur lesquels reposaient la prise de décision d'une thérapeutique et le choix du traitement. Les 14 premières questions concernant les modalités diagnostiques (à base de supports photographiques) avaient pour but d'identifier les principales techniques et leur fréquence d'utilisation. Une question portait sur les circonstances de détection des affections, afin d'évaluer l'importance de la mise en place de suivis de reproduction réguliers. Trois questions ont porté sur le type et le mode d'administration de la thérapeutique. Par ailleurs, la prise de décision était abordée pour mesurer l'existence d'un seuil de gravité de l'endométrite dans la mise en place d'une thérapeutique, ainsi que l'adaptation du traitement en fonction de la présence ou non d'un

Figure 37 : Fréquence d'utilisation des différentes techniques diagnostiques par les vétérinaires (n = 444 réponses).

Plusieurs réponses étaient possibles à cette question

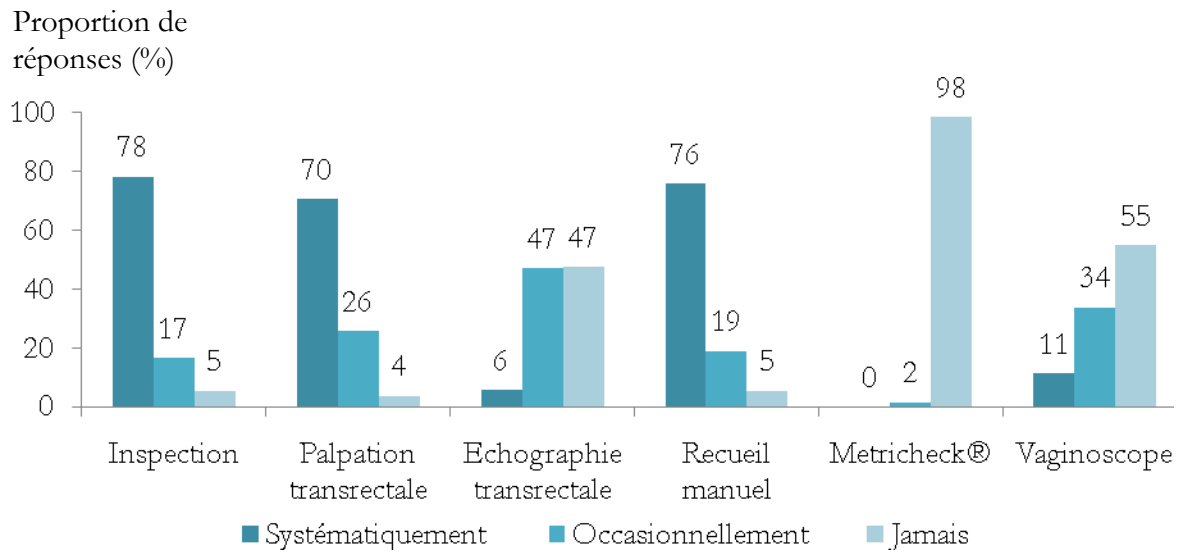
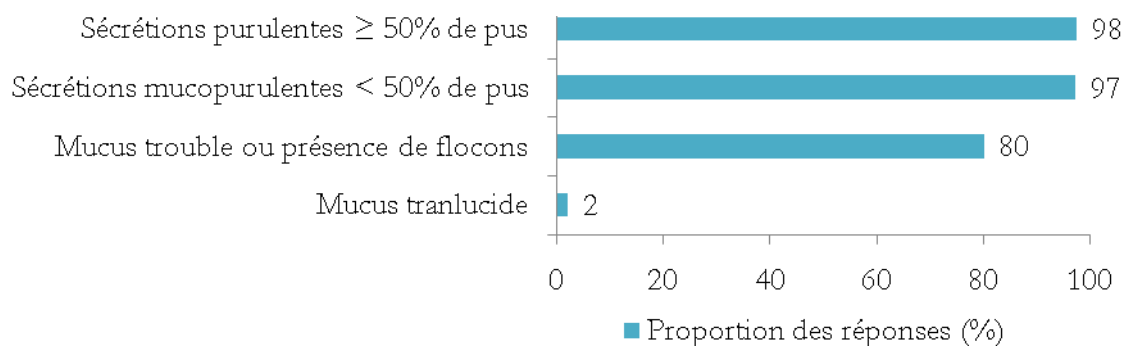


Figure 38 : Opinion des vétérinaires sur le caractère pathologique des sécrétions vaginales d'après leur aspect macroscopique (n = 405 réponses).

Plusieurs réponses étaient possibles à cette question



corps jaune. Enfin, des questions d'ordre personnel clôturaient le questionnaire et concernaient la situation géographique d'exercice, le nombre d'élevages et de bovins composant la clientèle.

Une population d'une dizaine de vétérinaires volontaires a testé le questionnaire. Suite à leurs suggestions, le questionnaire a été mis en ligne sur un site spécialisé (<http://www.zoomerang.com>). Un courrier électronique a été envoyé aux 1752 vétérinaires identifiés, invitant les destinataires à compléter l'enquête sur le site indiqué. Un rappel a été diffusé un mois plus tard.

Les résultats ont été directement enregistrés sur le site. Les vétérinaires sondés n'avaient pas obligation de réponse à l'intégralité du questionnaire, expliquant les effectifs variables pour les différentes réponses, précisés pour chaque figure. Les résultats sont présentés sous forme d'histogramme, les pourcentages au dessus ou à droite des barres d'histogramme correspondant à la proportion de vétérinaires ayant répondu.

1.2. Résultats

1.2.1. Taux de réponse

Au moment de l'envoi du courriel, un grand nombre d'adresses électroniques étaient non attribuées ou erronées ($n = 340$, soit 19% de l'envoi). Le nombre total de courriers électroniques parvenus aux praticiens était de 1412. Après la mise en ligne du questionnaire pendant neuf semaines, 605 vétérinaires ont visité la page web, 452 ont répondu à l'enquête (24 partiellement et 428 intégralement), soit un taux de réponse de 32%. Huit questionnaires n'ont pas été pris en compte, car les vétérinaires exerçaient à l'étranger (Belgique, Espagne, Maroc et Québec). Notre enquête a donc analysé un total de 444 questionnaires.

La plupart des régions du territoire français étaient représentées. Seules des zones géographiques où le nombre de bovins est faible (régions Ile de France, Centre et Sud-Est) n'étaient pas décrites. Toutes les tailles de cabinets étaient équitablement représentées (médiane, 200 élevages ; EIQ, 120 – 300 élevages). Les structures regroupaient en médiane (EIQ) 15 000 (9 000 – 25 000) bovins par clientèle.

1.2.2. Modalités diagnostiques

Les méthodes les plus utilisées par les vétérinaires sondés étaient l'inspection de la région périnéale (78%), la palpation transrectale (71%) et le recueil manuel du mucus vaginal (76%, figure 37). Les outils tels que l'échographe (47%), le vaginoscope (34%) ou le Metrichheck® (2%)

Figure 39 : Seuils utilisés par les vétérinaires pour le diamètre du col utérin en palpation transrectale (n = 112 réponses).

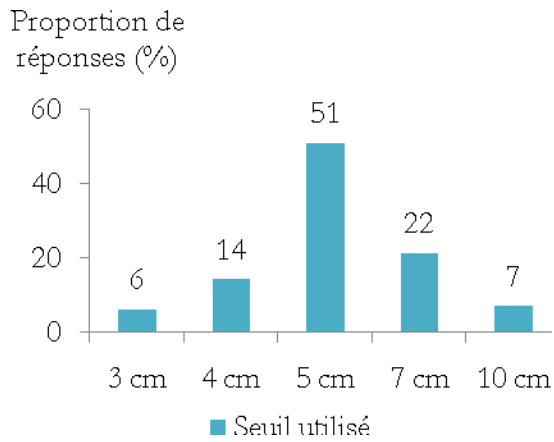


Figure 40 : Seuils utilisés par les vétérinaires le diamètre des cornes utérines en palpation transrectale (n = 256 réponses).

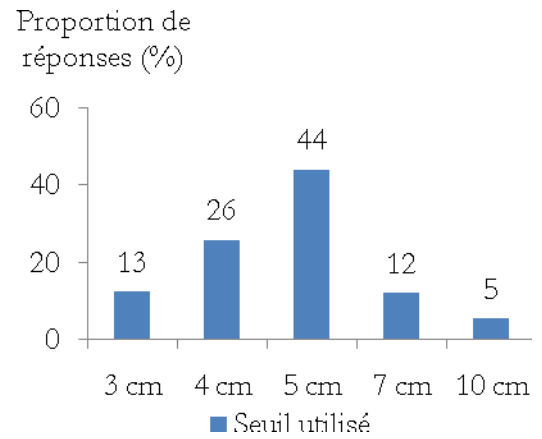


Figure 41 : Critères utilisés par les vétérinaires lors de la mise en œuvre d'une échographie utérine (n = 262 réponses). Plusieurs réponses étaient possibles à cette question

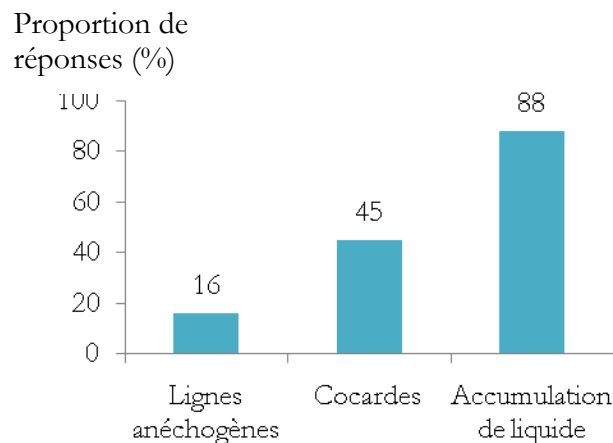
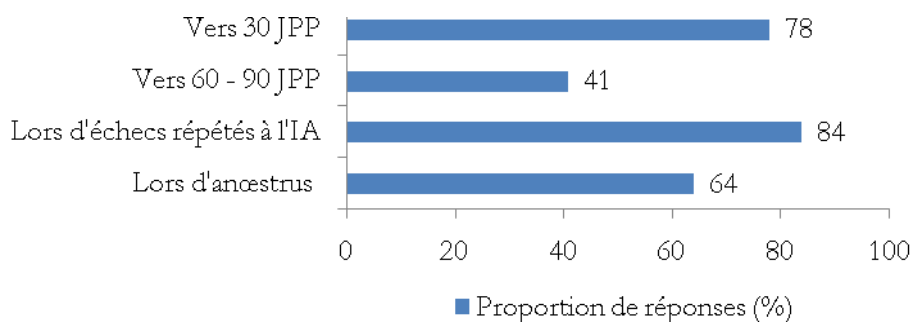


Figure 42 : Circonstances aboutissant à la recherche d'une endométrite par les vétérinaires (n = 418 réponses).

JPP : jours post-partum ; IA : insémination artificielle



Expression clinique et diagnostic de l'inflammation génitale

Diagnostic des inflammations génitales sur le terrain

étaient plus rarement employés. Les praticiens avaient pour habitude de combiner les techniques (figure 37). Un seul vétérinaire sondé pratiquait systématiquement la palpation transrectale sans ne jamais utiliser ni l'examen échographique, ni celui des sécrétions vaginales. Aucun vétérinaire sondé ne pratiquait que l'échographie transrectale et six praticiens s'intéressaient exclusivement à l'évaluation macroscopique du contenu vaginal.

Parmi la quasi totalité des praticiens qui mettaient en œuvre plusieurs techniques diagnostiques, seulement 6% d'entre eux estimaient que l'ordre des examens importait peu dans le diagnostic des endométrites, la grande majorité (70%) effectuait la PTR suite au recueil du contenu vaginal.

Parmi les vétérinaires examinant le contenu vaginal systématiquement ou occasionnellement (n = 405), le mucus translucide était en très grande majorité considéré comme non pathologique (figure 38). De rares flocons de pus étaient estimés anormaux par 80% des praticiens. Suite à l'examen des sécrétions vaginales, 52% des praticiens adaptaient leur conduite thérapeutique en fonction de la proportion de pus observée.

Au cours de la palpation transrectale (n = 412), moins d'un tiers des vétérinaires (n = 112) pratiquaient la mesure du diamètre du col. Les seuils utilisés sont présentés en figure 39. Seuls 21% d'entre eux utilisaient le seuil de 7 cm de diamètre. La majorité (51%) préférait un seuil de 5 cm. La mesure du diamètre des cornes était un critère plus utilisé que le précédent, puisqu'utilisé par deux tiers des praticiens (n = 256). Parmi ceux-ci, 26% plaçaient le seuil de normalité à 4 cm et 44% à 5 cm (figure 40). Enfin, près de la totalité des praticiens interrogés (93%) évaluaient la consistance des cornes utérines en PTR et 56% recherchaient la présence d'une lumière palpable.

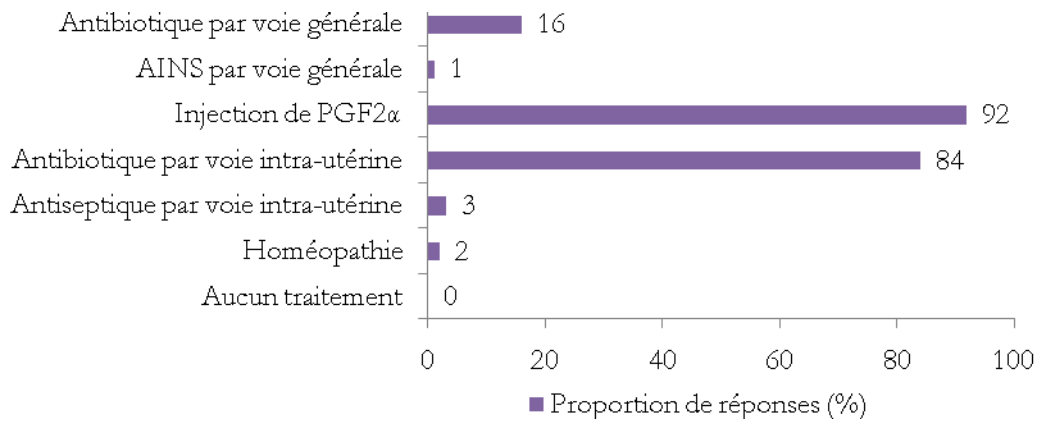
Parmi les vétérinaires réalisant une échographie utérine systématiquement ou occasionnellement (n = 224), les signes d'inflammation génitale étaient la présence de lignes anéchogènes (16% ; annexe 3), d'image en cocarde (54%) ou de lumière épaisse (88% ; figure 41).

Concernant les circonstances motivant le diagnostic d'endométrite au sein du troupeau, 418 vétérinaires se sont prononcés. Une majorité (78%) était amenée à la diagnostiquer dans le cadre d'un contrôle d'involution utérine vers 30 JPP, 41% s'inquiétaient de la santé de l'utérus au moment de la mise à la reproduction (vers 60 - 90 JPP) et 64% en cas d'anœstrus. L'endométrite faisait partie des causes fréquemment recherchées lors d'échecs répétés d'IA, puisque 84% des vétérinaires la recherchaient dans cette circonstance (figure 42).

Figure 43 : Modalités thérapeutiques d'une endométrite par les vétérinaires (n = 420 réponses).

Deux choix maximum par réponse à cette question

AINS : Anti-inflammatoire non stéroïdien ; PGF2 α : Prostaglandines F2 α



1.2.3. Modalités thérapeutiques

Les traitements les plus mis en œuvre par les vétérinaires étaient sans conteste les PGF 2α (92%) et les antibiotiques intra-utérins (84%). Plus des trois quarts de la population sondée utilisaient les deux types de produit. Un praticien sur six (16%) déclarait utiliser les antibiotiques par voie générale (figure 43).

Un praticien sur dix (n = 419) décidait volontairement de ne pas traiter une vache présentant de rares flocons de pus dans ses sécrétions vaginales. Enfin, 71% des vétérinaires interrogés (n = 421) tenaient compte de la présence d'un corps jaune pour le choix du traitement, soit plus de deux tiers des vétérinaires qui mettaient en œuvre un examen des ovaires lors de recherche d'endométrite.

2. Enquête auprès des éleveurs français

En complément du sondage des vétérinaires praticiens, une enquête a été diffusée auprès des éleveurs laitiers français, afin de cerner leur attitude face aux endométrites cliniques.

2.1. Protocole

Le questionnaire était constitué de 15 questions courtes (annexe 4), ne nécessitant pas plus de 10 minutes de réponse. Les thèmes abordés comprenaient les modalités diagnostiques, la place du vétérinaire, ainsi que leur opinion quant à l'importance et les conséquences de ces affections dans leur élevage.

L'enquête a été mise en ligne par le biais du même serveur Internet que précédemment (<http://www.zoomerang.com>), accessible aux éleveurs pendant une durée de deux mois. La population cible était constituée par l'ensemble des abonnés du magazine Production Laitière Moderne (Editions du Boisbaudry, Cesson-Sévigné, France). Un article a été rédigé dans un numéro de Production Laitière Moderne, un mois avant le lancement de l'enquête, afin de la promouvoir. Dans les deux mois qui ont suivi le début de l'enquête, deux courriels de rappel ont ensuite été envoyés aux éleveurs abonnés ayant communiqué leur adresse électronique au magazine.

Les résultats sont présentés sous forme d'histogramme ou de diagramme circulaire. Les pourcentages au dessus ou à droite des barres d'histogramme correspondant à la proportion d'éleveurs ayant répondu.

2.2. Résultats

2.2.1. Taux de réponse

Au total, 3 058 messages ont été envoyés, dont 510 adresses erronées, soit un total de 2 548 messages bien reçus par les éleveurs. A la fermeture du questionnaire, nous comptons 596 visites du site et 367 enquêtes remplies. Le taux de réponse de cette enquête était donc de 14,4%.

Parmi la population étudiée, la répartition des exploitations était assez hétérogène. La plupart des réponses venaient de la région Ouest, d'exploitations laitières comptant majoritairement 40 à 80 vaches (67%) de race Prim'Holstein essentiellement (74%) et de production moyenne individuelle comprise entre 8000 et 10 000 kg de lait (62%).

Figure 44 : Techniques mises en œuvre par les éleveurs pour le diagnostic des endométrites (n = 234 réponses).

PTR : palpation transrectale ; NSP : ne sais pas

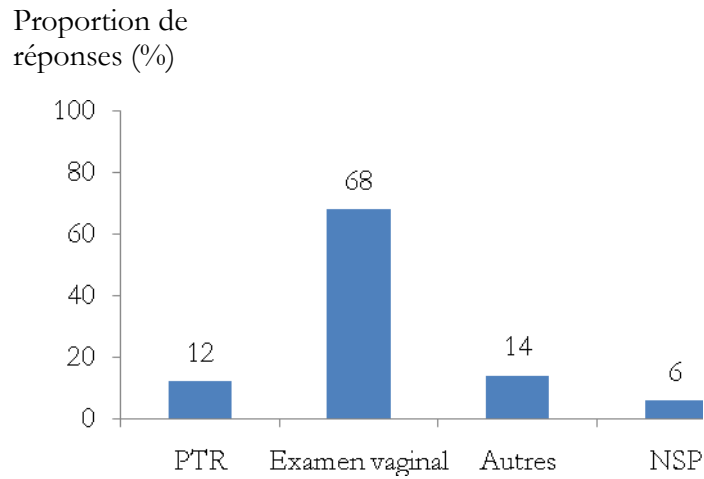
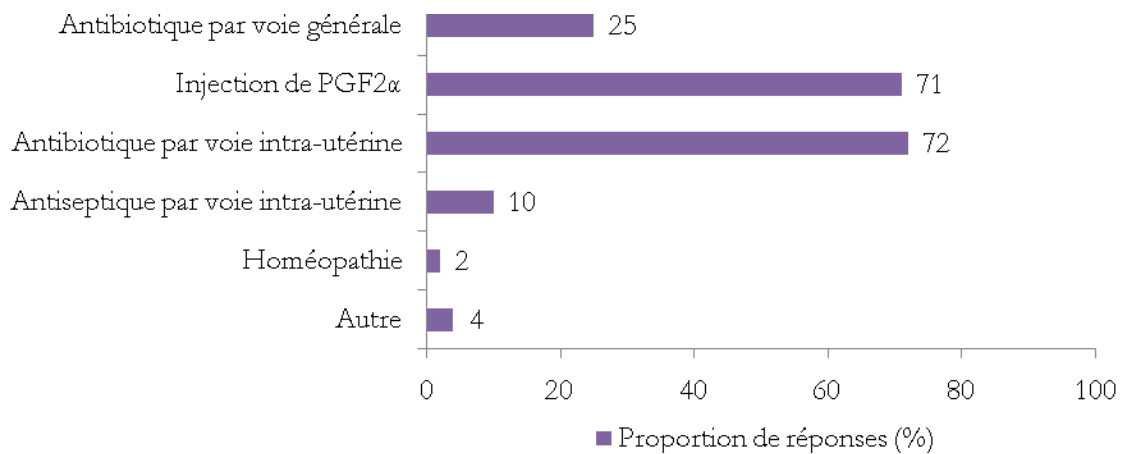


Figure 45 : Modalités thérapeutiques d'une endométrite par les éleveurs (n = 318 réponses).

Plusieurs réponses étaient possibles à cette question.

PGF2 α : Prostaglandines F2 α



2.2.2. Modalités diagnostiques

Une forte proportion d'éleveurs (63%) affirmait rechercher par ses propres moyens les endométrites. La manière la plus employée était l'examen des sécrétions vaginales après recueil à l'aide d'un gant (68%). La palpation transrectale restait largement moins utilisée, mais était néanmoins mise en œuvre par 12% des éleveurs français (figure 44). D'autres méthodes telles que l'échographie utérine ou la mise en place d'un vaginoscope étaient citées ponctuellement.

