

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR

ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE IBN KHALDOUN DE TIARET

INSTITUT DES SCIENCES VETERINAIRES



Mémoire de fin d'études

en vue de l'obtention du Diplôme de Docteur Veterinaire

THÈME

Evaluation de la cytologie uterine dans le diagnostic de l'endométrite chez la vache

Présenté par :

-Melle Lamiri Lamia

-Melle Keddar Mahdjouba

Encadre par :

-Dr Adnane Mounir

Année universitaire : 2017 – 2018

Remerciements

Nous tenons tout d'abord à remercier **Dieu** le tout puissant et miséricordieux, qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce Modeste travail

En second lieu, nous voudrions présenter nos remerciements à notre encadreur. **Adnane mounir**

Nous voudrions également lui témoigner notre gratitude pour sa patience durant toute la période du travail et son soutien qui nous a été précieux afin de mener notre travail à bon port. Merci

Nos remerciements s'étendent également à tous les professeurs qui nous ont enseigné et qui par leurs compétences nous ont soutenu dans la poursuite de nos études.

Nous tenons également à remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

On n'oublie bien évidemment pas nos camarades de formation et les remercie chaleureusement pour tous ces agréables moments passés ensemble.

Dédicace

Ce travail est dédié tout particulièrement:

A mon père **Abdelkader**, pour votre aimable personnalité.

A ma mère **Djidjika**, merci de votre soutien infini, votre amour porté à mon égard.

A mes sœurs adorées **Leila**, **Assma**, **Sabrina**, **Nadia**

Merci pour votre sourire et votre joie de vivre. Merci de vos messages et appels parfois hilarants qui me redonnaient confiance

A mes frères: **Mohamed amine** et sa petite fille **Yassmin**. pour illuminer mes jours

A tous mes ami(e)s, Mahdjouba, Nawel pour leurs sincère amitié et confiance.

Je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, de santé et de réussite.

A tous mes collègues et promo 2017.

Dédicace

A celui qui m'a indiqué la bonne voie en me rappelant que la volonté fait mon Père **Mohamed**.

A celle qui a attendu avec patience les fruits de sa bonne éducation ma Mère **Shaa**

Sachez que je vous aime profondément et que je vous suis très reconnaissant pour votre patience, vos efforts, vos conseils et toutes les souffrances que vous avez endurées.

Soyez infiniment remerciés et que Dieu vous accorde une longue et heureuse vie.

A ma collègue: **Lamia, Fatima**

Ma tout sœur **Nadjet, Rima, nour elhouda** et mon petit Frère **Ahmed ilyess**

Je vous dédie ce travail en témoignage de ma grande affection et en souvenir des agréables moments passés ensemble.

A tous mes enseignants, depuis mes premières années d'études.

A tous ceux qui me sont chers et que j'ai omis citer.

Sommaire

Sommaire

Remerciement

Liste des abréviations

Résumé

	Introduction générale.....	02
Chapitre 1 : Anatomie et histologie de l'appareil génitale femelle		
	Anatomie	4
	Ovaires	4
	TractusGénital	5
	Oviducte ou trompe utérine	5
	Utérus ou matrice	6
	Col de l'utérus	6
	Vagin	7
	Sinus uro-génital	7
	Histologie	7
	Histologie de la trompe utérine	7
	Séreuse et sous-séreuse	8
	Muscleuse	8
	Muqueuse	9
	Histologie de l'utérus	10
	Séreuse (périmètre)	10
	Muscleuse (myomètre)	10
	Muqueuse (endomètre)	11
	Histologie du cervix	12
	Séreuse.....	12
	Muscleuse.....	12
	Muqueuse	12
	Histologie du vagin	13
	Séreuse et adventice	13
	Muscleuse	14
	Muqueuse.....	14
Chapitre 2 : Physiopathogénie des endométrites		
I.	Les définitions cliniques :.....	17

	La métrite puerpérale (ou aigüe).....	17
	Les endométrites.....	18
	Endometrite Clinique.....	20
	Endometrite Subclinique.....	21
	Pyometre	22
	Physiopathologie comparée de col et l'utérus.....	24
	Au cours de post partum	24
	Contamination initiale	24
	Élimination de la contamination	25
	Contractions utérines	25
	Phagocytose.....	27
Chapitre 3: Changements utérins en période post-partum		
	Involution structurelle/tissulaire/vasculaire	32
	Vulve, vestibule, vagin.....	32
	Col de l'utérus	32
	Corps utérin et cornes utérines.....	34
	Contenu utérin	35
	Lochies.....	35
	Contamination et élimination des bactéries de l'utérus en post-partum	36
	Virus.....	38
	Réponse immunitaire utérine en post partum	38
	Immunité et gestation.....	38
	Les polymorphonucléaires neutrophiles	39
	Fonctionnement des polymorphonucléaires neutrophiles	40
	Dysfonctionnement des polymorphonucléaires neutrophiles	40
	Immunité complémentaire aux polymorphonucléaires neutrophiles	41
	Les différentes Méthodes de diagnostic des endométrites.....	44
	L'examen général	44
	L'examen vaginal.....	44
	La palpation rectale.....	46
	L'examen échographique	48
	Biopsie.....	50
	Cytologie.....	52

Vaginoscopie, MetrichexR et palpation vaginale.....	54
Palpation transrectale.....	56
Bactériologie.....	56
Définition de l'examen cytologique	57
Méthodes de prélèvements	57
Matériel et méthodes de l'examen cytologique.....	57
Préparation des lames cytologiques.....	60
Coloration et lecture des frottis.....	60
Analyses statistiques	61
L'étude histologique	61
Fixation	61
Imprégnation.....	62
Inclusion	63
Coupe.....	64
Étapes préparatoires à la coloration	64
Séchage des lames.....	64
Déparaffinage.....	64
Coloration.....	65
Étapes préparatoires au montage	65
Déshydratation.....	65
Montage.....	65
Résultats et discussion	66
Étude cytologique	66
Cytologie comparée	66
Cellules épithéliales	66
Autres	67
Bactéries.....	68
Hématies	68
Description qualitative des populations cellulaires présentes sur les frottis Génitaux	68
Cytologie endométriale	69
Cytologie endocervicale	71
Cytologie vaginale	71
Cellules parabasales	72
Cellules intermédiaires	72
Les petites cellules intermédiaires.....	72

	Les grandes cellules intermédiaires.....	73
	Cellules superficielles	74
	Autres cellules	74
	Référence bibliographique	

Liste des abréviations :

%N :	Taux de neutrophiles
AMP :	Peptide antimicrobien
APP :	Proteine de phase aigue
ASAT :	Aspartate aminotransférase
BoHV4 :	Herpes virus bovin de type 4
CPK :	Creatinine phosphokinase
E2 :	OEstradiolemie
EIQ :	Ecart interquartile
IA :	Insemination artificielle
IC95% :	Intervalle de confiance a 95%
Ig :	Immunoglobuline
IGF1 :	Insulin growth factor 1
IVIF :	Intervalle velage–insemination fecondante
JPP :	Jours post-partum
LPS :	Lipopolysaccharide
MGG :	May-Grunwald-Giemsa
NEC :	Note d'état corporel
OR :	Odd ratio
P4 :	Progesteronemie
PAMP :	Pathogen-associated molecular patter
PGE :	Prostaglandine E
PGF :	Prostaglandine F

LISTES DES FIGURES

Figure N°1 : Coupe médiane du bassin d'une vache « Barone, 1990 »	4
Figure N°2 : Coupe de l'ovaire de la vache à différents stades « Derivaux et Ectors., 1985 ».	5
Figure N°3 : Conformation de l'utérus non gravide en vue dorsale	6
Figure N°4 : Vue dorsale de l'utérus, paroi vaginale ouverte et rabattue	6
Figure N°5 : Aspect histologique de l'utérus non gravide de la vache	8
Figure N°6 : Métrite aigue postpartum (vache) Année 2008-2009 Prof. Ch. Hanzen	18
Figure N°7 : Ecoulement trouble (Hanzen, 2009)	19
Figure N°8 : Ecoulement purulent (Hanzen, 2009)	19
Figure N°9 : Classification des endométrites cliniques « Sheldon et al. 2009	20
Figure N°10 : Relation entre le degré d'endométrite clinique et la présence de germes pathogènes « Shledon et al. 2009 »	21
Figure N°11 : Métrite chronique du 3ème degré (pyomètre) Année 2008-2009 Prof. Ch. Hanzen	23
Figure N°12 : Pyomètre (vache) Année 2008-2009 Prof. Ch. Hanzen	23
Figure N°13 : Metricheck	45
Figure N°14 : Principe de la mise en place de la sonde intravaginale Metricheck® « Mee, 2007 »	46
Figure N°15 : Palpation des cornes utérines à travers la paroi du rectum « Stevens et al., 1995 »	48
Figure N°16 : Image échographique d'un pyomètre (la ligne jaune identifie les contours de la paroi utérine et la ligne rouge le contour de la cavité utérine distendue) (Hanzen FMV Liège).	49
Figure N°17 Image échographique d'un corps jaune (le corps jaune est délimité par la ligne jaune, l'ovaire est délimité par la ligne rose, la ligne bleue délimité la vessie) (Hanzen FMV Liège).	50
Figure N°18 Image échographique d'un corps jaune (le corps jaune est délimité par la ligne jaune, l'ovaire est délimité par la ligne rose, la ligne bleue délimité la vessie)(Hanzen FMV Liège).	50
Figure N°19 : Matériel de biopsie Année 2008-2009 Prof. Ch. Hanzen	51
Figure N°20 : Matériel d'utilisation de la cytobrosse (L. Deguillaume, ENVA)	58
Figure N°21 : Prélèvements cytologiques sur matrice de vache.	59
Figure N°22 : Réalisation du frottis.	60
Figure N°23 : Casette d'inclusion.	62
Figure N°24 : Automate d'imprégnation.	63
Figure N°25 : Frottis cytologique. Coloration Giemsa (L. Deguillaume ENVA)	63
Figure N°26 : Cellules épithéliales de l'endomètre (grossissement 1000x)	65
Figure N°27 : Granulocytes neutrophiles (grossissement 1000x)	67
Figure N°28 : Les cellules épithéliales dans le frottis utérin (amas de cellules épithéliales) (grossissement.x 100, coloration May-Grünwald-Giemsa)	67
Figure N°29 : Frottis cytologique endométrial montre les PNN (flèche noire) avec un amas de cellule sépithéliales	70
Figure N°30 : Lymphocyte dans le frottis utérin	70