L'examen était en général mis en œuvre de façon occasionnelle (62%) lors de suspicion sur un animal. Moins fréquemment (25%), il était réalisé sur l'ensemble des vaches à risque d'endométrite et dans seulement 13% des cas, il constituait un examen systématique de toutes les vaches après le vêlage.

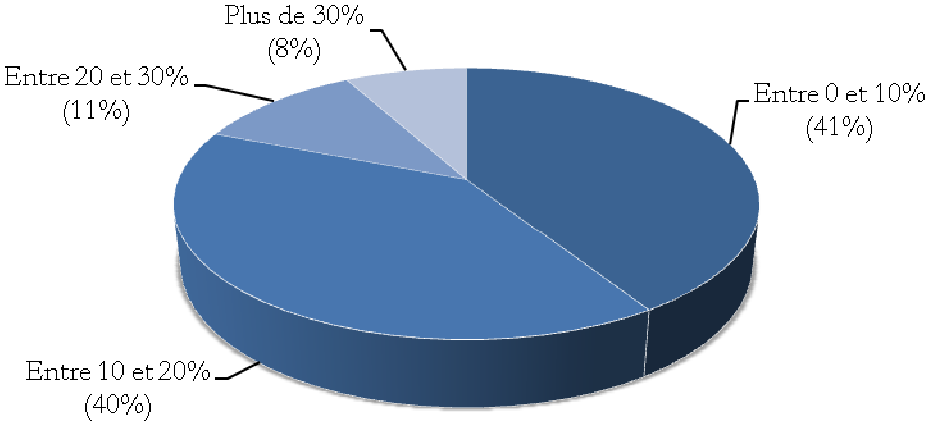
Le caractère pathologique du mucus vaginal était évalué sur la base de quatre photographies de sécrétions recueillies dans un gant (annexe 4). La grande majorité des éleveurs jugeaient les sécrétions mucopurulentes (78%) et purulentes (89%) comme anormales. Par ailleurs, 46% considéraient des sécrétions claires contenant des flocons de pus comme pathogènes et enfin 10% considéraient le mucus translucide comme anormal. Sur les 364 éleveurs ayant répondu, 44% envisageaient la mise en place d'une thérapeutique lors de la présence de flocons de pus et 84% lorsque des sécrétions mucopurulentes étaient présentes. Seulement 15% des éleveurs traitaient uniquement les sécrétions vaginales comportant du pus à plus de 50%. Enfin trois des 365 éleveurs ayant répondu envisageait la mise en œuvre d'une thérapeutique lors de l'identification d'un mucus translucide. Seulement un d'entre eux avait précédemment défini les sécrétions claires comme pathologiques.

2.2.3. Comportement de l'éleveur face à une suspicion

L'enquête a révélé que 67% des éleveurs traitaient eux-mêmes leurs animaux quand ils suspectaient une endométrite. S'ils n'agissaient pas seuls, ils avaient recours au vétérinaire dans seulement 23% des cas ou à l'inséminateur (dans 6% des cas).

Les produits les plus souvent administrés dans le traitement des endométrites étaient les antibiotiques locaux (72%) et les prostaglandines (71%). Plus d'un éleveur sur deux (53%) utilisait les deux types de produits. Les antibiotiques par voie générale étaient mis en œuvre par un quart de la population sondée. D'autres produits restaient plus en marge, tels que les antiseptiques locaux (10%) ou les composés homéopathiques (2% ; figure 45).

Figure 46 : Prévalence des endométrites dans les élevages enquêtés (n = 358 réponses).



2.2.4. Place du vétérinaire dans le diagnostic

Une grande majorité des éleveurs n'organisait pas de recherche systématique des endométrites avec leur vétérinaire. Seuls 20% des exploitants programmaient un contrôle d'involution utérine régulier en post-partum. Dans cette optique, le diagnostic était entrepris chez toutes leurs vaches (78%) ou uniquement les vaches à risque (22%). Le contrôle se faisait majoritairement aux alentours de 30 JPP (64%), 22% le réalisaient plus précocement (autour de 20 JPP) et seulement 14% au-delà de 40 JPP.

2.2.5. Importance et conséquences dans l'élevage

Plus des deux tiers des éleveurs ayant participé à l'enquête pouvaient estimer la prévalence des endométrites dans leur troupeau au cours de la dernière campagne laitière. Selon l'évaluation faite par les éleveurs (figure 46), 41% des exploitations présentaient un taux inférieur à 10% et 40% entre 10 et 20% d'endométrites. Une forte prévalence ($\geq 20\%$ de cas) a été déclarée dans seulement 20% des élevages.

Les principales conséquences des endométrites rapportées par la population sondée étaient : une augmentation du nombre d'inséminations artificielles par vache (81%), un retour en chaleur tardif après vêlage (67%) et une perturbation de la cyclicité (54% ; figure 47). Un tiers des éleveurs rapportait une modification de l'expression des chaleurs. Près de 50% d'entre eux signalaient une atteinte de l'état général de l'animal, 37% une diminution de la production laitière et seulement 4% une modification de la qualité du lait. Avec 67% d'éleveurs qui considéraient important l'impact économique des endométrites, ils étaient près des trois quarts (71%) à juger nécessaire le changement des pratiques d'élevage à partir d'une prévalence de 10 à 30%.

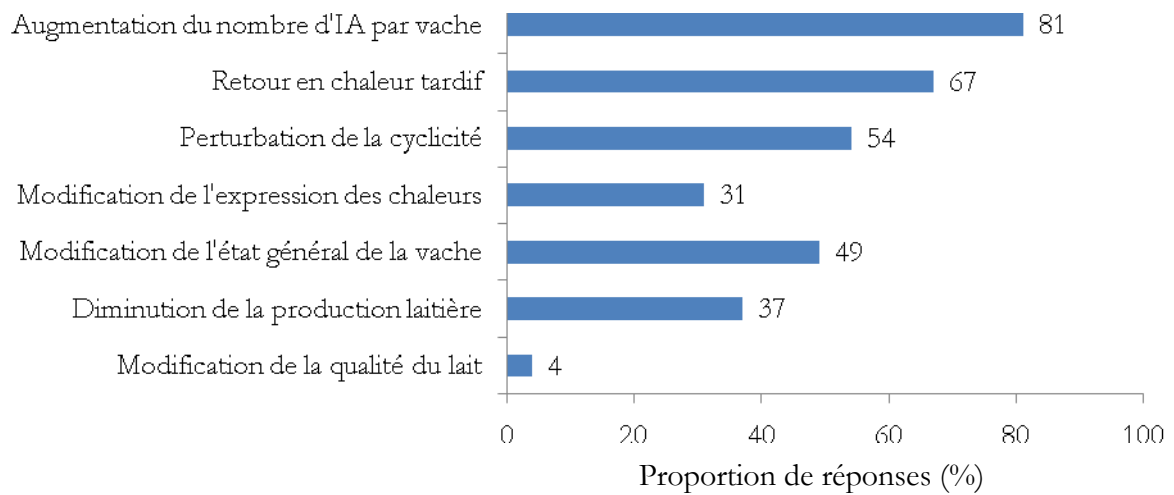
3. Discussion

Ces deux enquêtes ont permis de dresser un bilan des méthodes diagnostiques actuelles des inflammations utérines sur le territoire français, en confrontant les pratiques de deux acteurs de l'élevage, l'éleveur et son vétérinaire. La méthode de sondage électronique a permis une large diffusion de l'enquête et un taux de réponse satisfaisant et supérieur à celui des enquêtes postales (habituellement autour de 10%). La forte différence entre les taux de réponses de ces deux enquêtes est difficilement explicable, car elles reposent sur les mêmes méthodes d'élaboration et de diffusion du questionnaire. Seuls un moins grand intérêt des éleveurs pour cette thématique,

Figure 47 : Principales conséquences des endométrites sur l'animal selon les éleveurs

(n = 362 réponses).

Les pourcentages à droite des barres correspondent à la proportion d'éleveurs ayant répondu positivement à la question



Expression clinique et diagnostic de l'inflammation génitale

Diagnostic des inflammations génitales sur le terrain

qui n'apparaît pourtant pas dans l'analyse des questionnaires, ou une perpétuelle sollicitation à des enquêtes pourraient expliquer leur moins grande motivation que les vétérinaires français.

Avec un total français de 2577 vétérinaires mixtes [187], notre enquête a sondé 17,2% de la population ($n = 444$). Tous les types de structures ont été représentés, de celles comptant moins de 120, à celles de plus de 300 élevages. En ce qui concerne les éleveurs, la population sondée est représentative de l'élevage laitier français. Notre taux de réponse était de près de 15%, avec plus de 360 questionnaires remplis. La plupart des réponses venaient des régions de Bretagne, Pays de la Loire et Basse-Normandie, ce qui est cohérent avec la répartition du cheptel français, ces trois régions regroupant la majorité (33%) des exploitations laitières [188]. Par ailleurs, la proportion de troupeaux de race Prim'Holstein de notre échantillon était relativement équivalente à la moyenne nationale (65% des troupeaux laitiers français [189]). La taille et le niveau de production des troupeaux dans notre échantillon (61 vaches par troupeau, pour une production laitière annuelle de 8 700 kg de lait) étaient légèrement supérieures à la moyenne nationale (41 vaches par troupeau de production annuelle moyenne de 6 000 kg de lait par vache [190]).

Ce travail a révélé que les éleveurs sont concernés et investis dans le diagnostic des endométrites. Ils sont nombreux à utiliser l'examen macroscopique des sécrétions vaginales. Cependant l'appréciation du caractère pathologique du mucus est variable. Alors que seulement la moitié des éleveurs considéraient les sécrétions troubles contenant quelques flocons de pus comme anormales, la quasi-totalité de l'échantillon s'accordait sur le caractère pathologique des mucus purulents, qu'ils contiennent plus ou moins de 50% de pus. Une thérapeutique était presque systématiquement (84%) mise en œuvre lors de l'observation d'un mucus de catégorie [3] (*i.e.*, $\geq 50\%$ pus). L'incertitude résidait pour les catégories [1] et [2]. Dans la population de vétérinaires, ils étaient 76% à utiliser systématiquement l'examen vaginal. Si la proportion de pus dans les sécrétions vaginales reflète la gravité de l'endométrite [39], elle a également, chez les vétérinaires, un impact sur le traitement. Plus de la moitié des praticiens (52%) ont répondu adapter leur thérapeutique en fonction de la quantité de pus observée dans le mucus vaginal. Cependant, l'énoncé de la question ne nous permettait pas de savoir si la modification concernait la molécule utilisée, la dose administrée ou la répétition du traitement. Par ailleurs, les vétérinaires se désintéressaient de certains outils diagnostiques. Le vaginoscope n'était employé systématiquement que par 11% des vétérinaires, et une majorité d'entre eux (56%) affirmait ne jamais l'utiliser. Quant au Metrichick®, 99% des vétérinaires interrogés n'en faisaient jamais usage. Cet outil diagnostique, commercialisé en France depuis seulement quelques années, semble totalement méconnu des vétérinaires. A la différence du gant qui est jeté après l'examen d'un

Expression clinique et diagnostic de l'inflammation génitale

Diagnostic des inflammations génitales sur le terrain

animal, le vaginoscope et le Metriceck® doivent être nettoyés entre deux animaux. Ceci peut être un frein à leur utilisation, même s'ils ont cependant été validés et conseillés dans le diagnostic des endométrites [63,90,191].

Alors que les éleveurs étaient nombreux à réaliser un examen des sécrétions vaginales, ils étaient rares à entreprendre une PTR, probablement en raison de la plus grande complexité de cet examen. Au contraire, les vétérinaires l'utilisaient systématiquement pour 70% d'entre eux, malgré la subjectivité de son résultat. Les praticiens tenaient compte de la taille des cornes utérines (72%), de leur consistance (93%) et de la présence d'une lumière utérine palpable (56%). Tous ces critères sont pourtant sans bonne valeur diagnostique de l'inflammation endométriale (se reporter à la partie IV.A.2.) [63]. Quant au seul critère de bonne valeur diagnostique en PTR - la mesure du diamètre du col (se reporter à la partie IV.A.2.) [63] - seuls 27% des vétérinaires l'utilisaient et parmi eux, moins de 30% au seuil validé de 7 cm [63].

La majorité (70%) des praticiens interrogés ici pratiquaient la PTR après avoir recueilli les sécrétions vaginales, certainement pour des raisons pratiques. Six pourcents des vétérinaires interrogés n'accordant aucune importance à l'ordre dans lequel étaient effectués les examens. On voit ici que le massage des cornes utérines par PTR n'était donc pas suspecté modifier le résultat de l'examen du mucus vaginal.

L'examen échographique utérin était pratiqué par seulement la moitié des praticiens, le temps nécessaire à sa mise en œuvre, l'interprétation des images et la disponibilité de l'appareil au sein du cabinet étant probablement un frein à son utilisation. Quoi qu'il en soit, l'échographie transrectale n'offre pas de bonnes valeurs diagnostiques dans l'évaluation du statut inflammatoire et génère un taux élevé d'animaux faux positifs (se reporter à la partie IV.A.2.), surtout si elle est utilisée en combinaison avec d'autres critères, comme cela apparaît fréquent dans notre enquête (figure 37). L'identification de liquide dans l'utérus à l'échographie étant retrouvée en cas d'œstrus, de gestation, de mortalité embryonnaire ou de kyste folliculaire, ce signe ne doit en aucun cas être relié de façon certaine à la présence d'une inflammation utérine.

Ce travail a révélé un fort interventionnisme des éleveurs dans la gestion des inflammations génitales post-partum de la vache. Avec deux tiers d'éleveurs qui réalisent eux-mêmes le diagnostic, le vétérinaire ou même l'inséminateur ne sont parfois contactés que pour la mise en œuvre d'une thérapeutique. De plus, dans le cadre du Décret Prescription – Délivrance, l'éleveur peut mettre en place une thérapeutique sous les préconisations de son vétérinaire [192]. Il serait également intéressant de connaître le pourcentage d'éleveurs formés à l'insémination bovine en France, car ils étaient nombreux (72%) dans notre enquête à déclarer traiter par des antibiotiques

Expression clinique et diagnostic de l'inflammation génitale

Diagnostic des inflammations génitales sur le terrain

intra-utérins et donc devoir maîtriser le cathétérisme utérin. Les principaux produits utilisés par les vétérinaires et de fait par les éleveurs, sont les antibiotiques locaux ainsi que les prostaglandines (figures 43 et 45). Ces enquêtes ne permettent malheureusement pas de savoir quelle était la fréquence d'association des prostaglandines et des antibiotiques intra-utérins. Nous savons simplement que 76% des vétérinaires et 53% des éleveurs utilisent les deux types de produits.

Certains praticiens et éleveurs utilisent des traitements systémiques (antibiotique, anti-inflammatoires non stéroïdiens) normalement réservés au traitement des métrites avant 21 JPP [193]. En effet, cette thérapeutique par voie générale est tout d'abord inefficace pour le traitement des endométrites, mais elle implique aussi un coût et un temps d'attente pour le lait souvent importants. Une confusion dans la terminologie des infections utérines est sûrement la cause de l'erreur.

Il apparaît clairement dans ces enquêtes que le contrôle d'involution utérine systématique n'est pas une pratique courante dans les élevages français. En effet, 80% des éleveurs ne programmaient pas de contrôle des animaux après le vêlage et avant la mise à la reproduction. Les principaux obstacles au développement d'un suivi de reproduction peuvent être le manque de motivation des éleveurs, la concurrence d'autres intervenants et le manque de disponibilité des vétérinaires [194,195]. Un coût trop important et des difficultés d'organisation sont généralement moins cités, mais peuvent limiter sa mise en place [194]. Lorsqu'il était pratiqué, le contrôle de la santé utérine était généralement précoce, vers 30 JPP (78%). Il est cependant regrettable que plus de la moitié des vétérinaires (59%) ne recherchait jamais une endométrite entre 60 et 90 JPP, moment pourtant clé de la période mise à la reproduction. Le repeat breeding (infertilité à chaleurs normales) constituait un motif d'examen de la fonction génitale pour 84% des praticiens, ce qui est très encourageant. Malheureusement, plus d'un vétérinaire sur trois (36%) ne vérifiait pas la santé de l'utérus lors d'œstrus post-partum. Une inflammation de l'endomètre a pourtant été clairement établie comme cause de reprise tardive de la cyclicité post-partum (progestéronémie basale pendant les premiers 50 JPP) et de corps jaune persistant (progestéronémie élevée pendant plus de 20 jours) [55]. Le lien entre l'endométrite et la perturbation du fonctionnement ovarien reste donc encore méconnu chez beaucoup de praticiens, alors qu'il est clairement identifié par une majorité d'éleveurs comme le montre cette enquête. Même si les éleveurs étaient nombreux à identifier majoritairement des conséquences sur la fertilité et la cyclicité ovarienne, certains rapportaient une altération de l'état général,

Expression clinique et diagnostic de l'inflammation génitale

Diagnostic des inflammations génitales sur le terrain

confondant probablement encore une fois les endométrites avec les métrites, qui apparaissent dans les 21 premiers JPP.

L'éleveur est donc investi dans la prise en charge des inflammations utérines de la vache, par son rôle dans le diagnostic et sa position de relais avec le vétérinaire. Face à la multitude de techniques et de critères disponibles, il semble essentiel d'informer les vétérinaires praticiens sur les valeurs diagnostiques de chacun d'eux. Non pour les obliger à changer leurs pratiques, mais pour leur donner les clés de l'interprétation du résultat.

Enfin, une diffusion d'un questionnaire à l'échelle internationale permettrait de confronter les pratiques de différents pays.

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Objectifs généraux du travail

Notre travail s'est tout d'abord intéressé à l'inflammation génitale physiologique et ses variations au cours du post-partum et du cycle œstral. Après avoir déterminé les seuils critiques à partir desquels les inflammations endométriale et endocervicale devenaient pathologiques (au moins dans notre population), nous avons évalué l'impact sur les performances de reproduction ultérieures à court (mise à la reproduction) et à long terme (vers 30 JPP) d'une inflammation de l'utérus et/ou du col. Ensuite, nous avons étudié l'expression clinique de l'inflammation génitale, et donc caractérisé les valeurs diagnostiques de différentes techniques. Ce travail s'est clôturé par un bilan du recours réel à ces différentes procédures sur le territoire français, par les éleveurs et les vétérinaires praticiens.

Choix de l'examen cytologique génital

S'agissant d'étudier le statut inflammatoire génital, il nous fallait d'abord choisir une technique de référence permettant de le caractériser. Cette technique devait être objective, répétable, fournir un résultat quantitatif, être utilisable *in vivo* et *ex vivo*, et enfin garantir une totale innocuité pour la fertilité ultérieure des animaux. D'autre part, elle devait permettre d'évaluer séparément les inflammations utérine et cervicale.

L'examen cytologique remplissait toutes ses caractéristiques. Bien que l'inflammation génitale soit au départ d'origine bactérienne, nous n'avons pas retenu l'examen bactériologique.

Limites de l'examen bactériologique

La définition de l'endométrite proposée par Sheldon *et al.* [3] ne repose pas sur une caractérisation bactériologique de la lumière utérine. Elle se base sur un critère histologique, à savoir l'existence d'une inflammation superficielle de l'endomètre au-delà de 21 JPP. Hormis Williams *et al.* [39], qui ont évalué l'impact de la densité de croissance d'*A. pyogenes* sur l'IVIF, la majorité des essais a étudié l'association entre l'inflammation cytologique de l'endomètre et les performances de reproduction [4,45,60]. Nous avons donc cherché à caractériser la relation entre l'infection utérine (présence et nature du micro-organisme) et l'inflammation génitale (proportion de neutrophiles parmi la population cellulaire du frottis). Dans notre essai (section I.D. des résultats), la médiane d'inflammation endométriale n'était pas significativement modifiée en

fonction de la présence ou de la pathogénicité des contaminants utérins. D'autres études rapportent le manque de concordance entre les résultats des examens bactériologique et histologique [86,126]. Une explication pourrait reposer sur le phénomène dynamique de colonisation bactérienne post-partum : Griffin *et al.* [15] observent des phases de croissance bactérienne interrompues par des périodes d'inhibition, puis de réactivation durant les 50 premiers JPP, sans lien direct avec les données histologiques, ni la fertilité ultérieure. D'autre part l'absence de corrélation entre des prélèvements bactériologiques hebdomadaires au-delà de 21 JPP [15] remet en question la fiabilité de cet examen. Selon Griffin *et al.* [15], l'examen bactériologique n'est prédictif de la fertilité que s'il existe une corrélation entre la flore bactérienne isolée et les résultats de la biopsie. Dans le cas inverse, l'infertilité risque d'être attribuée à un germe présent de manière transitoire et inoffensive. Cette étude [15] remet donc radicalement en cause la valeur diagnostique de l'examen bactériologique durant le post-partum.

D'autre part, même si l'examen bactériologique permet de caractériser séparément l'utérus et le col, on peut s'interroger sur la valeur diagnostique de l'écouvillon cervical. Le col, à l'interface entre la lumière utérine et l'environnement extérieur, peut être colonisé par des germes opportunistes [125]. Les bactéries isolées lors d'un écouvillonnage cervical ou vaginal correspondent respectivement à seulement 20 et 30% des germes identifiés dans l'utérus. Inversement, dans notre étude (partie I.D.), la médiane d'inflammation endocervicale n'était pas modifiée par la présence ou la pathogénicité des contaminants de l'utérus.

Enfin, une des limites majeures de l'examen bactériologique est la difficulté d'obtention d'une croissance bactérienne en culture *in vitro* en conditions aéro- et anaérobies. McDougall [126] obtenaient 79% de cultures négatives après écouvillonnage utérin de 105 vaches infertiles. Dans notre essai, 36% des cas d'inflammation endométriale pathologique ($\geq 6\%N$) et 89% des cas d'inflammation endocervicale pathologique ($\geq 5\%N$) n'ont donné lieu à aucune croissance bactérienne. La caractérisation du statut bactériologique par la technique classique de culture n'est donc pas pertinente dans l'évaluation de l'inflammation génitale post-partum de la vache. La question est de savoir si l'utérus est effectivement stérile, suite à la progressive élimination des contaminants de la lumière utérine au cours du post-partum [6,145] ou si les bactéries sont réellement présentes dans la cavité utérine, mais ne peuvent pas être mises en évidence par la technique classique de culture *in vitro*.

Des procédures autres que la culture conventionnelle en conditions aéro- et anaérobies peuvent être proposées. L'identification d'un ou de quelques germes peut être réalisée par PCR (Polymerase Chain Reaction). Sheldon *et al.* [17] utilisent cette technique pour déterminer l'appartenance phylogénique de souches d'*Escherichia coli* isolées dans l'utérus bovin, en vue de

développer des traitements ou vaccins spécifiques des souches pathogènes. Liu *et al.* [196] la mettent en œuvre dans l'étude de l'expression de certains intégrons qui modulent l'antibiorésistance d'une souche d'*Arcanobacterium pyogenes* d'origine bovine. Mais la technique de PCR ne permet pas d'évaluer l'ensemble des types bactériens qui colonisent le tractus génital.

D'autres stratégies identifient l'intégralité de la population bactérienne présente, comme l'approche métagénomique [197]. La métagénomique descriptive fournit une vue de la structure d'une communauté bactérienne, avec son abondance et sa distribution d'espèces, sans étape de culture préalable [198-200]. Son principe repose sur une extraction d'acides nucléiques microbiens (par lyse mécanique et/ou enzymatique) et des méthodes d'enrichissement et d'amplification du génome par PCR quantitative du gène codant pour l'ARNr 16S, en vue d'un séquençage haut débit [200]. Alors que la microbiologie traditionnelle et le séquençage de génomes s'appuient sur des cultures clonales cultivées, la métagénomique permet d'accéder aux organismes difficiles à isoler et à cultiver [197-200]. Elle a ainsi permis l'étude d'écosystèmes bactériens complexes, notamment la communauté microbienne intestinale de l'homme. Or, l'utérus et l'intestin représentent deux systèmes comparables par la richesse de leur contamination et la présence de germes opportunistes (le microbiote intestinal est composé de 10^{11} bactéries, majoritairement anaérobies, par gramme de matière fécale [199]). Il serait intéressant d'appliquer cette approche à la flore utérine, pour caractériser et comprendre la communauté microbienne génitale post-partum de la vache.

Innocuité de la biopsie utérine et cervicale

L'analyse histologique permet une bonne prédiction des performances de reproduction [75]. Cependant, la complexité de cette méthode (technicité, délai d'obtention du résultat, coût) limite son utilisation. Si l'innocuité de la biopsie utérine, longtemps mise en doute dans la littérature [75,76], a néanmoins été récemment démontrée par Chapwanya *et al.* [78], il reste à déterminer si des examens histologiques répétés de l'endomètre seraient compatibles avec un suivi du statut inflammatoire utérin. De plus, l'innocuité d'une ou plusieurs biopsies du second anneau du col n'a jamais été explorée.

Par ailleurs, l'examen histologique ne permet pas réellement une évaluation quantitative du statut inflammatoire, mais une analyse qualitative ou semi-quantitative. Les critères recueillis qualifient généralement l'aspect de l'épithélium luminal, la morphologie glandulaire, la fibrose périglandulaire, ainsi que l'infiltration leucocytaire du stroma conjonctif [78,100,124,126]. Face à la complexité de la lecture d'un prélèvement histologique, il serait nécessaire d'évaluer la répétabilité intra- et inter-observateur de cette analyse.

L'examen histologique, s'il n'est pas mis en œuvre *in vivo* à grande échelle, peut néanmoins être utilisé pour valider les résultats de l'examen cytologique, étant donné qu'il apporte des renseignements plus complets sur le statut inflammatoire de l'endomètre. Dans cette optique, nous avons collecté des échantillons (en cours d'analyse), avec pour objectif de comparer les résultats des examens histologique et cytologique de quatre sites de prélèvement de 101 utérus *ex vivo*.

Dosages non spécifiques de l'inflammation génitale

Des prélèvements vaginaux ou sanguins peuvent être utilisés pour caractériser le statut inflammatoire génital. Nous avons montré (partie IV.A.1.) que l'examen des sécrétions vaginales constituait la technique macroscopique de meilleure valeur diagnostique dans l'évaluation du statut inflammatoire génital. Cependant, comme pour les autres procédures classiquement utilisées par les éleveurs et les vétérinaires français (PTR et échographie transrectale ; partie IV.B), la détermination du critère pathologique repose en partie sur l'appréciation de l'opérateur. Dans le cas de l'examen du contenu vaginal, une incertitude demeure quant à la classification des flocons de pus (parties IV.A.3. et IV.B.). Pour palier la subjectivité du diagnostic macroscopique, un dosage biochimique des composants du mucus vaginal susceptibles de varier avec l'inflammation pourrait être utilisé.

Les bandelettes Multistix® (Bayer Diagnostics ; Leverkusen, Allemagne) ont été proposées dans l'évaluation semi-quantitative des leucocytes présents dans le liquide de lavage utérin [118]. Dans son utilisation classique, le test détecte dans l'urine les leucocytes intacts et déjà lysés par la mise en évidence de l'activité des estérases granulocytaires. Les enzymes de la bandelette Multistix® ne réagissent pas avec les cellules épithéliales (contrairement au California Mastitis Test ; test au Teepol), ni les érythrocytes. Les échelles colorimétriques permettent d'obtenir une évaluation semi-quantitative de la concentration en leucocytes (d'une totale absence jusqu'à une concentration d'environ 500 leucocytes/ μ l d'urine). Pour du liquide de lavage utérin bovin, Santos *et al.* [118] obtenaient de bonnes concordance ($\kappa = 0,622$; $P < 0,01$) et corrélation ($r = 0,774$; $P < 0,01$) entre les résultats de la bandelette Multistix® et l'évaluation quantitative du taux de neutrophiles par comptage différentiel de la population cellulaire d'un frottis endométrial. Le recueil du mucus cervico-vaginal étant d'un accès plus facile que les sécrétions utérines, le test rapide proposé par Santos *et al.* [118] pourrait être réalisé sur le contenu de la cavité vaginale (sous réserve de la concordance entre l'inflammation utérine et le contenu vaginal ; voir plus loin).

Discussion générale et perspectives

Une autre possibilité reposerait sur le dosage direct de la concentration en leucocytes totaux contenu dans les sécrétions vaginales. La relation entre la proportion de leucocytes vaginaux et l'inflammation endométriale n'a jamais été testée. Néanmoins Mascarhenas [7] a rapporté une altération significative du taux de réussite à l'insémination au dessus d'un seuil de $25 \cdot 10^3$ leucocytes par gramme de mucus vaginal.

Les stratégies diagnostiques reposant sur le recueil de sécrétions vaginales (dosage des leucocytes ou des immunoglobulines par une méthode directe ou un test rapide) constituent une alternative au cathétérisme cervical. Néanmoins, elles se confrontent au problème de solubilisation du mucus [7], mais surtout au manque de spécificité des sécrétions contenues dans la lumière vaginale. S'il n'est pas nécessaire de faire la distinction entre une origine utérine ou cervicale du contenu de la cavité vaginale (ces deux sites d'inflammation étant délétères pour la fonction de reproduction ; partie II. des résultats), les inflammations vaginales ne semblent en revanche pas altérer la fertilité ultérieure de l'animal. Une inflammation locale de la cavité vaginale est d'ailleurs observée dans plus de 50% des traitements de synchronisation de l'œstrus à base de dispositifs intravaginaux (progestagènes), sans pour autant affecter la réussite à l'insémination [201]. La prise en compte des cas de vaginite, cystite ou pyélonéphrite a pour conséquence une surestimation de la prévalence des inflammations endocervicale ou endométriale, diagnostiquée sur la base d'un examen des sécrétions vaginales.

Dans notre travail, les marqueurs vaginaux, comme les marqueurs sanguins (dosage des protéines de phase aiguë, dosage des prostanoïdes, dosage biochimique et numération-formule leucocytaire ; partie II.C.3. de l'analyse bibliographique) n'ont pas été retenus comme technique de référence, puisque ces méthodes sont non spécifiques de l'inflammation génitale et ne permettent pas de suivre séparément le statut inflammatoire du col et celui de l'utérus.

Validation de l'examen cytologique génital

Depuis l'étude préliminaire de Gilbert *et al.* [64] et la démonstration par Kasimanickam *et al.* [4] de l'intérêt de l'examen cytologique dans le diagnostic des formes subcliniques d'endométrite, cette technique a été mise en œuvre par de nombreuses équipes de recherche dans le monde. Généralement utilisée pour caractériser le statut inflammatoire endométrial bovin [4,45,60,129], elle a également constitué à deux reprises le test de référence pour comparer les valeurs diagnostiques d'autres procédures [60,88].

Bien qu'utilisée chez les bovins depuis plusieurs années, une imprécision persistait quant à la population leucocytaire caractéristique de l'inflammation. Notre étude s'est donc attachée

(partie I.A.) à la description qualitative et quantitative de la population rencontrée lors d'un frottis endométrial, mais surtout lors d'un prélèvement endocervical, technique encore peu développée en pratique bovine [115,116]. Nous avons ajouté une validation de la fiabilité de lecture par le calcul des concordances intra- et inter-opérateur (partie I.B.). La répétabilité de la technique s'est révélée bonne. De plus, les frottis génitaux étaient le plus souvent homogènes et le comptage de 200 cellules donnait un bon reflet de l'ensemble de la lame. Nous avons montré que les neutrophiles constituaient la sous-population prédominante post-partum et que le taux de neutrophiles caractérisait le statut inflammatoire génital bovin. Enfin l'innocuité a été validée par l'utilisation de l'examen cytologique pendant trois campagnes laitières, au cours desquelles nous n'avons pas mis en évidence de détérioration de la fertilité des animaux prélevés par examen cytologique par rapport à la population d'animaux non collectés. Par ailleurs, deux essais ont reposé sur des prélèvements répétés et successifs au cours du temps : le premier (partie III.A.) consistait en un prélèvement hebdomadaire cytologique endocervical et endométrial de 40 vaches, pendant une durée variant de 4 à 18 semaines selon la date de la réforme ou de la mise à la reproduction ; le deuxième (partie II.B.) nécessitait des prélèvements cervicaux et utérins répétés chez 26 vaches tous les quatre à cinq jours, pendant une durée de 26 à 34 jours. Lors de la réalisation des frottis cytologiques répétés, nous n'avons pas observé d'augmentation du taux de neutrophiles génitaux suite au prélèvement. Enfin, la littérature n'a encore jamais rapporté d'irritation de l'endomètre suite au passage de la cytobrosse, d'apparition de symptômes cliniques, ni de détérioration des performances de reproduction [73,88].

L'examen cytologique génital par utilisation d'une cytobrosse est donc une procédure précise, rapide, fiable et peu coûteuse de caractérisation du statut inflammatoire. Par ailleurs, elle permet de suivre séparément l'inflammation dans les différents sites du tractus génital. Nous l'avons donc retenue comme technique de référence après avoir validé les conditions de prélèvement et de lecture.

Homogénéité de l'inflammation dans le tractus génital

Les prélèvements cytologiques de différents sites de l'appareil génital bovin (col, corps utérin, corne droite et corne gauche) ont révélé que l'inflammation n'était pas homogène dans le tractus bovin femelle (partie I.C. des résultats). Notamment, l'inflammation endocervicale ne reflétait pas l'inflammation endométriale à un moment donné : une médiocre concordance ($Q_c = 0,38$; IC95%, 0,32 – 0,44 ; $n = 745$) existait entre les résultats des examens cytologiques

utérins et cervicaux. La concordance n'était pas meilleure entre les diagnostics d'endométrite et de cervicite ($\kappa = 0,45$; $n = 200$). Contrairement à ce qui a été proposé par Ahmadi *et al.* [115,116], l'examen cytologique endocervical n'est donc pas une alternative au cathétérisme cervical. Nos résultats montrent que le col et le corps utérin constituent deux compartiments génitaux distincts d'un point de vue inflammatoire.

Plusieurs hypothèses peuvent expliquer cette différence entre les statuts inflammatoires cervical et utérin. Entre la cavité vaginale septique et la cavité utérine stérile, se trouve le canal cervical, long et sinueux, qui constitue un obstacle physique à la diffusion d'une contamination de l'environnement extérieur vers la lumière utérine. Le canal cervical, généralement stérile, peut se contaminer à partir du vagin par l'intermédiaire de sa partie basse. Il est donc possible qu'une inflammation endocervicale soit observée en l'absence d'inflammation de la lumière utérine.

L'isolement à partir de la muqueuse cervicale d'agents, également retrouvés dans la lumière utérine [125], ne permet pas de conclure quant au sens de la contamination. Cependant, alors que les sécrétions muqueuses épaisses constituent un système occlusif protégeant l'utérus de l'intrusion d'agents hostiles [7], le col peut devenir imparfaitement imperméable dans certaines circonstances. Lors de l'œstrus par exemple, le réseau de mailles de la glaire cervicale se desserre laissant remonter les gamètes dans le tractus génital femelle ; par ailleurs au moment du vêlage, le col perd encore plus particulièrement son rôle de barrière, puisqu'il reste béant durant les sept jours qui suivent. A ces occasions, une intrusion de germes dans l'utérus peut avoir lieu. Dans ces circonstances, une inflammation endocervicale pourrait donc précéder l'afflux de neutrophiles dans l'endomètre utérin.

Inversement, le canal cervical est traversé par des flux descendant de l'utérus vers la cavité vaginale. Les contractions du myomètre, associées aux battements ciliaires de l'épithélium endométrial, repoussent les éléments nocifs et les déchets vers le vagin [7]. Cela peut être observé lors de métrite, pyomètre (dans sa forme ouverte) et d'endométrite clinique, où le contenu de la lumière utérine est retrouvé en partie dans la cavité vaginale [2,39,63]. Le canal cervical peut alors être contaminé par des bactéries et/ou développer une inflammation locale suite à l'irritation de la muqueuse au passage des débris utérins. L'inflammation endométriale précéderait, selon cette hypothèse, l'inflammation du col.

Enfin, on peut envisager que la contamination conjointe du col et de l'utérus qui se produit lors du vêlage pourrait évoluer selon deux cinétiques d'inflammation différentes, en fonction de l'immunité propre de chaque organe. Chacun des compartiments résoudrait ainsi l'inflammation

selon des paramètres qui lui sont propres, comme suggèrent les durées d'involution anatomique différentes de ces deux compartiments [11].

Cinétique d'évolution de l'inflammation génitale

La cinétique d'évolution de l'inflammation génitale n'avait été suggérée que par la diminution des seuils d'inflammation pathologique proposés dans la littérature au cours du post-partum : les seuils calculés étaient de 18% entre 21 et 30 JPP [4], puis compris entre 6,5 et 10% entre 30 et 40 JPP [4,60,133] et enfin entre 4 et 5% entre 40 et 60 JPP [45,133]. Notre travail (partie III.A.) a suivi chez 40 vaches l'inflammation génitale au cours du post-partum. Cette étude a révélé une décroissance nette du %N génitaux au cours du post-partum précoce (réduction de près de 20% du %N utérins entre 21 et 35 JPP) jusqu'au nadir de la courbe situé entre 45 et 60 JPP. Cette cinétique d'inflammation est donc cohérente avec les involutions histologique et bactériologique de l'utérus post-partum, qui atteignent leur terme entre 50 et 60 JPP [11].

Par ailleurs, les profils d'évolution des %N endocervicaux et endométriaux sont apparus tout à fait similaires au cours du temps. Cette observation est contradictoire avec la médiocre concordance des résultats cytologiques des compartiments utérins et cervicaux (partie I.C.), et la durée de l'involution anatomique post-partum. En effet, alors que l'utérus retrouve sa taille prégravidique vers 30 à 45 JPP, l'involution du compartiment cervical nécessite une vingtaine de jours supplémentaires [11].

Le schéma global d'évolution de l'inflammation génitale correspond donc à une décroissance du %N en post-partum précoce, suivi d'une stabilisation du %N à un niveau basal jusqu'à la mise à la reproduction. Cependant, l'étude des courbes individuelles a révélé trois profils d'évolution différents. Pour plus de la moitié des animaux, des pics de réactivation de l'inflammation, de résolution rapide et spontanée (d'une durée inférieure à sept jours), étaient observés au-delà de 45 JPP. Selon les individus, le nombre et la fréquence des réactivations étaient variables. Ces réactivations peuvent peut-être s'expliquer par une rupture de l'équilibre entre la croissance bactérienne et le système de défense de l'utérus. Le statut énergétique ou stéroïdien (voir plus loin) pourrait alors être incriminé dans la baisse de l'immunité de l'animal et ainsi conduire à des réactivations de la croissance bactérienne, comme suggéré par Griffin *et al.* [15].

D'autres individus présentaient une inflammation génitale extrêmement faible dès le post-partum immédiat, qui pouvait être liée à une absence de contamination bactérienne au moment du vêlage (près de 10% des bovins présentent une culture utérine stérile au moment du vêlage [14]) ou à une immunodépression post-partum (incapacité à mobiliser une réponse immunitaire adaptée).

Enfin, le troisième profil concerne les inflammations fortes et durables au cours du temps. Elles regroupent probablement des animaux caractérisés par une importante colonisation bactérienne initiale, favorisée par des facteurs de risque (dystocies, rétention placentaire), ou des cas d'exacerbation de la réponse immunitaire, comme suggéré par Chapwanya *et al.* [10] et Wathes *et al.* [36].

Des facteurs individuels peuvent donc être suspectés, expliquant ces profils différents. Ils pourraient aussi être impliqués dans la plus ou moins grande susceptibilité des individus à la persistance d'une inflammation génitale au-delà de 21 JPP. Notre étude (partie III.C.) n'a cependant pas démontré, probablement en raison d'un manque de puissance statistique, l'existence de facteurs propres à l'animal ou au déroulement du vêlage, significativement associés à la présence d'une inflammation génitale entre 21 et 35 JPP. Toutes nos analyses statistiques ont néanmoins été ajustées selon les variables identifiées dans la littérature comme facteurs de confusion potentiels, à savoir la parité et la NEC (parties II.A, II.B., IV.A.1. et IV.A.3.). La grande majorité de nos essais ayant été conduits dans trois élevages distincts, nos analyses ont également été ajustées sur la ferme d'origine. Enfin, quand les données étaient disponibles, les variables de production laitière et de déficit énergétique des trois premiers mois de lactation ont été incluses dans le modèle (partie III.A.). Une caractérisation plus précoce du statut énergétique dès la période pré-partum par des marqueurs sanguins (AGNE, β -OH, glucose, urée) aurait permis d'évaluer son rôle dans l'apparition d'une inflammation génitale.

Par comparaison à l'étude de la susceptibilité génétique aux mammites et à la rétention placentaire [177,202], la recherche du déterminisme génétique (Quantitative Trait Loci [QTL]) des inflammations génitales pourrait être envisagée. En effet, chaque animal possède un statut immunitaire particulier qui le prédispose ou non à la persistance d'une inflammation génitale post-partum [30]. Certains gènes candidats ont déjà été évoqués, tels que ceux codant pour la famille des protéines S100 [36] et les protéines anti-microbiennes (TAP et DEFB5) [10], toutes deux sur-régulées chez des vaches développant une inflammation génitale. L'examen du transcriptome et/ou du protéome des vaches affectées pourrait permettre, outre une meilleure connaissance de la pathogénie, l'identification précoce des animaux à risque.

Influence des hormones stéroïdes

Dans notre travail, l'influence des hormones stéroïdes sur l'inflammation génitale a été observée sous deux angles : l'impact d'une reprise précoce de la cyclicité post-partum sur l'inflammation génitale et le lien entre la phase du cycle œstral et le %N génitaux.

Même si les résultats de la littérature sont parfois contradictoires, il est généralement admis que les vaches présentant une reprise précoce de la cyclicité ovarienne (*i.e.*, avant 35 JPP [147]) présentent de meilleures performances de reproduction [146]. De plus, il a été suggéré que les vaches qui ovulent précocement tendent à résoudre l'inflammation utérine post-partum plus rapidement [73,88,146] : une concentration sanguine faible en progestérone ($< 1,3$ ng/ml) la troisième semaine post-partum (reflétant l'absence d'ovulation du premier follicule post-partum) conduit à une augmentation du risque d'endométrite (diagnostiquée par examen cytologique) à sept semaines post-partum [146].

Notre étude (partie III.A.) a décrit l'évolution de l'inflammation génitale au cours du post-partum chez des vaches présentant ou non une reprise précoce de la cyclicité ovarienne. Les cinétiques sont globalement similaires, mais la modélisation a néanmoins suggéré (variation non significative) un taux de neutrophiles plus élevé en post-partum tardif (au-delà de 70 JPP) lors d'une reprise précoce de la cyclicité. Nous pouvons émettre l'hypothèse qu'une concentration élevée en progestérone avant la fin de l'involution bactériologique de l'utérus (persistance de germes dans la lumière utérine) augmenterait la susceptibilité de l'animal aux infections [149]. La progestérone, agissant sur un milieu utérin contenant encore certains types bactériens et/ou une quantité trop importante de germes, favoriserait donc une réactivation de la réponse inflammatoire génitale.

Cependant, il reste impossible de conclure quant à l'impact des stéroïdes sur l'immunité génitale. Outre ce lien non significatif entre précocité de la cyclicité et taux de neutrophiles, un autre volet de notre travail (partie I.A.) n'a pas montré d'influence de la progestéronémie (< 1 ng/ml *vs.* ≥ 1 ng/ml) sur la proportion de neutrophiles endométriaux ou endocervicaux. Inversement, notre suivi au cours du cycle (partie III.B.) a révélé une augmentation du %N endométriaux pour des concentrations basses (< 1 ng/ml) en progestérone plasmatique. Nos résultats contradictoires reflètent la diversité des données de la bibliographie (tableau 10).