Figure N° 31 : Les cellules épithéliales (flèche orange) et de neutrophiles (flèche noire) dans les frottis de La muqueuse cervicale	70
Figure N°32 : Les cellules parabasales dans un frottis vaginal (grossissement. x 100, coloration MayGrünwald-Giemsa) (grossissement. x 100, coloration May-Grünwald-Giemsa).	71
FigureN° 33 : Frottis cytologique vaginal montre les petites cellules intermédiaires (flèche noire)(grossissement. x 100, coloration May-Grunwald-Giemsa)	72
Figure N°34 : Frottis cytologique vaginal montre les grandes cellules intermédiaires(Flèche bleu)(grossissement. x 100, coloration May-Grunwald-Giemsa)	73
FigureN°35 : Cellule superficielle kératinisée anucléé dans un frottis vaginal (grossissement. x 100,coloration May-Grünwald-Giemsa).	74

Résumé :

L'endométrite est responsable de trouble de la fertilité dans de nombreuses espèces.

Chez la jument, la cytologie endométriale est couramment employée pour la diagnostiquer, tandis que chez la vache et la chienne, cette technique est en cours de validation.

Le prélèvement des cellules endométriales s'effectue par lavage ou écouvillonnage utérin. Le taux de granulocytes neutrophiles sur le frottis est utilisé pour détecter l'endométrite, mais il n'existe aucun consensus sur le seuil à partir duquel l'on considère que l'affection est présente. La cytologie cervicale est peu employée et semble peu informative, alors que la cytologie endométriale est un examen valable au regard des performances de reproduction et de l'histologie. C'est pourquoi nous avons utilisé cet examen comme examen de référence pour notre étude, dont l'objectif est de déterminer la puissance des différentes techniques diagnostiques de l'endométrite dans l'espèce bovine.

Introduction

Introduction Générale:

La période peri-partum est considérée comme particulièrement importante dans la vie reproductive en raison de ses conséquences sur l'efficacité de la reproduction (involution utérine, démarrage de l'activité ovarienne, fertilité).

L'intégrité utérine en particulier est souvent altérée chez les vaches en raison de la contamination bactérienne qui est quasi systématique peu après le vêlage pendant et après la parturition, les germes de la région périnéale, environnementaux et fécaux, gagnent l'utérus par voie ascendante, car les barrières physiques naturelles telles que la vulve, le vestibule, le mucus et le col de l'utérus sont levées pendant le vêlage (**Bondurant, 1999**). quelques jours après le part, 90% des vaches présentent une contamination bactérienne in utero, les lochies présentes étant un excellent milieu de culture pour les micro-organismes (Foldi Et Al) ».néanmoins, il est nécessaire de distinguer contamination et infection de l'utérus. une infection implique l'adhérence des organismes pathogènes aux muqueuses, ainsi que la colonisation des épithéliums et éventuellement la libération de toxines conduisant à un état pathogène. L'infection dépend donc du statut immunitaire de l'animal, ainsi que de la virulence et de la quantité de germes présents dans l'utérus après le part (Sheldon Et Al, 2006). les germes les plus rencontrés lors d'infection utérine sont arcanobacterium pyogènes, Escherichia coli, fusobacterium necrophorum et bacteroides spp. (Dohmen Et Al, 1995). e.coli est détecté tôt après le vêlage, et faciliterait l'implantation des autres germes après préparation du terrain pathologique, notamment a. Pyogènes, responsable des infections les plus sévères (Dohmen Et Al, 1995). L'herpes virus 4 (bhv-4), répertorié comme le seul virus associé aux infections utérines (Sheldon Et Al, 2009b), serait également impliqué, une fois que les bactéries sont implantées. (Donofrio Et Al, 2008)

La prévalence des contaminations utérines est négativement corrélée au délai post-partum (Foldi Et Al, 2006 ; Gautam Et Al, 2009), car une vache normale devrait retrouver un utérus stérile après 40 à 50 jours post partum (jpp), qui correspondent au délai d'involution utérine : retour de l'utérus à un état prégravidique autorisant l'implantation d'un nouveau conceptus. (Darras, 2003 ; Sheldon Et Al, 2009)

La fermeture du col, la barrière que constitue l'épithélium pseudo stratifié, le mucus sécrété par les glandes endométriales, l'action des polynucléaires neutrophiles (pnn) et des anticorps sont censés être suffisamment efficaces pour assurer un retour à l'état pré gravidique et une absence de recontamination (Sheldon et al, 2006a ; azawi, 2008 ; singh et al, 2008).

Mais plusieurs facteurs viennent perturber l'élimination de la contamination bactérienne initiale (Bencharif Et Tainturier, 2005) Tout d'abord, une baisse de la fonction et du nombre de polynucléaires neutrophiles en période péri-partum prédisposeraient l'utérus à une infection (Kim et al, 2005 ; singh et al, 2008).

Les traumatismes des tissus génitaux lors de manipulation au moment du vêlage ,les dystocies, ou les défaillances du système immunitaire consécutives à un déficit énergétique sont autant de facteurs qui peuvent venir perturber le retour de l'utérus à un état stérile. (Sheldon Et Al, 2006a ; Azawi, 2008)Les contaminations utérines persistent ainsi chez 15 à 20% des vaches environ, (Sheldon Et Al, 2006a ; Herath Etal, 2009) plus ou moins longtemps. on parle alors d'infections utérines, appelées, au-delà de 21 jours post-partum, endométrites cliniques ou subcliniques.les infections de l'utérus sont très étudiées, mais de nombreuses imprécisions sont à déplorer dans la littérature comme dans la pratique, dans les termes de base tels que les définitions des affections, les méthodes et les critères de diagnostic, ainsi que les traitements. Le flou autour des définitions a été éclairci, suite au **15^{ème}** congrès international sur la reproduction animale en **2004**, où plusieurs chercheurs ont décidé de proposer un ensemble de définitions qui devraient permettre une meilleure homogénéité des études.

CHAPITRE I:

Anatomie Et Histologie De L'appareil
Genitale Femelle

I. Anatomie:

L'appareil reproducteur femelle comprend :

Deux gonades ou ovaires ayant une double fonction, l'élaboration des gamètes femelles et la synthèse d'hormones femelles ;des voies génitales : l'oviducte lieu de fécondation, l'utérus organe de gestation, le vagin et la vulve organes d'accouplement.