Malgré la confusion des résultats des différentes études, le concept historique de plus grande susceptibilité de l'utérus aux infections en phase lutéale reste couramment admis [149].

Tableau 21 : Seuils d'inflammation définissant une endométrite subclinique dans la bibliographie.

JPP : Jours post-partum ; PMN : Polymorphonucléaire ; ROC : Receiver Operating Characteristic

Référence	Pays	Effectif	Méthode	Période d'examen	Seuil	Détermination du seuil
Gilbert <i>et al.</i> [64]	USA	159 vaches laitières	Cytologie (lavage utérin)	40 - 60 JPP	$\geq 0\%$ PMN	Non précisé
Kasimanickam <i>et al.</i> [4]	Canada	228 Holstein	Cytologie (cytobrosse)	20 - 33 JPP 34 - 47 JPP	$\geq 18\%$ PMN $\geq 10\%$ PMN	Courbe ROC
Gilbert <i>et al.</i> [45]	USA	141 Holstein	Cytologie (lavage utérin)	40 - 60 JPP	$\geq 5\%$ PMN	Non précisé
Kasimanickam <i>et al.</i> [208]	Canada	215 Holstein	Cytologie (cytobrosse)	20 - 33 JPP	$\geq 18\%$ PMN	D'après Kasimanickam <i>et al.</i> [4]
Hammon <i>et al.</i> [50]	USA	83 Holstein	Cytologie (lavage utérin)	1 sem. avant vêlage 4 sem. PP 8 ^{ème} sem. PP 20 JPP	$> 25\%$ PMN	Non précisé
Parlevliet <i>et al.</i> [61]	Pays-Bas	100 vaches laitières	Cytologie	30 JPP 40 JPP	Non précisé	Non précisé
Barlund <i>et al.</i> [60]	Canada	221 Holstein	Cytologie (cytobrosse + lavage)	28 - 41 JPP	$\geq 8\%$	Modèle de Cox
Bacha et Regassa [139]	Ethiopie	59 vaches croisées Holstein - Zébu	Cytologie (lavage utérin)	4 ^{ème} sem. PP 8 ^{ème} sem. PP	$\geq 5\%$ PMN	D'après Gilbert <i>et al.</i> [45]
Baranski <i>et al.</i> [134]	Pologne	80 vaches	Cytologie (cytobrosse)	28 JPP 42 JPP	$\geq 18\%$ PMN $\geq 10\%$ PMN	Non précisé
Gabler <i>et al.</i> [204]	Allemagne	27 vaches	Cytologie (cytobrosse)	4 ^{ème} sem. PP 8 ^{ème} sem. PP	$\geq 5\%$ PMN	Non précisé
Galvao <i>et al.</i> [133]	USA	406 Holstein	Cytologie (lavage utérin)	21 JPP 35 JPP 49 JPP	$\geq 8,5\%$ PMN $\geq 6,5\%$ PMN $\geq 4\%$ PMN	Courbe ROC
Galvao <i>et al.</i> [131]	USA	202 Holstein	Cytologie (lavage utérin)	55 \pm 3 JPP	$\geq 5\%$ PMN	D'après Gilbert <i>et al.</i> [45]
Kaufmann <i>et al.</i> [129]	Allemagne	201 Holstein Frisonnes	Cytologie (cytobrosse)	> 65 JPP (4 h après IA1)	$\geq 15\%$ PMN	Valeur comprise entre les 2 seuils proposés par Kasimanickam <i>et al.</i> [4]

Une des difficultés dans l'analyse de la littérature est aussi la signification accordée à un taux de neutrophiles élevé. Si un %N endométriaux plus important est observé en phase folliculaire par rapport à la phase lutéale, il est considéré comme immunoprotecteur [83]. Au contraire, une infiltration de neutrophiles dans l'endomètre est considérée comme pathologique et constitue la définition de l'endométrite proposée par Sheldon [3]. Dans l'espèce porcine, une augmentation de la proportion de neutrophiles endométriaux en phase folliculaire est considérée comme perturbatrice de la remontée des spermatozoïdes et délétère pour la fécondation [203]. Il resterait donc à déterminer si une forte diapédèse leucocytaire vers la lumière utérine doit être considérée comme un facteur de résistance aux infections ou inversement, si elle n'est que le symptôme d'une incapacité de l'utérus à inhiber le développement bactérien, les neutrophiles continuant à être dirigés vers l'utérus. La signification biologique du taux de neutrophiles prête donc à confusion, l'inflammation génitale étant le signe d'une mobilisation du système immunitaire, le plus souvent dans un but bénéfique, mais peut aussi être néfaste par modification de l'environnement des gamètes (empêchant la fécondation) ou de l'embryon (provoquant une mortalité embryonnaire).

Nécessité d'une définition des seuils pathologiques

Face à la dynamique d'évolution post-partum de la proportion de neutrophiles dans le tractus génital femelle, la détermination du seuil d'inflammation pathologique et de la période d'examen des animaux est nécessaire pour l'interprétation d'un frottis cytologique.

Chez les équidés, le diagnostic d'endométrite repose sur l'identification de plus de cinq neutrophiles pour dix champs microscopiques [69,119]. Chez la vache, les comptages sont effectués plus précisément. Plusieurs seuils d'inflammation utérine ont été proposés dans la littérature. Ils évoluent entre 5% et 25% de polymorphonucléaires selon les études (tableau 21 ; [45,50]). Les résultats de ces essais ne peuvent être directement comparés pour diverses raisons :

- ✓ Le type de production est généralement laitier, cependant une étude a été réalisée sur des vaches allaitantes [73].
- ✓ Les méthodes de prélèvements sont différentes : écouvillonnage utérin [4,88,129] ou lavage utérin [64,131,139]. Ce facteur semble cependant assez peu influencer le résultat de l'examen cytologique [72].

Discussion générale et perspectives

✓ La population cellulaire comptabilisée n'est pas toujours clairement définie. Le terme de PMN désigne dans certains cas les granulocytes neutrophiles [117,118] et dans d'autres, l'association de neutrophiles, macrophages et lymphocytes [4,45,50]. Ce qui a d'ailleurs justifié notre première étape de validation de la population cellulaire à compter.

✓ La population de femelles faisant l'objet du calcul du seuil d'inflammation limite est variable : il peut s'agir de toutes les femelles post-partum [45,139] ou seulement des vaches ne présentant pas de signes d'endométrite clinique (reposant le plus souvent sur l'identification de sécrétions mucopurulentes ou purulentes à l'examen vaginal) [4,204]. Dans le premier cas, il faudrait parler d'endométrite cytologique et dans le second, d'endométrite subclinique.

✓ Dans la majorité des essais, la présence d'une endométrite est associée à une altération des paramètres de reproduction. Cette baisse des performances concerne à la fois la fertilité et la fécondité. Mais les études s'appuient sur des critères zootechniques différents : réussite en première IA [4,45,61,129], intervalle vêlage–insémination première [133] ou intervalle vêlage–insémination fécondante [45,64,133].

✓ Enfin, l'intervalle entre le vêlage et le prélèvement est variable. Plusieurs seuils d'inflammation sont souvent proposés lorsque la période de recrutement des animaux est étendue [4,10,133]. Mais ces seuils n'ont pas toujours été statistiquement validés par un calcul exact de l'altération des performances de reproduction. Ils peuvent correspondre à la généralisation de seuils définis par d'autres auteurs, sans tenir compte du délai post-partum le jour du prélèvement [131,139]. Ils sont même parfois utilisés sans justification particulière des méthodes de calcul [61,64,204].

Face à cette diversité (tableau 21), il donc est impossible de juger de la pertinence des seuils proposés par chacun des essais. La réalisation d'une méta-analyse permettrait d'explorer l'hétérogénéité des résultats et d'aboutir peut-être à la détermination d'un seuil d'inflammation cytologique, pour une ou plusieurs périodes du délai post-partum.

La décroissance progressive du taux de neutrophiles entre le vêlage et la mise à la reproduction (partie III.A. des résultats) soulève en effet la question du moment idéal de réalisation de l'examen cytologique. Senosy *et al.* [88] proposent 35 JPP comme délai optimal d'évaluation de la santé de l'utérus, l'involution utérine étant presque achevée et le %N stabilisé. Notre étude (partie II.A.) a révélé qu'au-delà de 35 JPP, il ne semblait plus judicieux de caractériser le statut inflammatoire génital de l'animal, en raison des phénomènes de réactivation et de guérison spontanée [132]. Le taux de neutrophiles n'était alors plus prédictif des performances de reproduction ultérieures. Griffin *et al.* [15], qui observent des flux dynamiques

de croissance bactérienne au cours du post-partum tardif, proposent une évaluation bactériologique et histologique de la lumière utérine au moment de la mise à la reproduction, plutôt que durant les 50 premiers JPP. Néanmoins, la mise en évidence d'une inflammation lors du post-partum précoce permet une prise en charge rapide des animaux et la mise en œuvre d'une thérapeutique, qui s'avère plus efficace lorsqu'elle est réalisée tôt, sans par ailleurs risquer de repousser le moment de l'insémination. Inversement, un diagnostic tardif des inflammations génitales permet de s'affranchir des réactivations fugaces du %N (*i.e.*, la mise en œuvre d'un traitement inutile), tout en risquant de retarder l'insémination si une thérapeutique est mise en place.

Notre travail propose, pour un examen cytologique effectué entre 21 et 35 JPP, les seuils de 6%N pour l'utérus et de 5%N pour le col (partie II.A.). Aucun seuil d'inflammation endocervicale n'a encore été proposé dans la littérature. Concernant l'inflammation endométriale, notre seuil de 6%N est proche de certains de ceux proposés dans d'autres études avant 35 JPP [4,133,134]. A cette période post-partum, les seuils proposés dans la bibliographie varient de 6,5 à 18% (tableau 21). Les réactivations tardives de l'inflammation génitale observées lors du suivi post-partum du %N (partie III.A.) expliquent peut-être l'absence de seuil au-delà de 35 JPP. Néanmoins, nous avons montré l'existence d'un seuil d'inflammation génitale au moment de l'insémination (partie II.B.). La persistance d'une inflammation endométriale $\geq 1\%N$ ou d'une inflammation endocervicale $\geq 2\%N$, moins de sept jours avant l'insémination artificielle, est délétère pour la réussite de cette insémination. Le seuil d'inflammation génitale tolérable pour la fertilité est donc nettement réduit entre le post-partum précoce et la mise à la reproduction.

Concept d'inflammation cytologique génitale

Lors d'une conférence de consensus en 2007 sur les affections utérines de la vache, Sheldon [3] avait défini l'endométrite comme une inflammation superficielle de l'endomètre, ne dépassant pas le *stratum spongiosum*. Il distinguait les endométrites cliniques, caractérisées par la présence de sécrétions muco-purulentes à purulentes dans la cavité vaginale, des formes subcliniques, pour lesquelles la mise en œuvre d'un examen cytologique était nécessaire à leur diagnostic.

Malgré ce consensus, une confusion persiste dans la littérature entre les termes d'endométrites clinique et subclinique. En effet, les formes subcliniques ne reposent pas toujours sur l'exclusion des mêmes entités cliniques, et ce, en raison de la multitude de techniques

disponibles. La question est de savoir s'il faut tenir compte de la mise en œuvre combinée de toutes les techniques macroscopiques pour exclure les formes cliniques d'endométrite (la prévalence des formes subcliniques devient alors extrêmement faible) ou s'il faut se contenter de l'exclusion des animaux diagnostiqués par examen des sécrétions vaginales (comme proposé par Sheldon [3]). D'autre part, l'utilisation de l'échographie utérine comme procédure diagnostique des formes subcliniques est discutable [4], sachant que l'échographie transrectale peut être considérée, en reproduction bovine, comme un examen clinique de routine, au même titre que la PTR.

Tant que la distinction entre les formes clinique et subclinique d'endométrite reste ambiguë, il est préférable de s'appuyer sur le terme d'endométrite (ou de cervicite) cytologique, dès lors qu'un examen cytologique est mis en œuvre [205]. Nous avons donc choisi d'introduire le concept d'« inflammation cytologique génitale », désignant la présence seule ou combinée des inflammations cytologiques endométriale et endocervicale. La réalisation d'une méta-analyse, si elle aboutissait à la détermination du seuil limite et de la période optimale de réalisation de l'examen cytologique post-partum, faciliterait la comparaison des prévalences et de l'impact de l'affection cytologique selon les pays et les conditions d'élevage.

Impact de l'inflammation cytologique génitale

Notre travail a révélé un impact à court et long terme de l'inflammation génitale (donc endométriale et/ou cervicale) sur les performances de reproduction (partie II.). L'altération des paramètres de reproduction a été caractérisée par un plus grand risque d'échec à l'insémination artificielle et/ou un allongement de l'intervalle vêlage–insémination fécondante.

Une inflammation endométriale supérieure à 6%N dans les 21 à 35 JPP était associée à une diminution du taux de gestation dans les 300 JPP (RRa, 0,4 ; IC95%, 0,2 – 0,7 ; $P < 0,01$; section II.A.). Si elle persistait au-delà de 1%N moins de sept jours avant la mise à la reproduction, elle était associée à une diminution du taux de réussite à l'insémination (section II.B.). Par ailleurs, l'inflammation du col de l'utérus était également associée à court (au seuil de 2%N ; section II.B.) et à long terme (au seuil de 5%N ; section II.A.) à une réduction des paramètres de reproduction.

Notre étude a également révélé que l'inflammation endocervicale seule (*i.e.*, en l'absence d'une inflammation endométriale) était aussi mal supportée qu'une inflammation endométriale seule (*i.e.*, en l'absence d'une inflammation endocervicale ; partie II.A.). De plus, nous montrons que la combinaison des inflammations endocervicale et endométriale avant 35 JPP était plus

délétère pour les paramètres de reproduction, que la présence de chacune d'elles, séparément. Cet effet cumulatif devra donc être pris en compte dans l'estimation des pertes engendrées par les inflammations génitales.

Alors que l'impact d'une inflammation du tractus génital sur les paramètres de reproduction est confirmé, nous ne savons pas à quel niveau biologique l'inflammation cytologique perturbe la fertilité. Si la fécondation est compromise, il faudrait un impact de l'inflammation cervicale et utérine sur les spermatozoïdes, comme cela est décrit dans l'espèce porcine [203], ou que l'inflammation oviductale, qui n'a jamais été mesurée dans la littérature, soit associée à celle de l'utérus ou du col. Nous avons vu (synthèse bibliographique) que l'ovulation était perturbée par le LPS bactérien, il reste à déterminer si la fonction ovarienne est également altérée par une inflammation génitale, en l'absence d'isolement bactérien dans la lumière utérine. On peut aussi aisément imaginer un impact de l'inflammation sur le développement embryonnaire précoce. Au moment de son entrée dans l'utérus quatre à cinq jours après l'ovulation, un environnement inflammé pourrait être directement toxique pour l'embryon ou ne plus fournir les conditions nécessaires (nutriments, pH) à son développement normal [7,143]. Hill et Gilbert [143] ont montré que la culture d'embryons de stade J5 dans du liquide de lavage utérin rendu inflammatoire par inoculation intra-utérine de glycogène avait un effet néfaste sur la qualité des blastocystes (augmentation du ratio masse cellulaire interne sur trophoblaste). Cette réduction du nombre de cellules trophoblastiques risque d'affecter la taille et la fonction du placenta, avec pour conséquence une diminution du taux de gestation précoce. Le modèle utilisé par Hill et Gilbert [143] est celui d'une inflammation utérine aseptique, ce qui confirme bien qu'un environnement inflammé, même dénué de pathogène est néfaste pour le développement embryonnaire. Une augmentation du nombre d'embryons dégénérés ou morts n'était cependant pas observée. Enfin, l'implantation (vers J16 - J20) pourrait être perturbée ou rendue impossible par un environnement utérin inflammé.

Diagnostic de l'inflammation cytologique

L'examen cytologique est donc une technique objective et quantitative d'évaluation de l'inflammation génitale. Néanmoins, son emploi sur le terrain est limité par le cathétérisme cervical, la lecture des frottis et le délai imposé entre la mise en œuvre du prélèvement et l'obtention des résultats). Les praticiens ont recours à d'autres techniques garantissant

Discussion générale et perspectives

l'immédiateté du résultat, telles que la palpation transrectale (71% des vétérinaires sondés ; partie IV.B.1., le recueil manuel du mucus vaginal (76%) et l'échographie utérine (47%). Les valeurs diagnostiques de ces procédures ont par conséquent été évaluées (partie IV.A.1.) en utilisant l'examen cytologique comme méthode de référence.

Les critères issus de la palpation transrectale (mesure du diamètre du col ou des cornes, consistance des cornes) manquaient considérablement de sensibilité dans le diagnostic des inflammations endométriale ou endocervicale. Au mieux (évaluation de la consistance des cornes), les critères identifiaient près de la moitié des animaux atteints d'une inflammation pathologique. L'utilisation de l'échographie transrectale générait un grand nombre d'animaux faux-positifs : plus d'un animal sur deux était considéré à tort affecté par une endométrite ou une cervicite. La combinaison des critères de palpation ou d'échographie transrectales n'améliorait pas le diagnostic d'inflammation cytologique. Au final, l'examen macroscopique des sécrétions vaginales offrait les meilleures valeurs diagnostiques, en combinant une forte valeur prédictive positive et des sensibilité et valeur prédictive négative acceptables (Se = 56%; Sp = 88%; VPP = 85%; VPN = 63%). Cet examen constituait le meilleur reflet du statut inflammatoire, tant endométrial, qu'endocervical, évalué par examen cytologique.

La mise en œuvre de la palpation préalable du tractus génital par voie transrectale n'améliorait pas non plus le diagnostic des inflammations génitales, la PTR ne modifiant significativement ni la quantité, ni l'aspect des sécrétions vaginales (partie IV.A.2.). Il est donc désormais nécessaire de s'interroger sur la nécessité du contrôle d'involution utérine. Cette pratique avait historiquement pour but de vérifier le retour de l'utérus à une taille et une position anatomique caractéristiques des utérus pré-gravidiques [11]. En pratique, les vétérinaires recherchaient un retard d'involution utérine vers 30 JPP, par palpation transrectale (taille et consistance de l'utérus), échographie utérine (lumière anéchogène) et/ou examen vaginal (présence de pus). En d'autres termes, le contrôle d'involution utérine constituait un diagnostic d'endométrite par des techniques qui se sont finalement révélées inexactes (partie IV.A.). L'examen des sécrétions vaginales étant désormais la seule technique à retenir, la notion de « contrôle d'involution utérine » n'est donc plus nécessairement adaptée au diagnostic d'inflammation génitale et pourrait être remplacée par le terme d' « évaluation de la santé génitale ».

Bien que l'examen du contenu vaginal possède de bonnes valeurs diagnostiques, son manque de sensibilité (Se = 56%) est expliqué en partie par la présence de formes subcliniques d'inflammation, qui nécessitent la réalisation d'un examen cytologique pour les diagnostiquer. Si

Figure 48 : Proposition de conduite à tenir face aux inflammations génitales post-partum, à destination des vétérinaires français.

Conduite à tenir 

Les inflammations génitales post-partum

Les perturbations de la cyclicité et les troubles de la fertilité peuvent être dus aux inflammation génitales post-partum.


Inflammations génitales post-partum = Inflammation utérine [Endométrite] et/ou Inflammation cervicale [Cervicite]

① **Quand diagnostiquer ?**

- ✓ Vers 30 jours post-partum (JPP)
 - ✓ Vers 50 - 60 JPP, peu avant l'insémination
- et
- ✓ Lors d'œstrus
 - ✓ Lors d'échecs répétés à l'insémination


② **Comment diagnostiquer ?**

Nettoyage de la vulve



→

Examen au gant



ou

Examen au vaginoscope




Mucus translucide




Mucus trouble



Pus blanc < 50%



Pus blanc ≥ 50%



③ **Qui traiter ?**

←

Ne pas traiter

→

Traiter (AB intra-utérins : céfapirine)



Plus de 40% des animaux déclarés sains (absence d'écoulement purulent), sont en réalité atteints d'une forme subclinique d'inflammation génitale, également à l'origine d'une altération des performances de reproduction.

on considère les formes subcliniques définies par les animaux diagnostiqués positifs à l'examen cytologique génital en l'absence de sécrétions muco-purulentes à purulentes dans la cavité vaginale, la proportion de cas subcliniques (donc non diagnostiqués par cette technique macroscopique) était dans notre population de 44%. Près d'un animal sur deux considéré sain au vu de l'examen vaginal était en réalité atteint d'une inflammation cytologique du col et/ou de l'utérus.

Face aux effets délétères à court et long terme de l'inflammation cytologique génitale sur les performances de reproduction et de l'extrême sous-diagnostic des formes subcliniques, l'examen du contenu vaginal réalisé entre 21 et 35 JPP peut être renouvelé au moment de la mise à la reproduction des animaux. Les valeurs diagnostiques des techniques macroscopiques calculées ici entre 21 et 35 JPP (partie IV.A.1.) nécessiteraient cependant d'être réévaluées vers 50 à 60 JPP. L'inflammation pathologique correspondant à un très faible taux de neutrophiles au moment de l'insémination (1 à 2%N), il n'est pas assuré qu'il existe une expression clinique caractéristique de l'inflammation génitale à ce délai post-partum.

En évaluant l'expression clinique de l'inflammation cytologique génitale (partie IV.A.), cette étude avait comme but d'améliorer les pratiques diagnostiques des éleveurs et des vétérinaires. En résumé, il faut insister sur l'impact des cervicites, affection trop souvent négligée par la littérature et la médecine vétérinaire. Les inflammations du corps et du col utérin peuvent être mises en évidence par une même technique diagnostique : l'appréciation macroscopique des sécrétions contenues dans la cavité vaginale. Nous avons montré (partie IV.A.3.) que les sécrétions translucides associées à de rares flocons de pus blanc n'étaient pas délétères pour les performances de reproduction. Le diagnostic d'inflammation génitale doit donc reposer sur l'identification de sécrétions vaginales muco-purulentes à purulentes entre 21 et 35 JPP. Il n'est pas non plus nécessaire de faire précéder l'examen du contenu vaginal d'une palpation transrectale du tractus génital (partie IV.A.2.). Par contre, l'examen peut être renouvelé au moment de la mise à la reproduction des animaux. Enfin, il semble indispensable de préciser que la mise en œuvre de l'examen du contenu vaginal ne permet pas la détection de la totalité des animaux affectés, mais uniquement des cas cliniques d'inflammation génitale. Une proposition de conduite à tenir face aux inflammations génitales à l'intention des vétérinaires praticiens est présentée en figure 48.

Conséquence du sous-diagnostic sur la stratégie thérapeutique

L'objectif du diagnostic des inflammations génitales est leur traitement, dans le but final d'améliorer les performances de reproduction et la rentabilité économique pour l'éleveur. La notion d'endométrite subclinique et la découverte de l'impact de la cervicite conduisent à réévaluer les procédures initialement développées pour le traitement des endométrites cliniques.

L'efficacité d'une thérapeutique hormonale à base de $\text{PGF}_{2\alpha}$ dans le traitement des endométrites est très discutée à l'heure actuelle [2,206]. Les effets recherchés sont principalement lutéolytique et utérotonique. L'objectif est d'annuler l'effet immunosuppresseur de la progestérone [2] et de favoriser l'expulsion du contenu utérin suite à la lutéolyse et l'ovulation. Les $\text{PGF}_{2\alpha}$ possèdent également un rôle propre dans la modulation de la réponse immunitaire, en coordonnant les voies pro- et anti-inflammatoires. Cependant, seule une étude rapporte une amélioration des paramètres de reproduction suite au traitement des endométrites cliniques par une injection de prostaglandines [207]. Concernant les formes subcliniques d'inflammation (examen cytologique), si l'effet est bénéfique sur le taux de gestation ($\text{RR} = 1,70$; $P = 0,05$) dans l'étude de Kasimanickam *et al.* [208], Galvao *et al.* [133] n'observent pas d'amélioration des paramètres de reproduction ni de diminution de la prévalence de l'inflammation suite au traitement. L'intérêt des prostaglandines dans cette indication n'est donc pas encore clairement établi.

L'administration d'antibiotiques par voie intra-utérine est très répandue pour le traitement des endométrites cliniques (partie IV.B.). Plusieurs études montrent l'intérêt d'une administration intra-utérine (IU) d'antibiotiques dans la guérison clinique de l'affection, ainsi que dans l'amélioration de certains paramètres de reproduction [179,209]. Deux études ont aussi récemment testé l'efficacité d'un traitement antibiotique local à base de céfapirine (500 mg par voie IU ; Métricure® ; Intervet) dans le traitement des formes subcliniques d'endométrite [208,210]. Dans l'une d'elles [210], les vaches étaient recrutées sur la base d'une absence de signe clinique d'endométrite (cornes utérines de taille similaire en PTR et absence d'écoulement vaginal mucopurulent) : les vaches étaient donc soit atteintes d'inflammation cytologique, soit réellement saines. Dans l'étude de Kasimanickam *et al.* [208], les cas subcliniques reposaient sur un diagnostic cytologique ($> 18\%N$) ou échographique (liquide dans l'utérus), additionné à un examen vaginoscopique négatif (absence de sécrétions anormales). Globalement dans ces deux études, les chances de gestation des femelles traitées étaient significativement accrues par rapport

Discussion générale et perspectives

à celles des vaches non traitées, même si la guérison cytologique de l'endomètre n'était pas évaluée.

Les traitements existants n'ont toujours été testés que dans l'indication de combattre les endométrites de la vache. La question est maintenant de savoir s'ils sont également efficaces contre les cervicites post-partum. Le mode d'administration des antibiotiques étant intra-utérin, il n'est pas assuré que les traitements indiqués pour l'endométrite soient, sous une forme galénique comparable, efficaces contre les inflammations du col de l'utérus, d'autant plus que la composition de la flore bactérienne est souvent distincte entre ces deux parties du tractus génital [125]. Pour répondre à cette question, nous avons réalisé un essai (analyse en cours), dont l'objectif était de savoir si le traitement intra-utérin à base de céfapirine était efficace contre les cervicites cytologiques de la vache.

Face à l'extrême sous-diagnostic des inflammations génitales (44% d'animaux faux-négatifs ; partie IV.A.1.) par les vétérinaires praticiens, le traitement systématique de toutes les vaches vers 30 JPP pourrait être proposé, à la manière du traitement systématique des mammites subcliniques au moment du tarissement [211]. Les stratégies prophylactiques à base de PGF₂ α se sont révélées inefficaces dans la prévention des inflammations utérines ou l'amélioration des paramètres de reproduction [212,213]. Cependant, l'utilisation systématique de céfapirine (500 mg par voie IU) 28 à 37 jours avant la mise à la reproduction de l'animal améliorait significativement le taux de réussite à l'insémination première, ainsi que le taux de gestation [179].

Cependant, le traitement systématique de toutes les vaches post-partum n'est pas compatible avec la volonté actuelle de limitation des antibiotiques et d'usage raisonné des traitements, comme le témoigne la thématique des dernières Journées Nationales des Groupements Techniques Vétérinaires en France, « Antibiothérapie : Santé animale et santé publique ». Les céphalosporines, utilisées pour le traitement des endométrites bovines, posent tout particulièrement une question de santé publique, puisqu'elles sont utilisées en médecine humaine et vétérinaire. Leur large utilisation en pratique vétérinaire est critiquée face à l'induction potentielle de résistances en médecine humaine.

Sachant qu'une inflammation génitale est délétère pour les performances de reproduction ultérieures [4,45], la question est de savoir si les antibiotiques agissent uniquement sur la contamination bactérienne par leur rôle bactériostatique ou bactéricide, ou s'ils sont également efficaces sur la réduction de l'inflammation *in situ*. Un essai clinique (en cours d'analyse) a été mis

en place afin de tester l'efficacité d'une administration intra-utérine de céfapirine sur le statut inflammatoire endocervical et endométrial.

D'autre part, l'examen bactériologique reposant principalement sur les techniques de culture *in vitro*, l'état actuel des connaissances ne permet pas d'affirmer que l'inflammation cytologique s'accompagne systématiquement d'une colonisation bactérienne de la lumière utérine. S'il s'avère qu'une inflammation de l'endomètre peut persister dans une cavité utérine stérile, la lutte contre l'infection devient inutile et il est alors nécessaire de s'orienter vers le contrôle de la réponse immunitaire génitale. Par comparaison au traitement des maladies auto-immunes humaines, des essais pourraient être conduits avec des molécules anti-inflammatoires ou immunosuppressives. Le défi serait de trouver des traitements capables de limiter l'infiltration de neutrophiles dans le tractus génital sans interférer avec la réponse inflammatoire innée générale.

A l'opposé de la stratégie précédente, une autre approche consisterait à promouvoir la réponse inflammatoire de l'animal, dans l'hypothèse d'une défaillance initiale du système immunitaire à l'origine de la persistance d'une inflammation post-partum. Très tôt, Hussain [31] a proposé l'utilisation de substances chimio-attractantes telles que le LPS d'*E. coli* ou un filtrat de *Streptococci* pour promouvoir la réponse inflammatoire de l'animal (afflux de neutrophiles). Suite aux travaux avant-gardistes de Hussain [31], l'équipe de Singh *et al.* [214] ont injecté du LPS d'*E. coli* dans l'utérus de vaches repeat breeders atteintes d'endométrite clinique. Les quantités totales de leucocytes endométriaux étaient significativement supérieures après l'administration du LPS en comparaison au lot témoin. Cependant les petits effectifs ne permettaient pas d'observer des variations significatives du taux de gestation. D'autre part, par comparaison au traitement non-antibiotique de la mammite, Drillich *et al.* [215] ont testé l'effet d'enzymes protéolytiques (chymotrypsine, trypsine, papaïne) aux propriétés fibrinolytiques et protéolytiques, supposés renforcer les mécanismes de défense cellulaire. Cependant, le taux de gestation suite au traitement des vaches atteintes d'endométrite clinique par des prostaglandines était meilleur que lors de l'injection IU de ces enzymes. Enfin, *A. pyogenes* et *E. coli* étant les deux contaminants les plus souvent isolés de l'utérus bovins post-partum, deux équipes suggèrent comme perspective de développement de stratégies vaccinales [17,196].

Les pratiques actuelles de gestion de l'élevage imposent des mesures peu coûteuses, faciles de mise en œuvre, propres, écologiques et éthiques [216]. L'utilisation de molécules chimiques et hormonales doit être limitée afin d'améliorer l'image de l'industrie du lait et de la viande auprès du grand public. La lutte contre les inflammations génitales de la vache, au sens large (*i.e.*, métrite, endométrite, cervicite) doit probablement être multidirectionnelle. Au-delà de l'approche

Discussion générale et perspectives

pharmaceutique, des mesures préventives de gestion du troupeau restent à promouvoir, comme la maîtrise de l'équilibre énergétique pendant la période de transition péri-partum [49]. Bénéfique pour l'immunité, elle diminue l'incidence de l'endométrite, mais aussi de nombreux autres troubles post-partum et la morbidité globale du troupeau.

L'endométrite peut alors être considérée comme un signe d'appel d'erreurs de la conduite d'élevage d'impact plus global. Et la lutte contre cette affection s'inscrit dans un cadre général de gestion du troupeau, devant conduire le vétérinaire à interagir avec d'autres partenaires de l'élevage, en particulier dans la gestion de l'alimentation.

CONCLUSIONS

Conclusions

Ces travaux de thèse ont permis d'approfondir la description de l'inflammation endométriale post-partum de la vache laitière, en précisant son impact et ses facteurs de variation. Ils ont également contribué au développement des connaissances sur l'inflammation cervicale bovine et ses relations avec le compartiment utérin voisin. Cette thèse a été réalisée en forte interaction avec les milieux professionnels : elle a été conduite au sein de l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, par ailleurs les essais *in vivo* ont été pratiqués, en intégralité, dans des élevages bovins commerciaux (non expérimentaux) et les enquêtes ont fait participer les vétérinaires praticiens et les éleveurs laitiers français. Plutôt qu'une interrogation fondamentale, le travail était résolument axé vers une meilleure connaissance de l'inflammation génitale, dans le but de faire progresser les pratiques sur le terrain (imprécision des modalités diagnostiques usuelles ; validation des stratégies thérapeutiques [en cours d'analyse]). C'est pourquoi, les résultats de nos différents essais avaient une vocation de formation continue et ont été, dans cette optique, publiés dans des revues de vulgarisation à thématique vétérinaire et agricole.

Ce travail illustre aussi la mutation à laquelle est actuellement confrontée la profession vétérinaire en France. Il ne s'agit plus forcément d'être capable de donner une réponse immédiate au chevet de l'animal. Pour une évaluation précise de sa santé génitale, le vétérinaire devrait réaliser un prélèvement techniquement assez difficile (cathétérisme du col), prendre le temps d'effectuer son analyse au laboratoire (coloration, comptage), puis seulement ensuite, revenir en élevage, traiter les animaux précisément identifiés. Or à l'heure actuelle, il n'est pas certain que nos confrères y soient prêts.

Sur le plan personnel, ce travail m'a tout d'abord permis d'acquérir des compétences techniques, complémentaires de celles de ma formation vétérinaire initiale (cathétérisme cervical, examen échographique de la fonction ovarienne), mais également plus axées sur des techniques de laboratoire (examen cytologique, dosages biochimiques et endocriniens, ébauche d'une analyse métagénomique descriptive).

Les différents protocoles expérimentaux m'ont aussi amenée à constituer un réseau de compétences. J'ai pu développer des collaborations avec des scientifiques d'horizons variées : l'apprentissage de l'examen microscopique génital a nécessité les savoir-faire d'une cytologiste (Anne Geffré, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse) ; l'analyse des données et la maîtrise des logiciels, ceux d'un biostatisticien (Loïc Desquilbet, de l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort). Dans le cadre de la formation continue et de la réalisation d'enquêtes, j'ai aussi été au contact de professionnels du journalisme vétérinaire (Bulletin des Groupements Techniques Vétérinaires,

Conclusions

Point Vétérinaire, Repro Mag) et agricole (Production Laitière Moderne, pour l'enquête destinée aux éleveurs).

Au-delà d'acquis strictement scientifiques, j'ai aussi développé des capacités en termes de gestion de projet, grâce, notamment, au suivi d'une formation doctorale au sein de l'Ecole ABIES. La réalisation d'un sujet de recherche favorise la conception de protocoles expérimentaux, mais aussi la mise en place d'une méthodologie, pour organiser son propre travail et celui d'autres intervenants. En effet, ma fonction d'enseignant m'a donné l'opportunité de participer à l'encadrement de huit thèses de Doctorat Vétérinaire et d'un Mémoire de fin d'Etudes Agronomiques. J'ai ainsi contribué à la construction d'un protocole d'expérimentation, la planification du travail des étudiants à court et moyen terme et au suivi de la réalisation du projet. D'autre part, j'ai été amenée à mener à bien mes expériences, en milieu professionnel, au contact des éleveurs, vétérinaires, inséminateurs et techniciens.

Cette période de thèse m'a permis d'acquérir des compétences finalement très variées, car j'ai eu la chance de m'investir dans la conception de protocoles, ainsi que leur mise en œuvre concrète sur les animaux, en collaboration avec les éleveurs et les étudiants. J'ai aussi réalisé les différentes analyses statistiques, procédé aux synthèses bibliographiques et rédigé les différentes publications. La réalisation d'un doctorat constitue donc indubitablement une formation *à et par* la recherche.

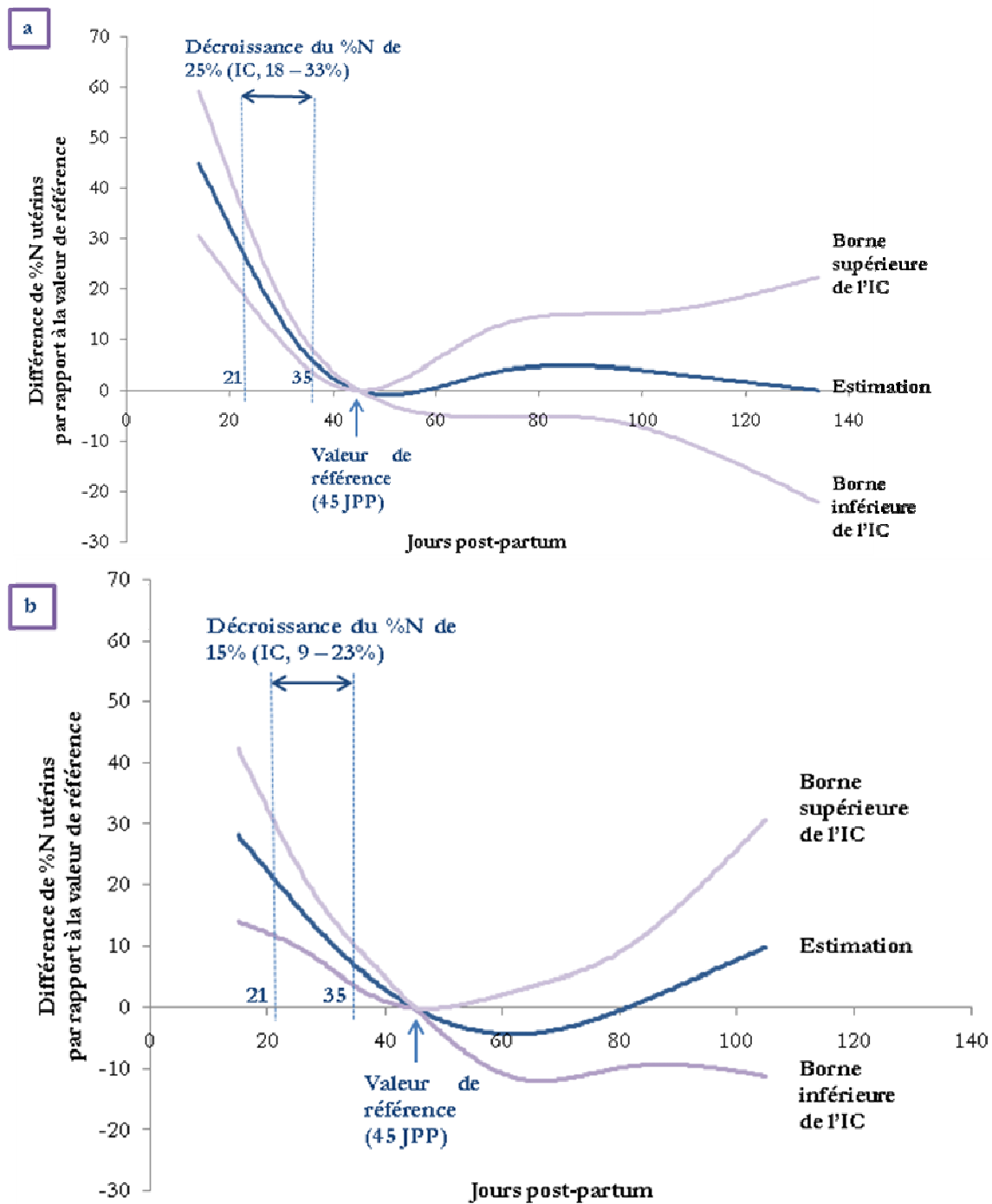
ANNEXES

Annexe 1 : Modélisation de l'évolution du taux de neutrophiles endométriaux en fonction du délai post-partum.

- Chez des vaches sans reprise de la cyclicité ovarienne avant 35 jours post-partum (n = 14)
- Chez des vaches avec reprise de la cyclicité ovarienne avant 35 jours post-partum (n = 26)

%N : taux de neutrophiles ; IC : intervalle de confiance ; JPP : jours post-partum

La ligne horizontale (axe des abscisses) correspond à une différence nulle du %N par rapport à la valeur de référence du %N mesurée pour un délai de 45 JPP.

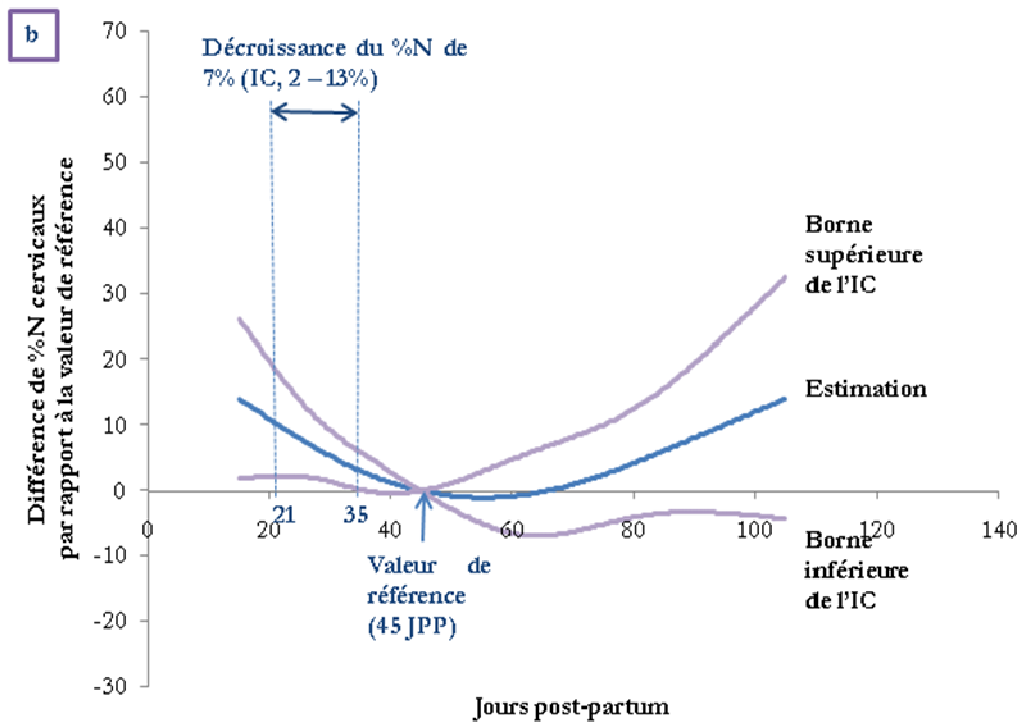
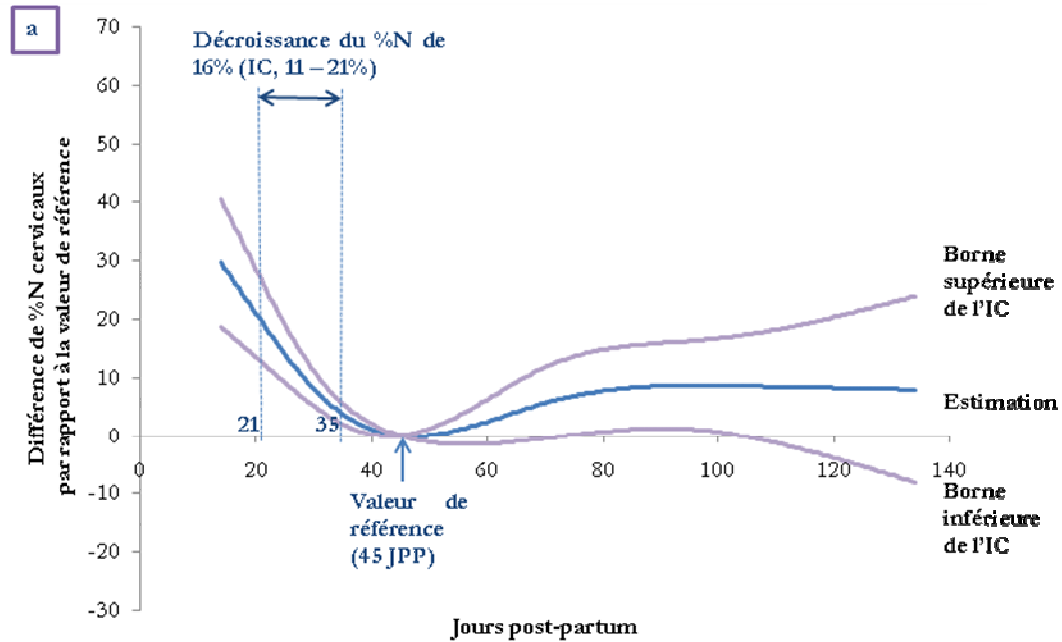


Annexe 2 : Modélisation de l'évolution du taux de neutrophiles endocervicaux en fonction du délai post-partum.