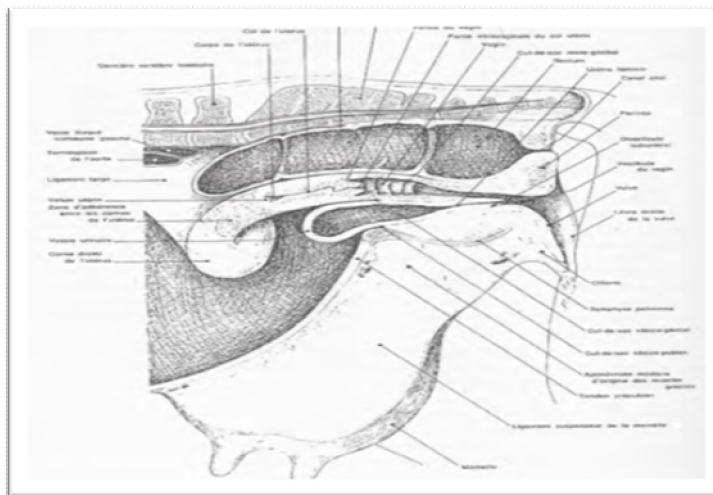


Figure N°1 : Coupe médiane du bassin d'une vache « Barone, 1990 »

1. Ovaires :

Est la glande génitale de la femelle. C'est un organe pair, appendu à la région lombaire et pourvu d'une double fonction : gamétogénèse, assurant l'ovogénèse, et endocrine, commandant (sous le contrôle de l'hypophyse) toute l'activité génitale par la sécrétion des hormones œstrogènes et progestatives. (Barone., 1978)

Chez la vache, ils sont petits, ovoïdes, de taille variable selon l'âge et les stades du cycle œstral, (Derivaux et Ectors., 1985) chaque ovaire a la forme d'une amande de **4 cm** de longueur sur **2.5 cm** de largeur et **1.5cm** d'épaisseur. (Christiandudouet., 2010) De consistance ferme, leur forme est irrégulièrement bosselée par les structures telles que follicules à divers degrés de développement et corps jaunes. La coupe de l'ovaire permet d'observer ces organites spécifiques qui correspondent à l'évolution depuis le follicule primordial jusqu'au follicule mûr qui produira l'ovocyte. Après ovulation, ce follicule va se transformer

En corps jaune qui régressera plus ou moins rapidement en fonction de la fécondation ou non fécondation « **Derivaux et Ectors., 1985** ».

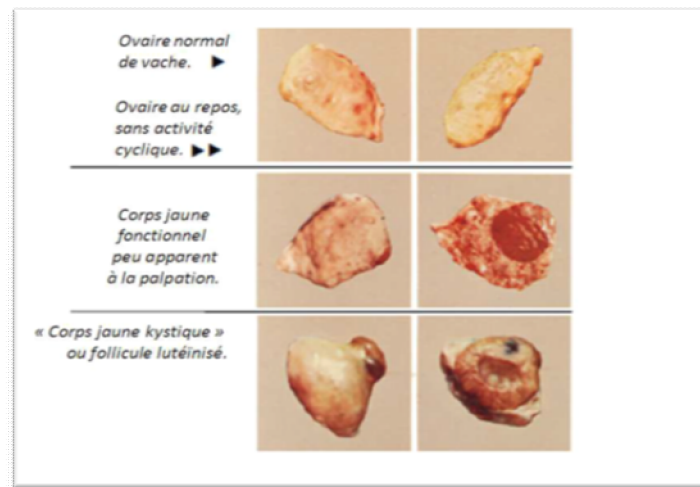


Figure N°2: Coupe de l'ovaire de la vache à différents stades

« Derivaux et Ectors., 1985 ».

2. Tractus Génital :

2.a .Oviducte ou trompe utérine :

C'est un conduit qui a pour rôle de recueillir l'ovule et de le conduire après fécondation vers l'utérus.

À chaque ovaire correspond un oviducte plus ou moins flexueux, situé sur le bord du ligament large. Il débute par le pavillon ou infundibulum indépendant de l'ovaire, qui a la forme d'un entonnoir ouvrant dans la bourse ovarique et pouvant s'appliquer contre le bord libre de l'ovaire pour recueillir les gamètes femelles lors de l'ovulation. Le conduit lui-même comprend trois parties:

- l'ampoule, où a lieu la fécondation, rencontre et fusion de l'ovule et du spermatozoïde ;
- l'isthme de calibre réduit ;

-la jonction utéro-tubaire, zone de jonction de l'oviducte et de la corne utérine correspondante. (Batellier et al. 2005) De plus, l'oviducte ne possède une grande variabilité en longueur selon les espèces. Chez le bovin, il mesure approximativement de **21 à 28 cm** de longueur (Ellington., 1991)

2. b. Utérus ou matrice :

Organe de la gestation, il comprend trois parties chez tous les ongulés :

Deux cornes qui fusionnent sur une plus ou moins grand longueur pour former le corps de l'utérus ;

les cornes et le corps de l'utérus, qui sont toujours situés dans l'abdomen sur le bord du ligament large ; le col ou le cervix , qui est situé sur le plancher de la cavité pelvienne. (Batellier et al, 2005)

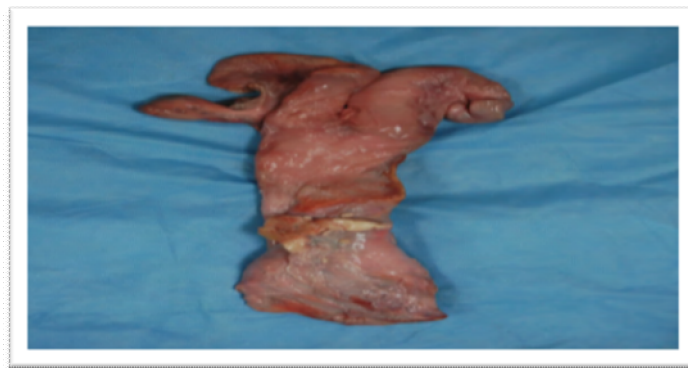


Figure N°3: Conformation de l'utérus non gravide en vue dorsale

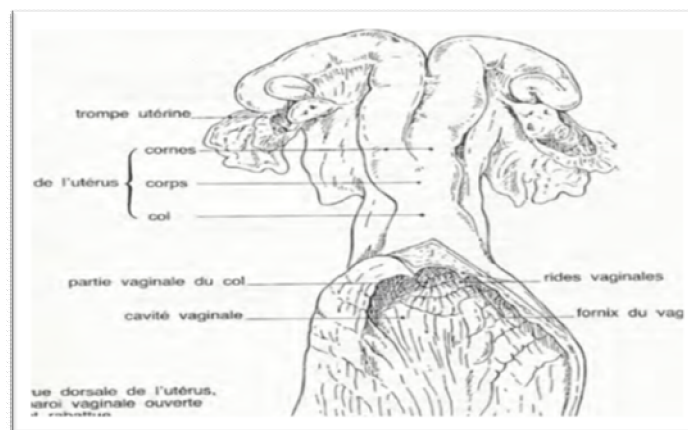


Figure N°4: Vue dorsale de l'utérus, paroi vaginale ouverte et rabattue (coche, 1987)

2. c. Col de l'utérus :

Le col de l'utérus ou cervix est peu discernable en surface.

A peine est-il un peu étroit que les parties qu'il sépare, ou seulement délimité par des strictions minimales. Il est en général plus cylindroïde que le corps utérin et la grande épaisseur de sa paroi permet de reconnaître sans peine à la palpation (Barone., 1978)

2. d. Vagin :

C'est conduit impair et médian. Entièrement logé dans la cavité pelvienne, il est en quelque sorte annexé au sinus uro-génitale pour constituer avec lui l'organe copulateur de la femelle (Barone., 1978).C'est l'endroit où la semence est déposée lors de la saillie. (baril et al. 1993)

2. e .Sinus uro-génital :

Partie commune aux appareils urinaires et génitaux. Il est divisible en deux segments différents parla topographie et la structure : vestibule du vagin et la vulve et le clitoris.

Le vestibule du vagin est conduit large et impair, dans l'extrémité crâniale duquel s'ouvrent l'ostium vaginal et l'ostium externe de l'urètre, tandis que la partie opposée communique avec l'extérieur par la fente de la vulve. la vulve est la partie externe de l'appareil génitale femelle. Elle occupe la partie ventrale du périnée. Elle est constituée par deux lèvres qui délimitent la fente vulvaire. Les deux lèvres de la vulve sera accordent sur deux commissures dorsales et ventrales

I. Histologie :

1. Histologie de la trompe utérine :

La trompe utérine comporte quatre tuniques : séreuse, sous-séreuse, musculuse et muqueuse, auxquelles s'ajoutent les vaisseaux et les nerfs (kühnel., 2003).