- Chez des vaches sans reprise de la cyclicité ovarienne avant 35 jours post-partum (n = 14)
- Chez des vaches avec reprise de la cyclicité ovarienne avant 35 jours post-partum (n = 26)

%N : taux de neutrophiles ; IC : intervalle de confiance ; JPP : jours post-partum

La ligne horizontale (axe des abscisses) correspond à une différence nulle du %N par rapport à la valeur de référence du %N mesurée pour un délai de 45 JPP.



Enquête sur les endométrites

Les questions marquées * sont obligatoires

QUELLES TECHNIQUES UTILISEZ-VOUS POUR DETECTER LES ENDOMETRITES?

1 * Inspection de la région périnéale

Systématiquement

1

Parfois

2

Jamais

3

2 * Palpation transrectale de l'utérus

Systématiquement

1

Parfois

2

Jamais

3

3 Echographie transrectale de l'utérus

Systématiquement

1

Parfois

2

Jamais

3

4 * Recueil des sécrétions vaginales avec un gant

Systématiquement

1

Parfois

2

Jamais

3

5 * Recueil des sécrétions vaginales à l'aide d'un METRICHEKTM

Systématiquement

1

Parfois

2

Jamais

3

6 * Observation du contenu vaginal à l'aide d'un vaginoscope ou d'un spéculum

Systématiquement

1

Parfois

2

Jamais

3

SI VOUS EXAMINEZ LE CONTENU VAGINAL



Photo 1 : Mucus translucide

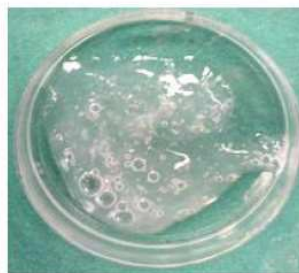


Photo 2 : Mucus vaginal légèrement trouble
ou avec quelques flocons de pus



Photo 3 : mucus + pus < 50%



Photo 4 : pus > 50%

7

Quel(s) aspect(s) jugez vous pathologique(s) ?
(Plusieurs réponses possibles)

-
-
-
-

Photo n° 1

Photo n° 2

Photo n° 3

Photo n° 4

8

Si vous observez des sécrétions que vous jugez pathologiques, choisissez-vous votre type de traitement en fonction de la proportion de pus ?

YES NO

**SI VOUS UTILISEZ LA PALPATION TRANSRECTALE, VOS
CRITERES DIAGNOSTIQUES SONT:**

9

Diamètre du col à sa base

10

Diamètre des cornes à leur base

11

Consistance des cornes utérines

12

Mise en évidence d'une lumière utérine

SI VOUS UTILISEZ L'ECHOGRAPHIE

Photo 1 :
Lignes anéchogènes

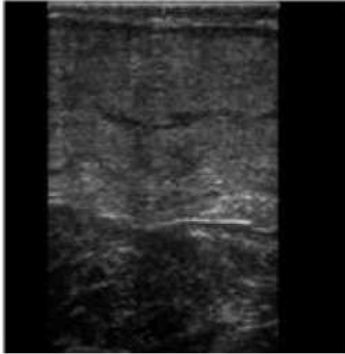


Photo 2 :
Cocardes

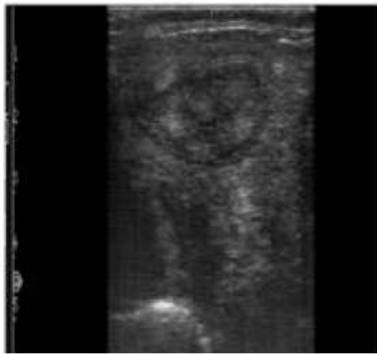
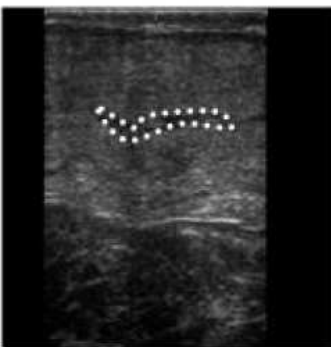


Photo 3 :
Accumulation de
liquide



13

Quelles images considérez-vous comme pathologiques ? (Plusieurs réponses possibles)

- Photo n° 1
- Photo n° 2
- Photo n° 3

14

Dans quel ordre réalisez-vous les examens ?

15 **Dans quelles situations effectuez-vous un diagnostic**

d'endométrite ? (Plusieurs réponses possibles)

- Post partum, vers 30 jours après le vêlage
- A la mise à la reproduction, vers 60-90 jours post-partum
- Lors d'échecs répétés à l'IA
- Lors d'anoestrus

16 **Lorsque vous détectez une vache atteinte d'endométrite entre 21 et 60 jours post partum, quel traitement utilisez-vous le plus souvent ? (2 réponses maxi.)**

- Antibiothérapie par voie générale
- AINS par voie générale
- Injection de prostaglandines F2 α
- Antibiothérapie par voie intra-utérine
- Solution antiseptique par voie intra-utérine
- Traitement homéopathique
- Aucun traitement

17 **Si vous observez des sécrétions vaginales ne comportant que des flocons de pus, traitez-vous ?**

YES NO

18 **Le choix du traitement dépend-il de la présence ou non d'un corps jaune ?**

YES

NO

19 **Vous et votre cabinet / clinique :**

Département

Nombre
d'élevages de la
clientèle

Nombre total de
bovins de la clientèle

Merci d'avoir répondu à ce questionnaire!

Les résultats seront publiés dans *Le Point Vétérinaire* prochainement.

Endométrite (1)

Created: April 27 2009, 12:29 AM
Last Modified: April 27 2009, 12:29 AM
Design Theme: Basic Blue
Language: French
Button Options: Labels
Disable Browser "Back" Button: False

Enquête sur les infections utérines des vaches laitières

Page 1 - Image

Voici différents types de sécrétions vaginales à 30 jours post-partum :



Photo 1 : mucus vaginal transparent



Photo 2 : mucus vaginal transparent + rares flocons de pus



Photo 3 : mucus + pus < 50%



Photo 4 : pus

Page 1 - Question 1 - Choice - Multiple Answers (Bullets)

Sur ces images, quelle(s) est/sont les sécrétions qui vous paraissent anormales ?

- Photo 1
- Photo 2
- Photo 3
- Photo 4

Page 1 - Question 2 - Choice - One Answer (Bullets)

Selon vous, à partir de quand un traitement doit-il être réalisé sur l'animal ?

- Photo 1
- Photo 2
- Photo 3
- Photo 4

Page 1 - Question 3 - Yes or No

Vous arrive-t-il de rechercher vous-même une infection utérine ?

- Yes
- No

Page 1 - Question 4 - Choice - One Answer (Bullets)

Si oui, de quelle manière procédez-vous ?

- Par palpation transrectale
 - Par examen vaginal avec gant de fouille
 - Ne se prononce pas
 - Autres :
-

Page 1 - Question 5 - Choice - One Answer (Bullets)

Si oui, le réalisez-vous ?

- Systématiquement sur toutes vos vaches
- Systématiquement sur les vaches à risque (vêlage difficile, rétention placentaire...)
- Occasionnellement en cas de suspicion
- Ne se prononce pas

Page 1 - Question 6 - Choice - One Answer (Bullets)

En cas de suspicion d'infection de l'utérus :

- Vous traitez vous-même l'animal
 - Vous appelez le vétérinaire
 - Autres :
-

Page 1 - Question 7 - Choice - Multiple Answers (Bullets)

Si vous traitez vous-même, quel type de produit utilisez-vous ?

- Prostaglandines (PGF2 α)
- Antiseptique local (par exemple : Vétédine®, Lotagen®, Hibitan®...)
- Antibiotiques locaux : Metricure®, Metrijet®, Metrijectyl®
- Antibiotiques par voie générale
- Ne se prononce pas

Page 2 - Question 8 - Choice - One Answer (Bullets)

Intervenez-vous physiquement lors des vêlages ?

- Fréquemment (>50%)
- Parfois (>10%)
- Jamais (ou dans moins de 10% des vêlages)

Page 2 - Question 9 - Yes or No

Programmez-vous une recherche systématique des infections utérines avec votre vétérinaire ?

- Yes
- No

Page 2 - Question 10 - Choice - One Answer (Bullets)

Si oui, le faites-vous sur toutes les vaches ou seulement sur les vaches à risque (vêlage difficile, rétention placentaire...)?

- Toutes les vaches
- Vaches à risque
- Ne se prononce pas

Page 2 - Question 11 - Choice - One Answer (Bullets)

Si oui, à quel moment le faites-vous faire ?

- Vers 20 jours post-partum
- Vers 30 jours post-partum
- Au-delà de 40 jours post-partum
- Ne se prononce pas

Page 2 - Question 12 - Yes or No

Savez-vous combien de vaches ont été atteintes d'infections de l'utérus sur la campagne 2008-2009 dans votre exploitation ?

- Yes
 - No
 - Si oui, combien ?
-

Page 2 - Question 13 - Yes or No

Considérez-vous que les infections de l'utérus aient un impact économique important sur votre élevage ?

- Yes
- No

Page 2 - Question 14 - Choice - Multiple Answers (Bullets)

Quelles sont, d'après vous, les 3 principales conséquences d'une infection utérine diagnostiquée vers 30 jours post-partum ? (cocher les 3 réponses)

- Diminution de la production laitière
 - Modification de la qualité du lait (diminution du taux protéique...)
 - Modification de l'état général de la vache (amaigrissement...)
 - Retour en chaleur plus tardif après le vêlage
 - Perturbation de la cyclicité : cycles ovariens plus longs ou plus courts
 - Modifications dans l'expression des chaleurs (chaleurs silencieuses...)
 - Augmentation du nombre d'IA par vache
 - Ne se prononce pas
 - Autres (déplacement de caillette...) :
-

Page 2 - Question 15 - Choice - One Answer (Bullets)

A votre avis, à partir de quelle fréquence d'infections de l'utérus faut-il modifier les pratiques d'élevage (revoir les mesures d'hygiène...) ?

- <10%
- Entre 10 et 30%
- >30%
- Ne se prononce pas

Page 2 - Question 16 - Open Ended - One or More Lines with Prompt

Informations générales sur votre exploitation :

- Département
- Nombre moyen de vaches à la traite
- Race
- Production laitière moyenne annuelle

Thank You Page

Merci de votre participation !!

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

- [1] Sheldon IM, Cronin J, Goetze L, Donofrio G, Schuberth HJ. (2009) Defining postpartum uterine disease and the mechanisms of infection and immunity in the female reproductive tract in cattle. *Biol. Reprod.*, **81**, 1025-1032.
- [2] Sheldon IM, Lewis GS, LeBlanc S, Gilbert RO. (2006) Defining postpartum uterine disease in cattle. *Theriogenology*, **65**, 1516-1530.
- [3] Sheldon IM. (2007) The definition of metritis. In : *21 recommandations against metritis*, Pfizer editor, Paris : France, 9-16.
- [4] Kasimanickam R, Duffield TF, Foster RA, Gartley CJ, Leslie KE, Walton JS, Johnson WH. (2004) Endometrial cytology and ultrasonography for the detection of subclinical endometritis in postpartum dairy cows. *Theriogenology*, **62**, 9-23.
- [5] Földi J, Kulcsár M, Pécsi A, Huyghe B, de Sa C, Lohuis JA, Cox P, Huszenicza G. (2006) Bacterial complications of postpartum uterine involution in cattle. *Anim Reprod. Sci.*, **96**, 265-281.
- [6] Paisley LG, Mickelsen WD, Anderson PB. (1986) Mechanisms and therapy for retained fetal membranes and uterine infections of cows: A review. *Theriogenology*, **25**, 353-381.
- [7] Mascarhenas R. Les endométrites non spécifiques de la vache. (1987) *Thèse de l'Université de Clermont 2*, n°57, 236p.
- [8] Williams EJ, Herath S, England GCW, Dobson H, Bryant CE, Sheldon IM. (2008) Effect of *Escherichia coli* infection of the bovine uterus from the whole animal to the cell. *Animal*, **2**, 1153-1157.
- [9] Pavaux C. (1981) Eléments d'anatomie. In : Constantin A, Meissonnier E, editors. *L'utérus de la vache*. Toulouse : Société Française de Buiatrie, 9-53.
- [10] Chapwanya A, Meade KG, Doherty ML, Callanan JJ, Mee JF, O'Farrelly C. (2009) Histopathological and molecular evaluation of Holstein-Friesian cows postpartum: Toward an improved understanding of uterine innate immunity. *Theriogenology*, **71**, 1396-1407.
- [11] Coche B, Le Coustumier J, Zundel E. (1987) L'involution utérine. *Bull. GTV*, **87-2-B-304**, 43-67.
- [12] Azawi OI. (2008) Postpartum uterine infection in cattle: A review. *Anim Reprod. Sci.*, **105**, 187-208.
- [13] Hussain AM, Daniel RC, O'Boyle D. (1990) Postpartum uterine flora following normal and abnormal puerperium in cows. *Theriogenology*, **34**, 291-302.
- [14] Elliott L, McMahon KJ, Gier HT, Marion GB. (1968) Uterus of the cow after parturition: bacterial content. *Am. J. Vet. Res.*, **29**, 77-81.
- [15] Griffin JF, Hartigan PJ, Nunn WR. (1974) Non-specific uterine infection and bovine fertility. I. Infection patterns and endometritis during the first seven weeks postpartum. *Theriogenology*, **1**, 91-106.

Références bibliographiques

- [16] Noakes DE, Till D, Smith GR. (1989) Bovine uterine flora post partum: a comparison of swabbing and biopsy. *Vet. Rec.*, **124**, 563-564.
- [17] Sheldon IM, Rycroft AN, Dogan B, Craven M, Bromfield JJ, Chandler A, Roberts MH, Price SB, Gilbert RO, Simpson KW. (2010) Specific strains of *Escherichia coli* are pathogenic for the endometrium of cattle and cause pelvic inflammatory disease in cattle and mice. *PLoS. One.*, **5**, e9192.
- [18] Sheldon IM, Price SB, Cronin J, Gilbert RO, Gadsby JE. (2009) Mechanisms of infertility associated with clinical and subclinical endometritis in high producing dairy cattle. *Reprod. Domest. Anim.*, **44**, 1-9.
- [19] Wira CR, Grant-Tschudy KS, Crane-Godreau MA. (2005) Epithelial cells in the female reproductive tract: a central role as sentinels of immune protection. *Am. J. Reprod. Immunol.*, **53**, 65-76.
- [20] Herath S, Fischer DP, Werling D, Williams EJ, Lilly ST, Dobson H, Bryant CE, Sheldon IM. (2006) Expression and function of Toll-like receptor 4 in the endometrial cells of the uterus. *Endocrinology*, **147**, 562-570.
- [21] Davies D, Meade KG, Herath S, Eckersall PD, Gonzalez D, White JO, Conlan RS, O'Farrelly C, Sheldon IM. (2008) Toll-like receptor and antimicrobial peptide expression in the bovine endometrium. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, **18**, 6-53.
- [22] Herath S, Lilly ST, Santos NR, Gilbert RO, Goetze L, Bryant CE, White JO, Cronin J, Sheldon IM. (2009) Expression of genes associated with immunity in the endometrium of cattle with disparate postpartum uterine disease and fertility. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, **29**, 7-55.
- [23] Singh J, Murray RD, Mshelia G, Woldehiwet Z. (2008) The immune status of the bovine uterus during the peripartum period. *Vet. J.*, **175**, 301-309.
- [24] Frank T, Anderson KL, Smith AR, Whitmore HL, Gustafsson BK. (1983) Phagocytosis in the uterus: A review. *Theriogenology*, **20**, 103-110.
- [25] Ishikawa Y, Nakada K, Hagiwara K, Kirisawa R, Iwai H, Moriyoshi M, Sawamukai Y. (2004) Changes in interleukin-6 concentration in peripheral blood of pre- and postpartum dairy cattle and its relationship to postpartum reproductive diseases. *J. Vet. Med. Sci.*, **66**, 1403-1408.
- [26] Ramadan AA, Johnson GL, III, Lewis GS. (1997) Regulation of uterine immune function during the estrous cycle and in response to infectious bacteria in sheep. *J. Anim. Sci.*, **75**, 1621-1632.
- [27] Herath S, Lilly ST, Fischer DP, Williams EJ, Dobson H, Bryant CE, Sheldon IM. (2009) Bacterial lipopolysaccharide induces an endocrine switch from prostaglandin F₂ α to prostaglandin E₂ in bovine endometrium. *Endocrinology*, **150**, 1912-1920.
- [28] Sugimoto Y, Narumiya S. (2007) Prostaglandin E receptors. *J. Biol. Chem.*, **282**, 11613-11617.

Références bibliographiques

- [29] Couper KN, Blount DG, Riley EM. (2008) IL-10: the master regulator of immunity to infection. *J. Immunol.*, **180**, 5771-5777.
- [30] Kim IH, Na KJ, Yang MP. (2005) Immune responses during the peripartum period in dairy cows with postpartum endometritis. *J. Reprod. Dev.*, **51**, 757-764.
- [31] Hussain AM. (1989) Bovine uterine defense mechanisms: a review. *J. Vet. Med. B.*, **36**, 641-651.
- [32] Cai TQ, Weston PG, Lund LA, Brodie B, McKenna DJ, Wagner WC. (1994) Association between neutrophil functions and periparturient disorders in cows. *Am. J. Vet. Res.*, **55**, 934-943.
- [33] Hussain AM, Daniel RC. (1992) Phagocytosis by uterine fluid and blood neutrophils and hematological changes in postpartum cows following normal and abnormal parturition. *Theriogenology*, **37**, 1253-1267.
- [34] Mateus L, Lopes da Costa L, Carvalho H, Serra P, Robalo SJ. (2002) Blood and intrauterine leukocyte profile and function in dairy cows that spontaneously recovered from postpartum endometritis. *Reprod. Domest. Anim.*, **37**, 176-180.
- [35] Zerbe H, Ossadnik C, Leibold W, Schuberth HJ. (2002) Lochial secretions of *Escherichia coli*- or *Arcanobacterium pyogenes*-infected bovine uteri modulate the phenotype and the functional capacity of neutrophilic granulocytes. *Theriogenology*, **57**, 1161-1177.
- [36] Wathes DC, Cheng Z, Chowdhury W, Fenwick MA, Fitzpatrick R, Morris DG, Patton J, Murphy JJ. (2009) Negative energy balance alters global gene expression and immune responses in the uterus of postpartum dairy cows. *Physiol. Genomics*, **39**, 1-13.
- [37] Sheldon IM, Noakes DE, Rycroft A, Dobson H. (2001) Acute phase protein responses to uterine bacterial contamination in cattle after calving. *Vet. Rec.*, **148**, 172-175.
- [38] Herath S, Dobson H, Bryant CE, Sheldon IM. (2006) Use of the cow as a large animal model of uterine infection and immunity. *J. Reprod. Immunol.*, **69**, 13-22.
- [39] Williams EJ, Fischer DP, Pfeiffer DU, England GC, Noakes DE, Dobson H, Sheldon IM. (2005) Clinical evaluation of postpartum vaginal mucus reflects uterine bacterial infection and the immune response in cattle. *Theriogenology*, **63**, 102-117.
- [40] Jones ML, Allison RW. (2007) Evaluation of the ruminant complete blood cell count. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.*, **23**, 377-402.
- [41] Corbeil LB, Schurig GD, Duncan JR, Corbeil RR, Winter AJ. (1974) Immunoglobulin classes and biological functions of *Campylobacter* (*Vibrio*) fetus antibodies in serum and cervicovaginal mucus. *Infect. Immun.*, **10**, 422-429.
- [42] Cobb SP, Watson ED. (1995) Immunohistochemical study of immune cells in the bovine endometrium at different stages of the oestrous cycle. *Res. Vet. Sci.*, **59**, 238-241.
- [43] Iborra A, Mayorga M, Llobet N, Martinez P. (2003) Expression of complement regulatory proteins [membrane cofactor protein (CD46), decay accelerating factor (CD55), and protectin (CD59)] in endometrial stressed cells. *Cell Immunol.*, **223**, 46-51.