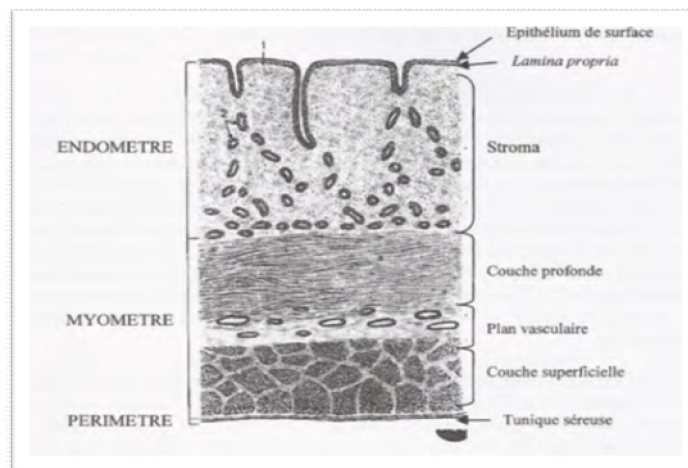


Figure N°5 : Aspect histologique de l'utérus non gravide de la vache (pavaux, 1981)

1. a -Séreuse et sous-séreuse :

La tunique séreuse est représentée par les deux lames péritonéal qui constituent le mésosalpinx, entre les quelles se loge le conduit. Elle tapisse donc celui-ci sur ses faces latérale et médiale sans lui constitué un revêtement complet. Elle se raccorde sans transition à la muqueuse sur le bord libre des franges de l'infundibulum. La sous-séreuse est formée d'un conjonctif riche en fibres collagènes et mêlé de fibres musculaires lisses qui s'irradient de la musculouse dans le mésosalpinx. (barone., 1978)

1. b- Musculaire :

Dans la trompe utérine, la couche longitudinale est faible et souvent discontinue, plus ou moins irradiée dans le mésosalpinx ; elle n'épouse les flexuosités que de façon approximative et ses faisceaux passent souvent directement de l'une à l'autre. La couche circulaire est au contraire bien développée, continue, et constitue en quelque sorte l'armature du conduit. Quant à la couche moyenne, elle est simplement représentée par une faible nappe de tissu conjonctif qui loge un lâche plexus vasculaire : c'est le stratum vasculaire. Réduite à quelques fibres éparses dans l'infundibulum, cette musculature est encore mince et parfois incomplète dans la région ampullaire mais y présente déjà son organisation caractéristique. Dans la région de l'isthme, elle devient de plus en plus forte, surtout par sa couche circulaire, qui est épaisse et dense.

1. c. Muqueuse :

La muqueuse est constituée de deux sortes de tissus: la lamina propria (couche basale) et la lamina epithelialis (couche épithéliale). (rafez et blandau., 1969) La muqueuse des trompes utérines étant, comme celles de l'utérus et du vagin, sapropria tient lieu de sous-muqueuse par sa partie profonde, qui adhère de façon directe et intime à la musculature. Riche en capillaires sanguins et lymphatiques, cette lamina propria se soulève avec l'épithélium dans la lumière du conduit pour former les plis tubaires, longitudinaux et saillants. Ces plis sont beaucoup plus nombreux et pour la plupart plus compliqués dans l'ampoule que dans l'isthme et la partie utérine, où ils deviennent plus bas, plus épais et plus simples. (yaniz et al. 2000)

L'épithélium ne forme nulle part d'invagination glandulaire. Il est de type colonnaire, simple ou pseudo-stratifié et comporte deux sortes de cellules, les unes ciliées et les autres non ciliées. Les cellules ciliées possèdent un noyau arrondi situé vers le milieu de leur hauteur, de nombreuses mitochondries allongées dans la partie supra nucléaire du cytoplasme, des microvillosités et des cils saillants dans la lumière du conduit. Les cellules non ciliées sont en presque la totalité des cellules glandulaires. Celles-ci ont un grand noyau central, ovalaire ou allongé, souvent indenté, et un cytoplasme granuleux, plus éosinophile que celui des cellules ciliées. Leur extrémité apicale est pourvue de microvillosités et forme souvent des reliefs en ballons ou des extrusions dans la lumière du conduit (barone,1978) Deux autres types cellulaires ont été décrits dans l'épithélium tubaire, les cellules intercalaires et les cellules basales de réserve. La cellule intercalaire est couramment considérée comme une cellule sécrétrice épuisée, et les cellules basales de réserve ont été confondues avec des cellules intra épithéliales de la lignée lymphoïde (stevens et lowe ;2006) Les cellules ciliées et les cellules glandulaires sont en nombre à peu près égal mais leur répartition n'est pas uniforme. Les premières sont particulièrement nombreuses près de l'extrémité ovarienne de la trompe, dans l'infundibulum et dans l'ampoule, où elles constituent la majorité de la population cellulaire, elles deviennent plus rares dans l'isthme les secondes sont au contraire moins nombreuses dans l'ampoule mais dominent nettement dans l'isthme, surtout au voisinage de l'utérus.

2. Histologie de l'utérus :

La paroi utérine comporte trois tuniques ainsi disposées de la lumière vers la périphérie: une muqueuse ou endomètre, une musculuse ou myomètre, et une séreuse ou périmètre.(banks., 1993)

2. a. Séreuse ou périmètre :

Sa structure est identique à celle de la séreuse de l'oviducte. Enre vanche,elle comporte quelques cellules musculaires lisses et peut être considérée comme l'expansion des ligaments larges qui soutiennent l'utérus dans la cavité abdominale.(priedkalns et leiser., 1998; vaissaire., 1977)

2. b. Musculaire ou myomètre :

La musculuse est composée de deux couches concentriques de cellules musculaires lisses : une couche profonde interne, la plus épaisse, composée de fibres musculaires lisses circulaires qui sont particulièrement renforcées au niveau du col, et une couche superficielle externe constituée de faisceaux de fibres musculaires lisses longitudinales qui augmentent en nombre et en taille au cours de la gestation.(priedkalns et leiser., 1998) Une couche vasculaire est intercalée entre ces deux couches musculaires. Elle comporte un important plexus vasculaire et lymphatique, des faisceaux de fibres élastiques et de fibres nerveuses.

L'ensemble du myomètre se montre sensible aux actions hormonales. Son épaisseur s'accroît sous l'influence des œstrogènes ; elle se réduit après la castration. Le nombre et le volume des fibres lisses augmentent beaucoup pendant la gestation. Les contractions de cette musculature interviennent pour répartir les conceptus dans les espèces où ils sont multiples .Elles déterminent aussi leur expulsion lors de la parturition. On leur attribue d'autre part un rôle dans l'ascension des spermatozoïdes : pendant la copulation, elles resserrent le cavum utérin et en expulsent le mucus ; le relâchement qui se produit aussitôt après entraîne l'aspiration du contenu vaginal.(barone., 1978)

2. c. Muqueuse ou endomètre :

L'endomètre est désigné la muqueuse qui tapisse le corps et les cornes utérines. Cette muqueuse comporte un épithélium de surface et un stroma, séparés par une mince membrane basale, la lamina propria .L'épithélium est colonnaire, en général simple ; il peut être cubique dans les périodes d'œstrus ou diœstrus. Dans les ruminants il est pseudo-stratifié par endroits. Il est séparé du chorion sous-jacent par une épaisse membrane basale appelée lamina propria . (deletang., 2004) Il comporte deux types de cellules irrégulièrement mêlée, les unes ciliées, pourvues d'un noyau ovalaire ou sphéroïde, les autres non ciliées, de type sécrétoire et à noyau plus étroit et allongé. La proportion des deux types varie selon les endroits et les périodes, comme dans la trompe utérine. On peut noter que les cellules ciliées sont très peu nombreuses jusqu'à la puberté, plus abondantes chez l'adulte et qu'elles se raréfient dans l'œstrus et le métœstrus .Le stroma endométrial est épais. Il comprend trois éléments principaux : des fibres de collagène, des cellules en provenance du sang (lymphocytes, granulocytes, plasmocytes) et des glandes utérines. Ces glandes sont tubulaires, bordées par un épithélium simple en continuité avec l'épithélium de surface mais dont les cellules ont une activité sécrétrice supérieure. (Derivaux., 1981)

Les glandes utérines sont tubulaires, simples ou peu ramifiées et leur épithélium est semblable à celui de la surface endométriale. Elles sont à peine ébauchées chez le nouveau-né, où elles sont représentées par de simples et courtes invaginations de l'épithélium superficiel dans un stroma encore presque entièrement cellulaire. Elles deviennent plus profondes et flexueuses à l'approche de la puberté, où elles sont commandées par l'activité ovarienne.

Dans les périodes de repos (œstrus et diœstrus) elles sont peu serrées, à peine sinueuses, sauf dans leur partie profonde, qui est plus flexueuse et atteint le voisinage du myomètre. Leur épithélium est cubique ou colonnaire bas et leur lumière étroite, encombrée de débris. Au cours du proœstrus, elles s'allongent, se ramifient et deviennent flexueuses.L'endomètre s'épaissit et elles s'y enfoncent au point que leurs extrémités profondes, très contournées s'insinuent entre les faisceaux de la partie adjacente du myomètre.

Elles s'élargissent et leur épithélium devient plus haut. Les cellules de celui-ci se multiplient et prennent des caractères sécrétoires manifestes. Cette évolution s'accroît fortement lors de l'œstrus et atteint sa plénitude dans le métœstrus. L'endomètre passe

alors par une phase sécrétoire active qui prend fin vers le début du dioestrus. Dans ce dernier, les glandes redeviennent peu flexueuses, plus courtes et plus étroites. Leur épithélium perd ses caractères sécrétoires et reprend le type colonnaire bas et cubique. (barone., 1978)

3. Histologie du cervix :

Il comporte trois couches : séreuse, musculuse et muqueuse.

3. a- Séreuse:

Est constituée : d'une couche épaisse de tissus conjonctif lâche et des vaisseaux sanguins.(Breeveld-dwarkasing et al ., 2003)

3. b-Musculaire:

est constituée de: Couche de muscles longitudinaux externes, apparaissant sous forme d'une assisediscontinue dont les interstices sont occupés par du tissu conjonctif. Une épaisse couche de muscles circulaires internes, assemblés en faisceaux compactsqui s'anastomosent, enserrant un tissu conjonctif dense.

3. c - Muqueuse :

La muqueuse est plus mince que celle de l'endomètre proprement dit. Les plis longitudinaux de la muqueuse sont subdivisés finement et leur paroi délimite des dépressions irrégulières, larges et plus ou moins profondes, où s'accumule le mucus qui est sécrété par toutes les parties de l'épithélium), surtout lorsque les glandes font défaut. Sa production augment beaucoup dans l'œstrus et il semble alors avoir pour rôle de favoriser la progression des spermatozoïdes. Ses caractères changent dans la gestation : il devient plus visqueux et forme une sorte de gelée qui constitue un véritable bouchon cervical (Iüllmannrauch. 2008. Dellmann et eurrell., 1998).

Son épithélium est colonnaire simple, avec seulement un petit nombre de cellules ciliées et des mucocytes. Les noyaux sont ovalaires et basaux et le cytoplasme riche en gouttelettes de mucus. Au niveau de l'ostium externe de l'utérus (exo col), l'épithélium cervical se raccorde de façon brusque à celui du vagin, pavimenteux stratifié non kératinisé (Iüllmann-rauch., 2008). La propria mucosæ est dense, moins riche en cellules

que celle de l'endomètre proprement dit. Elle est pourvue de nombreuses fibres collagène qui donnent sa consistance ferme et se retrouvent jusque entre les faisceaux les plus profonds de la musculature. Ces fibres sont susceptibles de se gonfler fortement sous l'influence des hormones ovariennes et contribuent avec l'invasion œdémateuse à modifier la consistance et l'aspect du col au cours de l'œstrus.

La vascularisation est moins dense que dans l'endomètre proprement dit. (Barone., 1978)

Les glandes cervicales existent dans l'espèce humaine et parmi les mammifères domestiques, seulement chez les petits ruminants, la truie et la chatte. Elles sont tubuleuses, simples et peu nombreuses chez ces animaux alors qu'elles sont plus nombreuses et ramifiées chez la femme. Leur épithélium est identique à celui de la surface mais les mucocytes y sont plus abondants.

Elles présentent de discrètes variations au cours des cycles sexuels (Aughey et Frye. 2001).

4. Histologie du vagin :

La paroi du vagin est formée de trois couches d'inégale importance. La plus superficielle est polymorphe : elle est constituée crânialement par péritoine et sa sous-séreuse et caudalement par une adventice. Plus profondément viennent une musculuse et une muqueuse (wheater et al, 2001).

4. a. Séreuse et adventice :

La séreuse est formée par péritoine viscéral.

Elle est doublée d'une sous- séreuse lâche, qui permet sa mobilité. Cette couche conjonctive mêlée de fibres élastiques se densifie caudalement au péritoine pour former l'adventice. Celle-ci adhère intimement à la musculuse et se dissocie extérieurement pour se mettre en continuité avec le conjonctif rétro péritonéal ambiant. Elle abrite les riches plexus vasculo-nerveux péri vaginaux .

4. b. Musculeuse :

Le muscle vaginal est relativement mince, de teinte rosée, traversé par de nombreux vaisseaux et nerfs.

Il est mêlé d'un conjonctif inter fasciculaire abondant, continu avec l'adventice.

On y retrouve en principe la même disposition générale que dans la musculature des trompes et de l'utérus, mais il est souvent difficile de délimiter les trois couches.

Les fibres superficiels ont une orientation générale longitudinale, mais beaucoup deviennent obliques pour passer d'un côté à l'autre, ou d'une face à l'autre sur les côtés.

Des multiples faisceaux s'irradient dans l'adventice pour se porter soit vers le rectum soit vers la vessie.

Le plan moyen est peu distinct, simplement représenté par l'important plexus vasculaire, principalement veineux, logé dans la musculeuse. Quant à la couche profonde, elle est circulaire, continue avec les fibres les plus externes du col de l'utérus et renforcée caudalement, où sa disposition devient plus nettement sphinctérielle. Dans quelques espèces (truie, carnivores), quelques faisceaux longitudinaux se développent en outre à sa face profonde, en rapport avec la muqueuse.

4. c. Muqueuse :

La muqueuse vaginale est relativement mince. Elle se raccorde par un changement de structure en général assez brusque à celle du col utérin. Il existe pourtant dans diverses espèces (vache, lapine) une zone de transition qui occupe le fornix.

Chez la vache, l'épithélium devient à ce niveau stratifié et pavimenteux, en conservant une assise superficielle colonnaire mêlée de quelques cellules à mucus (Aughey et frye., 2001). La propria est un conjonctif dense, mêlé de fibres élastiques et souvent infiltré de lymphocytes. Ceux-ci s'accumulent en certains points, surtout dans la partie caudale de l'organe, pour former des lympho-nodules. Sauf rare exception, mentionnées plus loin, on n'y rencontre aucune glande. Enfin, dans les parties les plus caudales, la propria tend à former des élevures papilliformes dans l'épithélium.

L'épithélium est pavimenteux stratifié. Ses cellules, polyédriques en profondeur, deviennent plus plates en surface et peuvent prendre un aspect monoïde.

Dans certaines espèces (vache) de véritables cellules à mucus s'y mêlent localement. On peut en outre y rencontrer quelques cellules migrantes. Il est bas, formé de **3, 4** ou **5** assises cellulaires dans les périodes d'œstrus et de diœstrus. Il devient au contraire épais, avec un nombre accru d'assises cellulaires (**8 à 12**) lors de l'œstrus, où il desquame abondamment (barone., 1978). On peut enfin noter que l'épithélium vaginal peut déléguer dans la profondeur quelques cordons cellulaires pleins, parfois même creusés d'une faible lumière centrale. Ces prolongements, qui évoquent des rudiments de glandes, ne sont pas fonctionnels. (barone., 1978 ; stevens et lowe., 2006)

CHAPITRE II :

Physio-pathogénie des endométrites

I. Les définitions cliniques :

1. La métrite puerpérale (ou aigüe) :

Elle se définit comme une infection utérine se manifestant au cours des 21 premiers jours du postpartum. Encore appelée lochiomètre, métrite septicémique, métrite toxique, elle fait le plus souvent mais pas nécessairement suite à une rétention placentaire ou à un accouchement dystocique et se traduit habituellement par des symptômes généraux plus ou moins importants tels une perte d'appétit, une diminution de la production laitière, le maintien ou l'augmentation de la température au dessus de **39.5°C**, de l'acétonémie, des arthrites, un état de déshydratation, un déplacement de la caillette, une infection mammaire...Mais également des symptômes locaux .L'écoulement brunâtre au début, devient nettement purulent blanc jaunâtre, épais et malodorant (sanies) voire couleur lie de vin en cas de métrite gangréneuse. Rarement discret, il attire très vite l'attention de l'éleveur car il souille la région génitale et s'accumule en flaques en arrière de la vache. Le frémus de l'artère utérine persiste le plus souvent jusqu'à l'expulsion du placenta. L'utérus involué lentement, reste distendu pendant plusieurs jours voire semaines. Sheldon (Defining postpartum uterine diseases and the mechanisms of infection and immunity in the female reproductive tract in cattle (Biol reprod 2009, 81, 1025-1032) .distingue trois degrés de métrite aigüe. Le degré 1 se caractérise par une distension de l'utérus et des écoulements purulents sans que l'animal ne présente de symptômes généraux. La métrite de degré **2** s'accompagne de symptômes généraux : la température est supérieure à **39,5 °C**, la production laitière diminue, la vache est abattue. La métrite de degré **3** s'accompagne d'un état de toxémie, comme l'inappétence, les extrémités froides, un état de dépression. Le pronostic est assombri. Dans certaines exploitations, les endométrites aiguës revêtent un caractère enzootique ce qui en aggrave nettement le pronostic. La connotation gangréneuse de l'endométrite est plus souvent observée en cas de présence de *Clostridium perfringens*. Ce type d'endométrite se distingue essentiellement par de l'hyperthermie (**> 39,5°C**), une odeur fétide des écoulements et son délai précoce d'apparition après le vêlage (**4 à 21 jours**). (földi et al. 2006, paisley et al. 1986, hussain 1989, hussain et daniel 1991, lewis 1997, dohmen et al. 2000, sheldon et dobson 2004, sheldon et al. 2006)

L'endométrite puerpérale : peut s'accompagner d'une réduction de la folliculogénèse au cours des 12 premiers jours du post-partum. En effet, le traitement de génisses normalement cyclées au moyen d'endotoxine colibacillaire, ne s'accompagne pas d'une augmentation

normale de l'œstradiol en phase pré ovulatoire. Il se pourrait donc que la libération de cortisol induite par le traitement inhibe la synthèse d'œstradiol et contribue à augmenter la fréquence de follicules kystiques, la libération normale de la LH étant empêchée (Peter et al. 1990).