Références bibliographiques

- [44] Sheldon IM. (2004) The postpartum uterus. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.*, **20**, 569-591.
- [45] Gilbert RO, Shin ST, Guard CL, Erb HN, Frajblat M. (2005) Prevalence of endometritis and its effects on reproductive performance of dairy cows. *Theriogenology*, **64**, 1879-1888.
- [46] Gautam G, Nakao T, Yusuf M, Koike K. (2009) Prevalence of endometritis during the postpartum period and its impact on subsequent reproductive performance in two Japanese dairy herds. *Anim. Reprod. Sci.*, **116**, 175-187.
- [47] Kim IH, Kang HG. (2003) Risk factors for postpartum endometritis and the effect of endometritis on reproductive performance in dairy cows in Korea. *J. Reprod. Dev.*, **49**, 485-491.
- [48] Heuer C, Schukken YH, Dobbelaar P. (1999) Postpartum body condition score and results from the first test day milk as predictors of disease, fertility, yield, and culling in commercial dairy herds. *J. Dairy Sci.*, **82**, 295-304.
- [49] LeBlanc S. (2010) Monitoring metabolic health of dairy cattle in the transition period. *J. Reprod. Dev.*, **56 Suppl**, S29-S35.
- [50] Hammon DS, Evjen IM, Dhiman TR, Goff JP, Walters JL. (2006) Neutrophil function and energy status in Holstein cows with uterine health disorders. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **113**, 21-29.
- [51] Reist M, Erdin DK, von Euw D, Tschumperlin KM, Leuenberger H, Hammon HM, Kunzi N, Blum JW. (2003) Use of threshold serum and milk ketone concentrations to identify risk for ketosis and endometritis in high-yielding dairy cows. *Am. J. Vet. Res.*, **64**, 188-194.
- [52] Hoeben D, Heyneman R, Burvenich C. (1997) Elevated levels of beta-hydroxybutyric acid in periparturient cows and in vitro effect on respiratory burst activity of bovine neutrophils. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **58**, 165-170.
- [53] Erb HN, Grohn YT. (1988) Epidemiology of metabolic disorders in the periparturient dairy cow. *J. Dairy Sci.*, **71**, 2557-2571.
- [54] Gier HT, Marion GB. (1968) Uterus of the cow after parturition: involutinal changes. *Am. J. Vet. Res.*, **29**, 83-95.
- [55] Opsomer G, Grohn YT, Hertl J, Coryn M, Deluyker H, De Kruif A. (2000) Risk factors for post partum ovarian dysfunction in high producing dairy cows in Belgium: a field study. *Theriogenology*, **53**, 841-857.
- [56] Sheldon IM, Noakes DE, Rycroft AN, Pfeiffer DU, Dobson H. (2002) Influence of uterine bacterial contamination after parturition on ovarian dominant follicle selection and follicle growth and function in cattle. *Reproduction.*, **123**, 837-845.
- [57] Williams EJ, Fischer DP, Noakes DE, England GC, Rycroft A, Dobson H, Sheldon IM. (2007) The relationship between uterine pathogen growth density and ovarian function in the postpartum dairy cow. *Theriogenology*, **68**, 549-559.

Références bibliographiques

- [58] Herath S, Williams EJ, Lilly ST, Gilbert RO, Dobson H, Bryant CE, Sheldon IM. (2007) Ovarian follicular cells have innate immune capabilities that modulate their endocrine function. *Reproduction.*, **134**, 683-693.
- [59] Grant E, Lilly ST, Herath S, Sheldon IM. (2007) *Escherichia coli* lipopolysaccharide modulates bovine luteal cell function. *Vet. Rec.*, **161**, 695-696.
- [60] Barlund CS, Carruthers TD, Waldner CL, Palmer CW. (2008) A comparison of diagnostic techniques for postpartum endometritis in dairy cattle. *Theriogenology*, **69**, 714-723.
- [61] Parlevliet JM, Ytredal U, Berenpas D, Slaa JW, Bandsma J, de Lange D. (2006) Prevalence of subclinical endometritis in Dutch dairy cows and its effect on fertility. *Reprod. Domest. Anim.*, **41**, 353.
- [62] Fourichon C, Seegers H, Malher X. (2000) Effect of disease on reproduction in the dairy cow: a meta-analysis. *Theriogenology*, **53**, 1729-1759.
- [63] LeBlanc SJ, Duffield TF, Leslie KE, Bateman KG, Keefe GP, Walton JS, Johnson WH. (2002) Defining and diagnosing postpartum clinical endometritis and its impact on reproductive performance in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, **85**, 2223-2236.
- [64] Gilbert RO, Shin ST, Guard CL, Erb HN. (1998) Incidence of endometritis and effects on reproductive performance of dairy cows. *Theriogenology*, **49**, 251.
- [65] LeBlanc SJ. (2008) Postpartum uterine disease and dairy herd reproductive performance: a review. *Vet. J.*, **176**, 102-114.
- [66] Kossaibati MA, Esslemont RJ. (1997) The costs of production diseases in dairy herds in England. *Vet. J.*, **154**, 41-51.
- [67] Ataide Dias R, Mahon G, Dore G. EU cattle population in December 2007 and production forecasts for 2008. Eurostat., 2008.
- [68] Riddle WT, Leblanc MM, Stromberg AJ. (2007) Relationships between uterine culture, cytology and pregnancy rates in a Thoroughbred practice. *Theriogenology*, **68**, 395-402.
- [69] Brook D. (1985) Cytological and bacteriological examination of the mare's endometrium. *J. Equine Vet. Sci.*, **5**, 16-22.
- [70] Whitworth MK, Pafilis I, Vince G, Quenby S. (2007) Cervical leukocyte subpopulations in idiopathic preterm labour. *J. Reprod. Immunol.*, **75**, 48-55.
- [71] Leblanc MM, Causey RC. (2009) Clinical and subclinical endometritis in the mare: both threats to fertility. *Reprod. Domest. Anim.*, **44 Suppl 3**, 10-22.
- [72] Kasimanickam R, Duffield TF, Foster RA, Gartley CJ, Leslie KE, Walton JS, Johnson WH. (2005) A comparison of the cytobrush and uterine lavage techniques to evaluate endometrial cytology in clinically normal postpartum dairy cows. *Can. Vet. J.*, **46**, 255-259.

Références bibliographiques

- [73] Santos NR, Lamb GC, Brown DR, Gilbert RO. (2009) Postpartum endometrial cytology in beef cows. *Theriogenology*, **71**, 739-745.
- [74] Studer E, Morrow DA. (1978) Uterine cultures and histological evaluation as complements to routine postpartum examinations. *Irish Vet. J.*, **35**, 106-110.
- [75] Bonnett BN, Martin SW, Meek AH. (1993) Associations of clinical findings, bacteriological and histological results of endometrial biopsy with reproductive performance of postpartum dairy cows. *Prev. Vet. Med.*, **15**, 205-220.
- [76] Lewis GS. (1997) Uterine health and disorders. *J. Dairy Sci.*, **80**, 984-994.
- [77] de Bois C, Manspeaker JE. (1986) Endometrial biopsy of the bovine. In : Morrow DA, editor. *Current therapy in theriogenology*. Philadelphia : WB Saunders Compagny, 424-426.
- [78] Chapwanya A, Meade KG, Narciandi F, Standley P, Mee JF, Doherty ML, Callahan CJ, O'Farrelly C. (2010) Endometrial biopsy: a valuable clinical and research tool in bovine reproduction. *Theriogenology*, **73**, 988-994.
- [79] McQueen RD. (1967) A biopsy instrument for obtaining bovine endometrial samples for histologic and metabolic investigations. *Am. J. Vet. Res.*, **28**, 1881-1885.
- [80] Subandrio AL, Sheldon IM, Noakes DE. (2000) Peripheral and intrauterine neutrophil function in the cow: the influence of endogenous and exogenous sex steroid hormones. *Theriogenology*, **53**, 1591-1608.
- [81] Subandrio AL, Noakes DE. (1997) Neutrophil migration into the uterine lumen of the cow: the influence of endogenous and exogenous sex steroid hormones using two intrauterine chemoattractants. *Theriogenology*, **47**, 825-835.
- [82] Lamote I, Meyer E, De Ketelaere A, Duchateau L, Burvenich C. (2006) Influence of sex steroids on the viability and CD11b, CD18 and CD47 expression of blood neutrophils from dairy cows in the last month of gestation. *Vet. Res.*, **37**, 61-74.
- [83] Roth JA, Kaeberle ML, Appell LH, Nachreiner RF. (1983) Association of increased estradiol and progesterone blood values with altered bovine polymorphonuclear leukocyte function. *Am. J. Vet. Res.*, **44**, 247-253.
- [84] Lander Chacin MF, Hansen PJ, Drost M. (1990) Effect of stage of the estrus cycle and steroid treatment on uterine immunoglobulin content and polymorphonuclear leukocytes in cattle. *Theriogenology*, **34**, 1169-1185.
- [85] Sheldon IM, Gilbert R. (2006) The effect of ovarian steroids and beta hydroxy-butyrate on postpartum uterine immune function in cattle. In : *XXIVth World Buiatrics Congress*, Nice, France, 15-19 Octobre 2006.
- [86] Messier S, Higgins R, Couture Y, Morin M. (1984) Comparison of swabbing and biopsy for studying the flora of the bovine uterus. *Can. Vet. J.*, **25**, 283-288.
- [87] Sheldon IM, Lewis GS, LeBlanc S, Gilbert RO. (2006) Defining postpartum uterine disease in cattle. *Theriogenology*, **65**, 1516-1530.

Références bibliographiques

- [88] Senosy WS, Uchiza M, Tameoka N, Izaike Y, Osawa T. (2009) Association between evaluation of the reproductive tract by various diagnostic tests and restoration of ovarian cyclicity in high-producing dairy cows. *Theriogenology*, **72**, 1153-1162.
- [89] Mee J. (2007) Un nouvel outil pour diagnostiquer l'endométrite. *Le Point Vet.*, **274**, 14-15.
- [90] Runciman DJ, Anderson GA, Malmo J. (2009) Comparison of two methods of detecting purulent vaginal discharge in postpartum dairy cows and effect of intrauterine cephalixin on reproductive performance. *Aust. Vet. J.*, **87**, 369-378.
- [91] Dhaliwal GS, Murray RD, Woldehiwet Z. (2001) Some aspects of immunology of the bovine uterus related to treatments for endometritis. *Anim. Reprod. Sci.*, **67**, 135-152.
- [92] Skinner JG, Brown R, Roberts L. (1991) Bovine haptoglobin response in clinically defined field conditions. *Vet. Rec.*, **128**, 149.
- [93] Regassa F, Noakes DE. (1999) Acute phase protein response of ewes and the release of PGFM in relation to uterine involution and the presence of intrauterine bacteria. *Vet. Rec.*, **144**, 502-506.
- [94] Chan JP, Chang CC, Hsu WL, Liu WB, Chen TH. (2009) Association of increased serum acute-phase protein concentrations with reproductive performance in dairy cows with postpartum metritis. *Vet. Clin. Pathol.*, **39**, 72-78.
- [95] Del Vecchio RP, Matsas DJ, Inzana TJ, Sponenberg DP, Lewis GS. (1992) Effect of intrauterine bacterial infusions and subsequent endometritis on prostaglandin F2 alpha metabolite concentrations in postpartum beef cows. *J. Anim. Sci.*, **70**, 3158-3162.
- [96] Slama H, Vaillancourt D, Goff AK. (1991) Pathophysiology of the puerperal period: relationship between prostaglandin E2 (PGE2) and uterine involution in the cow. *Theriogenology*, **36**, 1071-1092.
- [97] Archbald LF, Tsai IF, Thatcher WW, Tran T, Wolfsdorf K, Risco C. (1998) Use of plasma concentrations of 13,14-dihydro,15-keto-PGF2 alpha (PGFM) in the diagnosis of sub-clinical endometritis and its relationship to fertility in the postpartum dairy cow. *Theriogenology*, **49**, 1425-1436.
- [98] Sattler M, Furl H. (2004) Creatine kinase and aspartate aminotransferase in cows as indicators for endometritis. *J. Vet. Med. A*, **51**, 132-137.
- [99] Azawi OI, Omran SN, Hadad JJ. (2008) A study of endometritis causing repeat breeding of cycling iraqi buffalo cows. *Reprod. Domest. Anim.*, **43**, 735-743.
- [100] Ahmadi MR, Khodakaram Tafti A, Nazifi S, Ghaisari HR. (2005) The comparative evaluation of uterine and cervical mucosa cytology with endometrial histopathology in cows. *Comp. Clin. Pathol.*, **14**, 90-94.
- [101] Kramer JW. (2000) Normal hematology of cattle, sheep and goats. In : Feldman BF, Zinkl JG, Jain NC, editors. *Schalm's veterinary hematology*. Philadelphia : Lippincott Williams and Wilkins, 1075-1084.

Références bibliographiques

- [102] DesCôteaux L, Gnemmi G, Colloton J. (2010) *Practical atlas of ruminant and camelid reproductive ultrasonography*. DesCôteaux L, Gnemmi G, Collanton J, editors. Wiley & Sons, 1-228.
- [103] Battocchio M, Gabai G, Mollo A, Veronesi MC, Soldano F, Bono G, Cairoli F. (1999) Agreement between ultrasonographic classification of the CL and plasma progesterone concentration in dairy cows. *Theriogenology*, **51**, 1059-1069.
- [104] Lin LI. (1989) A concordance correlation coefficient to evaluate reproducibility. *Biometrics*, **45**, 255-268.
- [105] Barnhart HX, Haber M, Song J. (2002) Overall concordance correlation coefficient for evaluating agreement among multiple observers. *Biometrics*, **58**, 1020-1027.
- [106] Crawford SB, Kosinski AS, Lin HM, Williamson JM, Barnhart HX. (2007) Computer programs for the concordance correlation coefficient. *Comput. Methods Programs Biomed.*, **88**, 62-74.
- [107] Partik BL, Stadler A, Schamp S, Koller A, Voracek M, Heinz G, Helbich TH. (2002) 3D versus 2D ultrasound: accuracy of volume measurement in human cadaver kidneys. *Invest. Radiol.*, **37**, 489-495.
- [108] Haley SM, Osberg JS. (1989) Kappa coefficient calculation using multiple ratings per subject: a special communication. *Phys. Ther.*, **69**, 970-974.
- [109] Cox DR. (1972) Regression models and life tables. *J. R. Statist. Soc. B.*, **34**, 187-220.
- [110] Akaike H. (1974) A new look at the statistical model identification. *IEEE Transactions on Automatic Control*, **19**, 716-723.
- [111] Desquilbet L, Mariotti F. (2010) Dose-response analyses using restricted cubic spline functions in public health research. *Stat. Med.*, **29**, 1037-1057.
- [112] Ross JD. (2004) What is endometritis and does it require treatment? *Sex. Transm. Infect.*, **80**, 252-253.
- [113] Stephens LR, Slee KJ, Poulton P, Larcombe M, Kosior E. (1986) Investigation of purulent vaginal discharge in cows, with particular reference to *Haemophilus somnus*. *Aust. Vet. J.*, **63**, 182-185.
- [114] Stockdale H, Rodning S, Givens M, Carpenter D, Lenz S, Spencer J, Dykstra C, Lindsay D, Blagburn B. (2007) Experimental infection of cattle with a feline isolate of *Tritrichomonas foetus*. *J. Parasitol.*, **93**, 1429-1434.
- [115] Ahmadi MR, Nazifi S. (2006) Evaluation of reproductive status with cervical and uterine cytology in fat-tailed sheep. *Comp. Clin. Pathol.*, **15**, 161-164.
- [116] Ahmadi MR, Nazifi S, Ghaisari HR. (2006) Comparative cervical cytology and conception rate in postpartum dairy cows. *Vet. Archiv.*, **76**, 323-332.

Références bibliographiques

- [117] Zerbe H, Schuberth HJ, Hoedemaker M, Grunert E, Leibold W. (1996) A new model system for endometritis: basic concepts and characterization of phenotypic and functional properties of bovine uterine neutrophils. *Theriogenology*, **46**, 1339-1356.
- [118] Santos NR, Roman HB, Gilbert RO. (2006) The use of leukocytes esterase reagent strips for diagnosis of subclinical endometritis in dairy cows. *Theriogenology*, **66**, 666-667.
- [119] Couto MA, Hughes JP. (1984) Technique and interpretation of cervical and endometrial cytology in the mare. *J. Equine Vet. Sci.*, **4**, 265-273.
- [120] Ahmadi MR, Nazifi S, Ghaisari HR. (2006) Comparison of hormonal changes of oestrus cycle with cytology of cervical mucosa and hematological parameters in dairy heifers. *Comp Clin Pathol*, **15**, 94-97.
- [121] Bondurant RH. (1999) Inflammation in the bovine female reproductive tract. *J. Anim. Sci.*, **77**, 101-110.
- [122] Roussel M, Benard C, Ly-Sunnaram B, Fest T. (2010) Refining the white blood cell differential: the first flow cytometry routine application. *Cytometry*, **77**, 552-563.
- [123] Koepke JA, Dotson MA, Shifman MA. (1985) A critical evaluation of the manual/visual differential leukocyte counting method. *Blood Cells*, **11**, 173-186.
- [124] Bonnett BN, Miller RB, Etherington WG, Martin SW, Johnson WH. (1991) Endometrial biopsy in Holstein-Friesian dairy cows. I. Technique, histological criteria and results. *Can. J. Vet. Res.*, **55**, 155-161.
- [125] Petit T, Spergser J, Rosengarten R, Aurich J. (2009) Prevalence of potentially pathogenic bacteria as genital pathogens in dairy cattle. *Reprod. Domest. Anim*, **44**, 88-91.
- [126] McDougall S. (2005) Gross abnormalities, bacteriology and histological lesions of uteri of dairy cows failing to conceive or maintain pregnancy. *N. Z. Vet. J.*, **53**, 253-256.
- [127] Guvenc K, Reilas T, Katila T. (2005) Effect of insemination dose and site on uterine inflammatory response of mares. *Theriogenology*, **63**, 2504-2512.
- [128] Sheldon IM, Bushnell M, Montgomery J, Rycroft AN. (2004) Minimum inhibitory concentrations of some antimicrobial drugs against bacteria causing uterine infections in cattle. *Vet. Rec.*, **155**, 383-387.
- [129] Kaufmann TB, Drillich M, Tenhagen BA, Forderung D, Heuwieser W. (2009) Prevalence of bovine subclinical endometritis 4h after insemination and its effects on first service conception rate. *Theriogenology*, **71**, 385-391.
- [130] Gloor H. (1967) Cervicitis als Sterilitätsursache [Cervicitis as a cause of sterility]. *Schweiz. Arch. Tierheilkd.*, **109**, 574-579.
- [131] Galvao KN, Greco LF, Vilela JM, Sa Filho MF, Santos JE. (2009) Effect of intrauterine infusion of ceftiofur on uterine health and fertility in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, **92**, 1532-1542.

Références bibliographiques

- [132] Gautam G, Nakao T, Koike K, Long ST, Yusuf M, Ranasinghe RM, Hayashi A. (2009) Spontaneous recovery or persistence of postpartum endometritis and risk factors for its persistence in Holstein cows. *Theriogenology*, **73**, 168-179.
- [133] Galvao KN, Frajblat M, Brittin SB, Butler WR, Guard CL, Gilbert RO. (2009) Effect of prostaglandin F2alpha on subclinical endometritis and fertility in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, **92**, 4906-4913.
- [134] Baranski W, Podhalicz-Dziegielewska M, Janowski T, Zdunczyk S, Ukazewicz G. (2009) Preliminary cytological and bacteriological findings in post-partum uterus of cows. *Reprod. Dom. Anim.*, **44**, 95.
- [135] Remontet L, Bossard N, Belot A, Esteve J. (2007) An overall strategy based on regression models to estimate relative survival and model the effects of prognostic factors in cancer survival studies. *Stat. Med.*, **26**, 2214-2228.
- [136] Florescu M, Hasan B, Seymour L, Ding K, Shepherd FA. (2008) A clinical prognostic index for patients treated with erlotinib in National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group study BR.21. *J. Thorac. Oncol.*, **3**, 590-598.
- [137] Gustafsson H, Emanuelson U. (2002) Characterisation of the repeat breeding syndrome in Swedish dairy cattle. *Acta. Vet. Scand.*, **43**, 115-125.
- [138] Yusuf M, Nakao T, Ranasinghe RB, Gautam G, Long ST, Yoshida C, Koike K, Hayashi A. (2010) Reproductive performance of repeat breeders in dairy herds. *Theriogenology*, **73**, 1220-1229.
- [139] Bacha B, Regassa FG. (2010) Subclinical endometritis in Zebu x Friesian crossbred dairy cows: its risk factors, association with subclinical mastitis and effect on reproductive performance. *Trop. Anim. Health Prod.*, **42**, 397-403.
- [140] Rozeboom KJ. (1998) Characterization of uterine leukocyte infiltration in gilts after artificial insemination. *J. Reprod. Fertil.*, **114**, 195-199.
- [141] Zerbe H. (2006) Immunological response of the uterus to semen - only a clearance mechanism? *Reprod. Domest. Anim.* **41**, 147.
- [142] Katila T. (1995) Onset and duration of uterine inflammatory response of mares after insemination with fresh semen. *Biol. Reprod. Monogr.*, **1**, 515-517.
- [143] Hill J, Gilbert R. (2008) Reduced quality of bovine embryos cultured in media conditioned by exposure to an inflamed endometrium. *Aust. Vet. J.*, **86**, 312-316.
- [144] Hobé M, Chastant-Maillard S. (2009) Impact économique de la reproduction en système laitier. *Point Vét.*, **40**, 135-137.
- [145] Hussain AM, Daniel RC. (1992) Effects of intrauterine infusion of *Escherichia coli* endotoxin in normal cows and in cows with endometritis induced by experimental infection with *Streptococcus agalactiae*. *Theriogenology*, **37**, 791-810.