FigureN°6 : Métrite aiguë postpartum (vache) Année 2008-2009 Prof. Ch. Hanzen

2. Les endométrites :

Métrite et endométrite Ce sont des inflammations de la muqueuse utérine qui apparaissent après 21 jours post-partum, et sont souvent citées comme cause du syndrome repeat-breeding, qui concerne les vaches non gestantes après trois inséminations ou plus et avec des chaleurs normales.(Ferreira et al. 2002)

Les endométrites apparaissent au-delà de 21 jpp (sheldon et al. 2006) avec une symptomatologie plus discrète. Deux formes d'endométrite sont à distinguer : les formes cliniques et les formes sub-cliniques. Une endométrite clinique se caractérise par la présence d'écoulements purulents ou mucopurulents dans le vagin, à partir de **21** jours post-partum et sans signes systémiques. Une endométrite subclinique est définie comme une inflammation superficielle de la muqueuse utérine au delà de **21** jours post-partum. Malgré l'absence de signes extérieurs, ces formes uniquement cytologiques sont à l'origine d'une détérioration des performances de reproduction .Actuellement, le diagnostic des endométrites subcliniques est réalisé par lecture d'un frottis endométrial, mais cet examen présente des difficultés techniques et n'est pas fait en routine. Un frottis endo cervical semble être une option plus réalisable car il ne nécessite pas de cathétérisme du col utérin, ce qui peut se révéler compliqué chez la vache quand le col est fermé, la configuration anatomique de cet organe rendant le passage difficile. Cette étude a pour but

d'évaluer s'il serait possible de remplacer un frottis endométrial par un frottis endocervical, pour faciliter le diagnostic des endométrites subcliniques sur le terrain.

Il s'agit donc d'examiner l'homogénéité de l'inflammation dans le tractus génital femelle bovin et plus particulièrement la concordance entre les niveaux d'inflammation endométriaux et cervicaux



Figure N°07 : Ecoulement trouble (Hanzen, 2009)



Figures N°08 : Ecoulement purulent (Hanzen, 2009)

2. a- L'endométrite clinique :

Ce type d'infection utérine se caractérise par l'absence habituelle de symptômes généraux (Leblanc et al. 2002, Sheldon et Noakes 1998). Elle se détecte au-delà des trois premières semaines du postpartum. L'involution utérine et cervicale est ou non complète. Ce type d'infection s'accompagne d'écoulements purulents, mucopurulents ou de flocons de pus voire de mucus trouble. L'inflammation se caractérise par un œdème, une congestion de la muqueuse utérine et une importante infiltration leucocytaire. Une corrélation significative a été démontrée entre le grade de l'endométrite clinique et l'identification dans l'écoulement de germes pathogènes. Sur une coupe anatomopathologique, on peut observer des zones de desquamation avec atteinte dégénérative des zones glandulaires, une infiltration de l'épithélium superficiel, une dilatation ou une hypoplasie des glandes et de la fibrose péri glandulaire. Ce type d'infection fait ou non suite à une endométrite puerpérale.

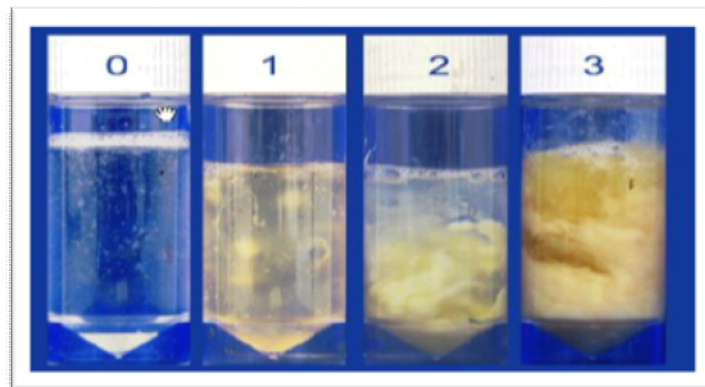
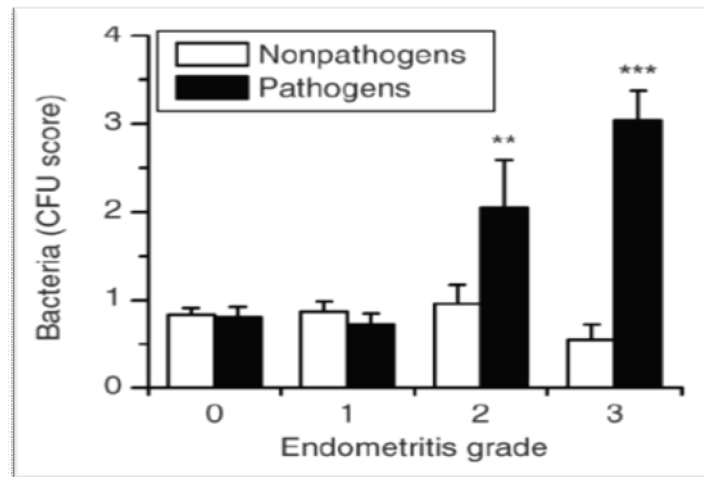


Figure N°09 : Classification des endométrites cliniques « Sheldon et al. 2009 ».

Grade 1 : flocons de pus,

Grade 2 : écoulement muco-purulent (moins de 50 % de pus dans l'écoulement),

Grade 3 : écoulement renfermant > 50 % de pus



FigureN°10 : Relation entre le degré d'endométrite clinique et la présence de germes pathogènes « Shledon et al. 2009 »

L'absence de manifestations générales implique pour le diagnostic le recours à des méthodes telles la palpation manuelle du tractus génital (Studer et Morrow 1978), l'examen vaginal (LeBlanc et al. 2002, Miller et al. 1980), l'examen bactériologique d'un prélèvement utérin (Bretzlaff 1987), l'examen anatomopathologique d'une biopsie utérine (Bonnett et al. 1991a, 1991b, 1991) ou l'examen cytologique d'un prélèvement utérin. (Gilbert et al. 1998)

L'impact possible des endométrites cliniques sur le risque d'apparition de kystes ovariens a été observé dans la cadre d'une étude épidémiologique. (Grohn et al. 1990) De même, la présence de lésions endométriales d'origine bactérienne peut également être responsable d'un raccourcissement du cycle, phénomène imputé à une libération prématurée de prostaglandines au cours du cycle (Peter et Bosu 1987) sous l'effet des endotoxines bactériennes (Biberstein 1990). Cette synthèse de prostaglandines peut également entraîner une dépression temporaire de la synthèse de progestérone suffisante pour induire dans certains cas une mortalité embryonnaire précoce ou tardive voire un avortement.

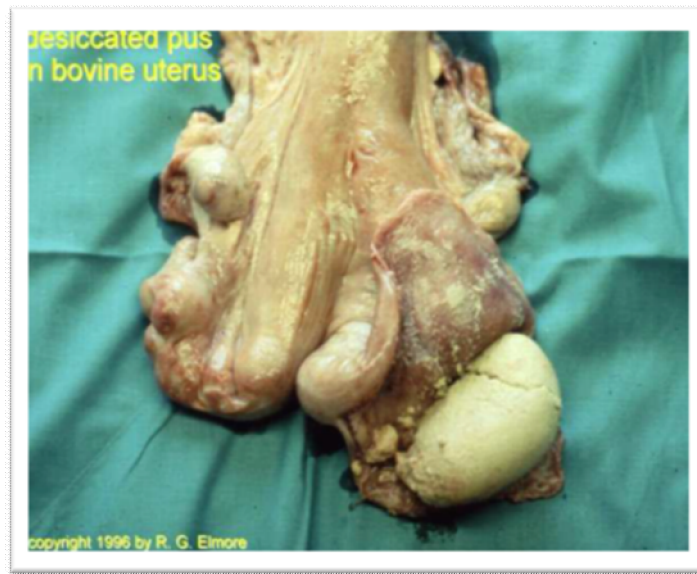
2. b-L'endométrite subclinique :

L'endométrite subclinique se traduit par la présence d'un état inflammatoire de l'endomètre en l'absence de sécrétions anormales dans le vagin Elle apparaît après l'involution histologique complète de l'utérus. Elle se traduit par une quantité minimale voire une absence d'exsudat dans la cavité utérine. L'état inflammatoire de l'endomètre n'est pas

macroscopiquement décelable. Il implique le recours à un examen complémentaire visant à déterminer la quantité de neutrophiles dans la cavité utérine. Le pourcentage de neutrophiles serait supérieur respectivement à **18 %**, **10 %**, **8 %** et **5 %** selon que les prélèvements utérins ont été réalisés **21 à 33**, **34 à 47**, **28 à 41** ou **40 à 60** jours post-partum. Ce type d'infection se traduit par une diminution des performances de reproduction des vaches « **Sheldon et al. 2006**, **Kasamanickam et al. 2004**, **Gilbert et al. 2005**, **Foldi et al. 2006**, **Parlevliet et al. 2006** » (Roberts 1986, Noakes et al. 1990, Foldi et al. 2006, Ott et Gustafsson 1981, Bondurant 1999, Sheldon et Dobson 2004, Sheldon et al. 2006). En l'absence de traitement, la présence d'une endométrite identifiée entre le 28ème et le 40ème jour du post-partum sur base d'un examen cytologique au moyen d'une cytobrosse, se traduit par une augmentation de **25** jours de l'intervalle entre le vêlage et l'insémination fécondante, la période d'attente étant comparable. Elle s'accompagne d'une diminution de **17,9 %** du taux de gestation (Barlund et al. 2008).

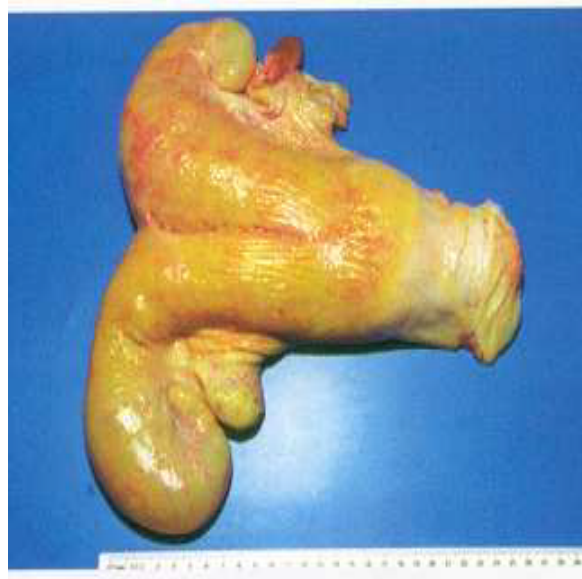
3. Le Pyomètre :

Le pyomètre correspond à l'accumulation de pus dans la cavité utérine. Cette accumulation est le plus souvent associée à un corps jaune fonctionnel et à une fermeture complète ou partielle du col utérin. Elle apparaît habituellement après la première ovulation. L'utérus est distendu et le devient progressivement plus de façon uni ou bilatérale. L'écoulement purulent est plus ou moins permanent selon le degré d'ouverture du col. L'animal présente de l'anœstrus. L'épithélium et les glandes sont fibrosées. Dans de plus rares cas, le pyomètre peut s'accompagner de répercussions sur l'état général (amaigrissement, péritonite...). En l'absence presque totale des cellules endométriales, la synthèse de prostaglandines n'est plus possible, l'animal présente alors de l'anœstrus résultant de la persistance du corps jaune. Le mécanisme exact de cette observation reste néanmoins à démontrer. En effet la concentration utérine en prostaglandines de type F ou E et plasmatique en métabolites des prostaglandines des vaches atteintes de pyomètre est plus élevée que chez des vaches normales (Manns et al. 1985). Il se pourrait donc que le transport normal de la **PGF2** lutéolytique soit modifié ou que l'action de la PGE lutéotrophique soit excessive.



FigureN°11 : Métrite chronique du 3ème degré (pyomètre) Année 2008-2009

Prof. Ch. Hanzen



FigureN°12 : Pyomètre (vache) Année 2008-2009 Prof. Ch. Hanzen

II- Physiopathologie comparée de col et l'utérus

1. Au cours de post-partum :

1. a - Contamination initiale :

Au cours de la gestation, le canal cervical est obturé par un bouchon muqueux, obstacle vis-à-vis des contaminations extérieures. Ce bouchon muqueux est expulsé dans les tout premiers temps du part, autorisant ainsi la colonisation de la cavité utérine par des bactéries d'origine périnéale. Ces bactéries remontent alors le tractus génital, on parle décontamination ascendante. Suite au vêlage, une contamination bactérienne de la lumière de l'utérus est présente chez plus de **90%** des vaches dans les deux premières semaines post-partum. Cette infection est physiologique et normalement transitoire dans l'utérus de la vache. Vers **6-7** semaines post-partum, les défenses immunitaires utérines ont normalement éliminé la contamination bactérienne et la cavité utérine redevient stérile (Elliott et al., 1968). La flore bactérienne intra-utérine post-partum est variée et propre à chaque animal, mais il y a tout de même des bactéries plus fréquemment identifiées : *Escherichia coli*, *Arcanobacterium pyogènes*, des *Enterobacteriaceae*, *Fusobacterium sp.* Et *Bacteroides sp.* Ces bactéries sont souvent associées dans la lumière utérine. (Dhaliwal et al., 2001)

Normalement en post-partum l'infection utérine est résolue par l'involution rapide du

Col et du corps utérin, l'élimination du contenu utérin et la mobilisation des défenses naturelles de l'hôte. Dans ce cas les bactéries sont progressivement éliminées pendant les six premières semaines suivant le part. Il existe plusieurs niveaux de défense contre cette contamination : anatomique, chimique et immunologique. (Azawi, 2008) Tout d'abord, les barrières anatomiques principales entre l'environnement contaminé et le milieu utérin sont la vulve, le vestibule du vagin et le col utérin. La vulve prévient très efficacement la contamination fécale du tractus génital. Le col utérin, composé d'anneaux successifs chez les bovins, est aussi une barrière très forte. Il a une double fonction pendant le début du post-partum : la protection relative du corps utérin, mais aussi son drainage en restant légèrement ouvert. La fermeture du col utérin à partir du 3ème jour postpartum permet d'empêcher la contamination ascendante. Les plis se reforment d'abord crânialement et progressent caudalement, ainsi les pathogènes contenus dans cette zone peuvent être évacués. L'épithélium simple ou pluristratifié constituant l'endomètre représente également une protection anatomique. Néanmoins en post-partum immédiat l'endomètre est à vif, avec des vaisseaux

sanguins s'ouvrant directement dans la lumière utérine, et en contact avec des fluides et débris tissulaires qui sont un milieu de culture favorable à la croissance bactérienne (Azawi, 2008).

La contamination bactérienne est alors plus facile, car cette barrière est fragilisée, et en fonction du nombre et de la virulence des pathogènes présents l'infection bactérienne peut se développer. En effet, dans cette situation, les défenses utérines sont plus aisément submergées, et une endométrite peut se mettre en place. La protection chimique est assurée par le mucus cervical. Le mucus cervical peut jouer le rôle d'obstacle physique contre les organismes qui sinon pourraient remonter le tractus génital, et permettre leur dilution et leur évacuation. Il agit aussi directement sur les bactéries, par trois mécanismes : En empêchant l'adhérence des bactéries à la surface de la muqueuse, grâce à ses lactoferrines En inhibant la croissance bactérienne en piégeant le fer et les peroxydases qui leur sont nécessaires et grâce au lysozyme qu'il contient, qui lui permet d'hydrolyser la paroi des bactéries (Barrière et Lopes, 1987). Enfin, la ligne de défense la plus importante est d'ordre immunologique avec l'intervention des cellules inflammatoires (neutrophiles principalement) et des anticorps.

Environ 48 heures après un vêlage normal et non assisté, des leucocytes s'accumulent dans la lumière utérine parallèlement aux contaminants. Ce fait constitue le commencement normal des processus de nettoyage et d'involution de l'utérus. Cependant les vaches présentant des troubles de l'involution, liés à un étirement trop important de l'utérus, des traumatismes des tissus génitaux lors de dystocie ou de manœuvre obstétricale par exemple, ont une capacité diminuée à contrôler les infections utérines, et une endométrite peut alors être initiée. Une concentration élevée en corps cétoniques en début de lactation est aussi corrélée à une plus grande susceptibilité aux affections péri-partum, par altération de la fonction neutrophile. (Hoeben et al., 1997)

2. Elimination de la contamination :

2. a- Contractions utérines :

Ce sont les contractions myométriales qui participent à l'expulsion des lochies vers l'extérieur. Leur élimination n'est pas régulière. Durant les deux premiers jours, des contractions de forte intensité apparaissent toutes les trois à quatre minutes. Le col est encore relâché, il le reste au moins trois jours après la parturition ce qui permet l'élimination d'une partie des liquides utérins (Roberts, 1986). Du deuxième au quatrième jour, les contractions

utérines, bien que moins intenses, sont plus fréquentes et participent toujours à la vidange de l'utérus. Le col se ferme partiellement mais autorise encore l'élimination des lochies.

Du quatrième au dixième jour, bien que les contractions ne se manifestent plus que sous la forme d'ondulations irrégulières, des lochies sont encore évacuées.

Le col s'est alors légèrement recouvert . Une contamination descendante est possible, à cause des bactéries restées présentes dans l'utérus. On peut alors avoir une cervicite.

La contamination est donc ascendante au départ mais peut ensuite être descendante, provoquant une endométrite, une cervicite ou une inflammation conjointe des deux compartiments.