Références bibliographiques

- [146] Gilbert RO, Frajblat M, Butler WR, Guard CL, Erb HN, Roman HB. (2006) The importance of early postpartum ovulation for reproduction in dairy cows. *In : XXIV th World Buiatrics Congress*, Nice, France, 15-19 Octobre 2006.
- [147] Gautam G, Nakao T, Yamada K, Yoshida C. (2010) Defining delayed resumption of ovarian activity postpartum and its impact on subsequent reproductive performance in Holstein cows. *Theriogenology*, **73**, 180-189.
- [148] Ennuyer M. (2008) Interprétations des données du contrôle laitier : taux protéique, taux butyreux et reproduction. *In : Journées Nationales des GTV*, Nantes, France, 28-30 Mai 2008, 521-532.
- [149] Subandrio AL, Noakes DE. (1992) The influence of the stage of the bovine œstrus cycle on the chemotactic stimulus of oyster glycogen to intrauterine neutrophils. *Br. Vet. J.*, **148**, 163-165.
- [150] Peter AT, Bosu WT, DeDecker RJ. (1989) Suppression of preovulatory luteinizing hormone surges in heifers after intrauterine infusions of *Escherichia coli* endotoxin. *Am. J. Vet. Res.*, **50**, 368-373.
- [151] Ahmadi MR, Nazifi S, Sajedianfard J, Moattari G. (2007) Impact of estrous synchronization methods on cellular proportions in cervical mucus and serum hormone concentrations. *Theriogenology*, **67**, 598-604.
- [152] Noakes DE. (2001) Endogenous and exogenous control of ovarian cyclicity. *In : Noakes DE, Parkinson TJ, England G, editors. Arthur's veterinary reproduction and obstetrics*. London : Saunders, 3-53.
- [153] Wolfenson D, Inbar G, Roth Z, Kaim M, Bloch A, Braw-Tal R. (2004) Follicular dynamics and concentrations of steroids and gonadotropins in lactating cows and nulliparous heifers. *Theriogenology*, **62**, 1042-1055.
- [154] Grimard B, Disenhaus C. (2005) Anomalies de reprise de la cyclicité après vêlage. *Le Point Vét.*, **36**, 16-21.
- [155] Parker KI, Robertson DM, Groome NP, Macmillan KL. (2003) Plasma concentrations of inhibin a and follicle-stimulating hormone differ between cows with two or three waves of ovarian follicular development in a single estrous cycle. *Biol. Reprod.*, **68**, 822-828.
- [156] Lewis GS. (2003) Steroidal regulation of uterine resistance to bacterial infection in livestock. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, **28**, 1-117.
- [157] Pfister I, Weber F, Sauter-Louis C, Petzl W, Zerbe H. (2009) Influence of oestrus cycle on somatic cell count in dairy cows. *Reprod. Domest. Anim.*, **44**, 78.
- [158] Hawk HW, Turner GD, Sykes JF. (1960) The effect of ovarian hormones on the uterine defense mechanism during the early stages of induced infection. *Am. J. Vet. Res.*, **21**, 644-648.
- [159] Killingbeck J, Lamming GE. (1963) Influence of uterine secretions on phagocytosis. *Nature*, **198**, 111-112.

Références bibliographiques

- [160] Anderson GA, Malmo J. (1985) Pregnancy rate of cows given synthetic gonadotrophin-releasing hormone at the time of service. *Aust. Vet. J.*, **62**, 222-224.
- [161] Faundez R, Duszewska AM, Kluckinsky W, Spohr I, Sitarska E, Trenti, F. (1994) Occurrence of LKs and epit cells in the lumen of the reprod tract during the ovarian cycle. In : *XVIIIth World Buiatrics Congress: XXVIth Congress ob the Italian Association of Buiatrics*, Bologna, Italy, 29 Août - 02 Septembre 1994, 6-11.
- [162] Vander Wielen AL, King GJ. (1984) Intraepithelial lymphocytes in the bovine uterus during the oestrus cycle and early gestation. *J. Reprod. Fertil.*, **70**, 457-462.
- [163] Stinson AW, Weber AF, Zemjanis R. (1962) The bovine endometrium: an electron microscopic study. *Am. J. Vet. Res.*, **23**, 1164-1182.
- [164] Matsuda H, Okuda K, Imori T. (1983) Tissue concentrations of eosinophilia in the bovine oviduct and uterus of different stages of the oestrous cycle. *Res. Vet. Sci.*, **34**, 369-370.
- [165] Muller LD, Owens MJ. (1974) Factors associated with the incidence of retained placentas. *J. Dairy Sci.*, **57**, 725-728.
- [166] Markusfeld O. (1984) Factors responsible for post parturient metritis in dairy cattle. *Vet. Rec.*, **114**, 539-542.
- [167] Martinez J, Thibier M. (1984) Reproductive disorders in dairy cattle: I. Respective influence of herds, seasons, milk yield and parity. *Theriogenology*, **21**, 569-581.
- [168] Curtis CR, Erb HN, Sniffen CJ, Smith RD, Kronfeld DS. (1985) Path analysis of dry period nutrition, postpartum metabolic and reproductive disorders, and mastitis in Holstein cows. *J. Dairy Sci.*, **68**, 2347-2360.
- [169] Erb HN, Smith RD, Oltenacu PA, Guard CL, Hillman RB, Powers PA, Smith MC, White ME. (1985) Path model of reproductive disorders and performance, milk fever, mastitis, milk yield, and culling in Holstein cows. *J. Dairy Sci.*, **68**, 3337-3349.
- [170] Markusfeld O. (1987) Periparturient traits in seven high dairy herds. Incidence rates, association with parity, and interrelationships among traits. *J. Dairy Sci.*, **70**, 158-166.
- [171] Gearhart MA, Curtis CR, Erb HN, Smith RD, Sniffen CJ, Chase LE, Cooper MD. (1990) Relationship of changes in condition score to cow health in Holsteins. *J. Dairy Sci.*, **73**, 3132-3140.
- [172] Correa MT, Erb H, Scarlett J. (1993) Path analysis for seven postpartum disorders of Holstein cows. *J. Dairy Sci.*, **76**, 1305-1312.
- [173] Waltner SS, McNamara JP, Hillers JK. (1993) Relationships of body condition score to production variables in high producing Holstein dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, **76**, 3410-3419.
- [174] Han IK, Kim IH. (2005) Risk factors for retained placenta and the effect of retained placenta on the occurrence of postpartum diseases and subsequent reproductive performance in dairy cows. *J. Vet Sci.*, **6**, 53-59.

Références bibliographiques

- [175] Whiteford LC, Sheldon IM. (2005) Association between clinical hypocalcaemia and postpartum endometritis. *Vet. Rec.*, **157**, 202-203.
- [176] Runciman DJ, Anderson GA, Malmo J, Davis GM. (2008) Use of postpartum vaginoscopic (visual vaginal) examination of dairy cows for the diagnosis of endometritis and the association of endometritis with reduced reproductive performance. *Aust. Vet. J.*, **86**, 205-213.
- [177] Potter TJ, Guitian J, Fishwick J, Gordon PJ, Sheldon IM. (2010) Risk factors for clinical endometritis in postpartum dairy cattle. *Theriogenology*, **74**, 127-134.
- [178] Bruun J, Ersboll AK, Alban L. (2002) Risk factors for metritis in Danish dairy cows. *Prev. Vet. Med.*, **54**, 179-190.
- [179] Runciman DJ, Anderson GA, Malmo J, Davis GM. (2008) Effect of intrauterine treatment with cephalixin on the reproductive performance of seasonally calving dairy cows at risk of endometritis following periparturient disease. *Aust. Vet. J.*, **86**, 250-258.
- [180] Altman DG, Bland JM. (1994) Diagnostic tests. 1: Sensitivity and specificity. *BMJ*, **308**, 1552.
- [181] Altman DG, Bland JM. (1994) Diagnostic tests 2: Predictive values. *BMJ*, **309**, 102.
- [182] Oltenacu PA, Britt JH, Braun RK, Mellenberger RW. (1983) Relationships among type of parturition, type of discharge from genital tract, involution of cervix, and subsequent reproductive performance in Holstein cows. *J. Dairy Sci.*, **66**, 612-619.
- [183] Sheldon IM, Noakes DE. (1998) Comparison of three treatments for bovine endometritis. *Vet. Rec.*, **142**, 575-579.
- [184] Silva E, Sterry RA, Fricke PM. (2007) Assessment of a practical method for identifying anovular dairy cows synchronized for first postpartum timed artificial insemination. *J. Dairy Sci.*, **90**, 3255-3262.
- [185] Seals RC, Matamoros I, Lewis GS. (2002) Relationship between postpartum changes in 13, 14-dihydro-15-keto-PGF₂α concentrations in Holstein cows and their susceptibility to endometritis. *J. Anim. Sci.*, **80**, 1068-1073.
- [186] Sheldon IM, Noakes DE, Rycroft AN, Dobson H. (2002) Effect of postpartum manual examination of the vagina on uterine bacterial contamination in cows. *Vet. Rec.*, **151**, 531-534.
- [187] Roy. (2010) *Annuaire vétérinaire*. 82^e ed. Rueil-Malmaison : Les éditions du Point Vétérinaire, 1620p.
- [188] AGRESTE. *La statistique, l'évaluation et la prospective agricole* [en ligne], <http://agreste.agriculture.gouv.fr/>, (consulté le 25 Août 2010).
- [189] UPRA Prim'Holstein France. *L'association française des éleveurs de Prim'Holstein*. [en ligne] <http://www.primholstein.com/>, (consulté le 25 Août 2010).

Références bibliographiques

- [190] AGRESTE. *La statistique, l'évaluation et la prospective agricole* [en ligne], <http://agreste.agriculture.gouv.fr/>, (consulté le 02 Octobre 2010).
- [191] McDougall S, Macaulay R, Compton C. (2007) Association between endometritis diagnosis using a novel intravaginal device and reproductive performance in dairy cattle. *Anim Reprod. Sci.*, **99**, 9-23.
- [192] Journal Officiel de la République Française. (2007) Décret no 2007-596 du 24 avril 2007 relatif aux conditions et modalités de prescription et de délivrance au détail des médicaments vétérinaires et modifiant le code de la santé publique.
- [193] Sheldon IM, Dobson H. (2004) Postpartum uterine health in cattle. *Anim. Reprod. Sci.*, **82-83**, 295-306.
- [194] Chastant-Maillard S, Charpentier L, Deguillaume L, Buret Y, Gipoulou C. (2009) Le suivi de reproduction en élevage bovin : pratiques actuelles en France. *Bull. GTV*, **50**, 109-114.
- [195] Mee JF. (2007) The role of the veterinarian in bovine fertility management on modern dairy farms. *Theriogenology*, **68**, 257-265.
- [196] Liu MC, Wu CM, Liu YC, Zhao JC, Yang YL, Shen JZ. (2009) Identification, susceptibility, and detection of integron-gene cassettes of *Arcanobacterium pyogenes* in bovine endometritis. *J. Dairy Sci.*, **92**, 3659-3666.
- [197] Handelsman J, Rondon MR, Brady SF, Clardy J, Goodman RM. (1998) Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chem. Biol.*, **5**, 245-249.
- [198] Tap J. (2009) Impact du régime alimentaire sur la dynamique structurale et fonctionnelle du microbiote intestinal humain. *Thèse de l'Université Pierre et Marie Curie - Paris 6*, 240p.
- [199] Zoetendal EG, Vaughan EE, de Vos WM. (2006) A microbial world within us. *Molecular Microbiology*, **59**, 1639-1650.
- [200] Singh B, Gautam SK, Verma V, Kumar M, Singh B. (2008) Metagenomics in animal gastrointestinal ecosystem: potential biotechnological prospects. *Anaerobe*, **14**, 138-144.
- [201] Walsh RB, LeBlanc SJ, Vernooy E, Leslie KE. (2008) Safety of a progesterone-releasing intravaginal device as assessed from vaginal mucosal integrity and indicators of systemic inflammation in postpartum dairy cows. *Can. J. Vet. Res.*, **72**, 43-49.
- [202] Rupp R, Boichard D. (2003) Genetics of resistance to mastitis in dairy cattle. *Vet. Res.*, **34**, 671-688.
- [203] Steffl M, Telgen L, Schweiger M, Amselgruber WM. (2010) Estrous cycle-dependent activity of neutrophils in the porcine endometrium: possible involvement of heat shock protein 27 and lactoferrin. *Anim. Reprod. Sci.*, **121**, 159-166.

Références bibliographiques

- [204] Gabler C, Drillich M, Fischer C, Holder C, Heuwieser W, Einspanier R. (2009) Endometrial expression of selected transcripts involved in prostaglandin synthesis in cows with endometritis. *Theriogenology*, **71**, 993-1004.
- [205] Dubuc, J, LeBlanc S. (2010) Prévalence, facteurs de risque et impacts des maladies utérines post-partum chez les vaches laitières. In : *Journées Nationales des GTV*, Lille, France, 26 – 28 Mai 2010. 645 – 648.
- [206] Chastant-Maillard S, Duffin M. (2008) Traitement des endométrites chez la vache : prostaglandines ou pas prostaglandines, là est la question. In : *Journées Nationales des GTV*, Nantes, France, 28-30 Mai 2008.
- [207] Steffan J, Agric M, Adriamanga S, Thibier M. (1984) Treatment of metritis with antibiotics or prostaglandin F2 alpha and influence of ovarian cyclicity in dairy cows. *Am. J Vet Res.*, **45**, 1090-1094.
- [208] Kasimanickam R, Duffield TF, Foster RA, Gartley CJ, Leslie KE, Walton JS, Johnson WH. (2005) The effect of a single administration of cephapirin or cloprostenol on the reproductive performance of dairy cows with subclinical endometritis. *Theriogenology*, **63**, 818-830.
- [209] LeBlanc SJ, Duffield TF, Leslie KE, Bateman KG, Keefe GP, Walton JS, Johnson WH. (2002) The effect of treatment of clinical endometritis on reproductive performance in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, **85**, 2237-2249.
- [210] Pasquin O. (2008) Effet d'un traitement intra-utérin à la céfapirine sur les performances de reproduction des vaches laitières. *Thèse Méd. Vét.*, Toulouse, 92p.
- [211] Halasa T, Osteras O, Hogeveen H, van Werven T, Nielen M. (2009) Meta-analysis of dry cow management for dairy cattle. Part 1. Protection against new intramammary infections. *J. Dairy Sci.*, **92**, 3134-3149.
- [212] Hendricks KEM, Bartolome JA, Melendez P, Risco C, Archbald LF. (2006) Effect of repeated administration of PGF2 in the early post partum period on the prevalence of clinical endometritis and probability of pregnancy at first insemination in lactating dairy cows. *Theriogenology*, **65**, 1454-1464.
- [213] Arlt S, Padberg W, Drillich M, Heuwieser W. (2009) Efficacy of homeopathic remedies as prophylaxis of bovine endometritis. *J. Dairy Sci.*, **92**, 4945-4953.
- [214] Singh J, Sidhu SS, Dhaliwal GS, Pangaonkar GR, Nanda AS, Grewal AS. (2000) Effectiveness of lipopolysaccharide as an intrauterine immunomodulator in curing bacterial endometritis in repeat breeding crossbred cows. *Anim. Reprod. Sci.*, **59**, 159-166.
- [215] Drillich M, Raab D, Wittke M, Heuwieser W. (2005) Treatment of chronic endometritis in dairy cows with an intrauterine application of enzymes: A field trial. *Theriogenology*, **63**, 1811-1823.
- [216] Kadokawa H, Martin GB. (2006) A new perspective on management of reproduction in dairy cows: the need for detailed metabolic information, an improved selection index and extended lactation. *J. Reprod. Dev.*, **52**, 161-168.

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

Manuscrit soumis dans une revue internationale à comité de lecture

- **Deguillaume L**, Geffré A, Desquilbet L, Dizien A, Thoumire S, Vornière C, Constant F, Fournier R, Chastant-Maillard S. Impact of endocervical inflammation on the reproductive performance of dairy cows. Relationship with endometritis. (soumis à *Theriogenology*)

Articles publiés dans des revues françaises à comité de lecture

- **Deguillaume L**, Chastant-Maillard S. (2011) Infections génitales non abortives. *Point Vét.* (article commandé)
- **Deguillaume L**, Chastant-Maillard S. (2009) Comment bien diagnostiquer les endométrites de la vache ? *Bull. GTV*, **49**, 101-105.
- Chastant-Maillard S, Charpentier L, **Deguillaume L**, Buret Y, Gipoulou C. (2009) Suivi de reproduction en élevage bovin : pratiques actuelles en France. *Bull. GTV*, **50**, 109-114.
- Hanzen C, Theron L, Simon A, **Deguillaume L**. (2009) Infections utérines : définitions, symptômes et diagnostic. *Point Vét.*, **299**, 41-46.
- **Deguillaume L**, Constant F, Chastant-Maillard S. (2008) Technique de ponction de kyste folliculaire. *Point Vét.*, **39**, 90-91.
- Constant F, **Deguillaume L**, Chastant-Maillard S. (2008) Conduite thérapeutique lors d'infécondité individuelle chez la vache. *Nov. Prat. Vét.*, **8**, 220, 40-44.

Articles de formation continue

- **Deguillaume L**. (2009) Votre opinion sur les infections utérines nous intéresse ! *PLM*, **402**, 6-7.
- Chastant-Maillard S, **Deguillaume L**. (2009) Endométrites subcliniques : la partie immergée de l'iceberg. *Repro Mag*, **n°5**, Intervet, Beaucauzé, France, 8-11.
- Chastant-Maillard S, Gondran C, **Deguillaume L**. (2009) Infections utérines, attention aux erreurs d'autodiagnostic et d'automédication. *PLM*, **405**, 22-24.
- **Deguillaume L**, Fournier R, Chastant-Maillard. (2008) Les méthodes de diagnostic des endométrites chez la vache. *Repro Mag*, **n°2**, Intervet, Beaucauzé, France, 6-8.

Participation à des congrès scientifiques

Congrès internationaux

- **Deguillaume L**, Pineau C, Choukroun H, Fournier R, Chastant-Maillard S. (2010) Influence of the estrus cycle stage on post-partum endometrial inflammation in the cow. *In : 14th annual conference of the European Society of Domestic Animal Reproduction*. Eger, Hongrie, 15-18 Septembre 2010, 61. (communication orale)
- **Deguillaume L**, Geffré A, Desquilbet L, Fournier R, Chastant-Maillard S. (2010) Post-partum cervicitis in dairy cows: incidence and impact on fertility. *In : 14th annual conference of the European Society of Domestic Animal Reproduction*. Eger, Hongrie, 15-18 Septembre 2010, 94. (poster)
- Chastant-Maillard S, **Deguillaume L**. (2009) Fertility Task Force : Dairymen and veterinarians approach to bovine endometritis - the current situation in France. *In : Satellite meeting of the World Buiatrics Congress 2009 organised by Pfizer Europe*. Marseille, France, 30 Novembre 2009. (communication orale)
- **Deguillaume L**, Boulouis HJ, Thoumire S, Vornière C, Constant F, Geffré A, Fournier R, Chastant-Maillard S. (2008) Comparative evaluation of various techniques for diagnosis of chronic endometritis in cows. *In : XXVth World Buiatrics Congress*. Budapest, Hongrie, 6–11 Juillet 2008, 186. (communication orale)

Congrès nationaux ou réunions régionales

- **Deguillaume L**, Gondran C, Chastant-Maillard S. (2010) Attitude et opinion des éleveurs français face aux endométrites. *In : 17^e Journées 3R*. Paris, France, 8-9 Décembre 2010. (poster accepté)
- De Moustier V, Constant F, **Deguillaume L**, Chastant-Maillard S. (2010) Efficacité de CIDR® pour le traitement de l'anœstrus anovulatoire chez la vache laitière. *In : Journées Nationales des GTV*, Lille, France, 26-28 mai 2010. (poster)
- **Deguillaume L**, Constant F, Boulouis HJ, Thoumire S, Vornière C, Constant F, Geffré A, Fournier R, Chastant-Maillard S. (2008) Comment évaluer la santé de l'utérus post-partum ? *In : Journées Nationales des GTV*, Nantes, France, 28-30 mai 2008. 25-30. (conférence invitée)

Publications et communications

- Chastant-Maillard S, **Deguillaume L**, Constant F. (2008) Involution utérine chez la vache : histoire naturelle d'une infection physiologique. In : *Journées Nationales des GTV*, Nantes, France, 28-30 mai 2008, 17-23.
- Chastant-Maillard S, **Deguillaume L**. (2008) Conduite à tenir face à un élevage à fort taux de métrites. In : *Journées des Prémontés*. GTV Alsace-Lorraine, France, 20 Juin 2008. (communication orale)

Encadrement de Thèses de Doctorat Vétérinaire

- Daragon B. (manuscrit en préparation) *Homogénéité de l'inflammation cytologique génitale chez la vache. Etudes in vivo et ex vivo*. Thèse Méd. Vét., Alfort.
- Gutierrez A. (manuscrit en préparation) *Effet d'un traitement intrautérin à base de cefapirine chez des vaches atteintes d'endométrite subclinique*. Thèse Méd. Vét., Alfort.
- Lecossais H, Lamorinière D. (manuscrit en préparation) *Impact d'une inflammation génitale sept jours avant l'insémination artificielle chez la vache Prim'Holstein*. Thèse Méd. Vét., Alfort.
- Violas J. (manuscrit en préparation) *Effet d'un traitement intrautérin à base de cefapirine chez des vaches atteintes de cervicite subclinique*. Thèse Méd. Vét., Alfort.
- Amate C, Godard A. (2010) *Influence de l'inflammation génitale sur la réussite à l'insémination chez la vache laitière*, Thèse Méd. Vét., Alfort, 50p.
- Choukroun H, Pineau C. (2010) *Influence du cycle œstral sur l'inflammation génitale chez la vache*, Thèse Méd. Vét., Alfort, 94p.
- Troitzky K. (2010) *Enquête sur les méthodes de diagnostic et de traitement des endométrites chez la vache en France*, Thèse Méd. Vét., Alfort, 101p.
- Dizien A. (2008) *Etude interspécifique des cytologies génitales pour le diagnostic de l'endométrite. Intérêt diagnostique chez la vache*, Thèse Méd. Vét., Alfort, 97p.

Encadrement de Mémoire de fin d'Etudes Agronomiques

- Gondran C. (2009) *Approche globale des inflammations du tractus génital chez la vache laitière*. Mémoire, ENITA, Clermont-Ferrand, 44p.