À partir du dixième jour, jusqu'au quinzième jour post-partum, le col est toujours partiellement relâché et le tonus utérin augmente, consécutif au démarrage de la première vague folliculaire, ce qui permet d'achever la vidange de l'utérus. (Guilbault et al., 1984 et Gier et Marion, 1968) La protection chimique est assurée par le mucus cervical. Le mucus cervical peut jouer le rôle d'obstacle physique contre les organismes qui sinon pourraient remonter le tractus génital, et permettre leur dilution et leur évacuation. Il agit aussi directement sur les bactéries, par trois mécanismes : En empêchant l'adhérence des bactéries à la surface de la muqueuse, grâce à ses lactoferrines En inhibant la croissance bactérienne en piégeant le fer et les peroxydases qui leur sont nécessaires et grâce au lysozyme qu'il contient, qui lui permet d'hydrolyser la paroi des bactéries (Barriere et Lopes, 1987).

Enfin, la ligne de défense la plus importante est d'ordre immunologique avec l'intervention des cellules inflammatoires (neutrophiles principalement) et des anticorps.

Environ 48 heures après un vêlage normal et non assisté, des leucocytes s'accumulent dans la lumière utérine parallèlement aux contaminants .Ce fait constitue le commencement normal des processus de nettoyage et d'involution de l'utérus (Azawi, 2008). Cependant les vaches présentant des troubles de l'involution, liées à un étirement trop important de l'utérus, des traumatismes des tissus génitaux lors de dystocie ou de manœuvre obstétricale par exemple, ont une capacité diminuée à contrôler les infections utérines, et une endométrite peut alors être initiée. Une concentration élevée en corps cétoniques en début de lactation est aussi corrélée à une plus grande susceptibilité aux affections péri-partum, par altération de la fonction neutrophile. (Hoeben et al., 1997)

2 .b- .Phagocytose :

La contamination bactérienne non spécifique de l'endomètre induit un afflux de neutrophiles vers le stroma et la lumière utérine. Ce sont les cellules épithéliales utérines qui sont les premières en contact avec les microorganismes qui entrent dans l'utérus. Elles constituent donc un élément très important dans la mise en place des défenses de l'organisme. La détection des bactéries par les cellules endométriales fait intervenir des récepteurs TLRs (Toll Like Receptors), qui reconnaissent chez les pathogènes des séquences conservées connues sous le nom de PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patterns).

Une inflammation utérine chez la vache conduit à l'augmentation de l'expression du récepteur TLR4 par les cellules épithéliales (Wira et al., 2005) L'activation du système **TLR** par les bactéries a pour conséquence la production de médiateurs pro-inflammatoires guidant la réponse immunitaire innée. Les cellules épithéliales de l'endomètre produisent alors des cytokines, notamment des interleukines, des molécules de la famille du **TNF (Tumor Necrosis Factor)** et des prostaglandines (E et F) ; (Herath et al., 2009).

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**). L'interleukine **6** participe à la maturation des formes immatures des 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 (Singh et al., 2008).

Mais le rôle majeur des cytokines est de stimuler l'afflux de lymphocytes, principalement des granulocytes neutrophiles, par diapédèse vers la lumière utérine. La présence de neutrophiles dans la lumière utérine est une excellente indication de l'existence d'un processus inflammatoire actif, l'examen du contenu luminal ne révélant pas de neutrophiles dans le cas d'un utérus sain. Les neutrophiles (dont c'est la fonction principale), les monocytes sanguins et les macrophages tissulaires sont les cellules les plus efficaces pour la phagocytose et la défense cellulaire contre les microorganismes pathogènes. La phagocytose est un mécanisme de défense non spécifique qui commence précocement, dans les heures suivant le part. Les cellules phagocytaires ingèrent et détruisent les agents pathogènes, mais participent aussi à l'élimination du foyer inflammatoire par ingestion et digestion des débris tissulaires, des complexes antigène-anticorps et des toxines bactériennes.

(Mascarhenas, 1987) La phagocytose comporte plusieurs étapes : chemotactisme, opsonisation, adhérence et attachement, ingestion et digestion (Azawi, 2008). L'opsonisation est nécessaire à l'adhérence. 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 phagocytaire, appelée phagosome. Enfin, la digestion du micro-organisme a lieu grâce à une dégranulation intracellulaire d'enzymes lysosomales. L'activité de phagocytose utérine peut être attribuée à 80% aux granulocytes neutrophiles et à 20% aux macrophages (Frank, 1983). Les neutrophiles jouent aussi un rôle capital dans le déclenchement ultérieur de l'immunité spécifique. Cette réponse immunitaire innée est régulée à différents niveaux. Les stéroïdes sexuels régulent la sécrétion de prostanoides par les cellules épithéliales stromales en réponse au lipopolysaccharide (LPS) bactérien (Herath et al., 2006).

Une autre régulation générale fait intervenir l'axe somatotrope, qui régule l'immunité utérine via l'Insulin-Like Growth Factor 1 (IGF1), qui possède des propriétés immunomodulatrices chez les mammifères (Sheldon et al., 2009). À l'échelle locale, plusieurs protéines de l'endomètre bovin influencent directement la réponse innée ou affectent la voie IGF1 des cellules endométriales, telles les serpinines ou la galectine.

L'oestradiol induit une augmentation de la production de prostaglandines F2 alpha (Guilbault et al., 1984), qui améliorent la chemotaxité et la capacité à phagocyter les bactéries des neutrophiles, et de leucotriènes B4, puissants activateurs de la fonction des neutrophiles. Les prostaglandines F2 alpha peuvent aussi stimuler la production des cytokines pro-inflammatoires qui stimulent la phagocytose et l'efficacité des lymphocytes. Néanmoins, l'activité phagocytaire des leucocytes utérins peut être inhibée pendant plusieurs jours par des stratégies thérapeutiques telles que la délivrance manuelle ou l'administration intra-utérine de la plupart des antiseptiques et désinfectants (Azawi, 2008).

La phagocytose par les leucocytes utérins est aussi diminuée chez les bovins ayant eu un vêlage dystocique, une rétention placentaire ou une métrite. De même les fonctions et les propriétés immunologiques des neutrophiles sont altérées en post-partum lors de stéatose hépatique et lors de déficit énergétique (Ahmadi et al., 2006). L'oestradiol, dont la concentration sanguine est élevée lors de la parturition, améliore la contractilité utérine.

La réponse immunitaire innée est essentielle à la défense de l'utérus contre les microorganismes pathogènes, mais la réponse immunitaire acquise, humorale et cellulaire, vient ensuite la compléter.

L'immunité humorale est assurée par les immunoglobulines. Des immunoglobulines A, G et M ont été identifiées dans les sécrétions génitales de la vache. Les cellules épithéliales de l'endomètre produisent des IgA et des IgG, qui confèrent une protection contre les pathogènes potentiels. Les types d'Ig majoritaires varient selon que l'on parle de l'utérus ou du vagin : on trouve surtout des IgG dans l'utérus et des IgA dans le vagin. Elles agissent principalement en facilitant la phagocytose des bactéries et en participant à leur opsonisation. Quant à l'immunité cellulaire, elle repose sur le pouvoir cytotoxique des lymphocytes. L'induction de la réaction immunitaire à médiation cellulaire dans l'utérus stimule significativement la capacité des neutrophiles situés dans l'utérus à tuer les bactéries via le système oxydatif. La diminution de fertilité lors d'endométrite pourrait être en partie liée à l'effet délétère des réactions oxydatives sur les spermatozoïdes qui, dans l'espèce bovine, ont une structure riche en acides gras polyinsaturés et sont sensibles aux réactions d'oxydation provoquées par les neutrophiles (Gilbert et Fales, 1996).

En début de lactation la vache peut être en déficit énergétique important, et cela s'accompagne d'une diminution de la concentration sanguine en lymphocytes lors de la deuxième semaine post-partum, par rapport aux vaches ayant un déficit énergétique modéré.

On a une immunodépression, connue pour favoriser l'apparition d'infections. Mais une exacerbation du système immunitaire en péri-partum pourrait aussi avoir une influence sur la persistance d'une inflammation utérine au-delà de **21** jours post-partum. Le développement d'une endométrite reposerait alors en partie sur une incapacité à limiter la réponse pro-inflammatoire physiologique due à la contamination bactérienne post-partum.

La présence de bactéries pathogènes dans l'utérus provoque une inflammation mais aussi des lésions histologiques de l'utérus, des retards d'involution utérine et peut mettre en péril la survie de l'embryon, si la fécondation a pu avoir lieu. En effet souvent l'infection bactérienne en elle-même, les produits bactériens ou l'inflammation associée diminuent la sécrétion hypophysaire de la LH donc la croissance et le fonctionnement des follicules ovariens, perturbant ainsi l'ovulation des vaches. L'endométrite est alors associée à une augmentation de l'intervalle vêlage-1^{ère} insemination, un taux de gestation plus faible et plus

de reformes pour infertilité (Azawi, 2008). Le risque d'anoestrus est aussi plus important lorsqu'il y a une endométrite (Deguillaume 2010). Tous ces problèmes sont liés à des défauts d'élimination de la contamination.

CHAPITRE III :

Changements utérins en période post-
partum

I- Involution structurelle/tissulaire/vasculaire :

1. Vulve, vestibule, vagin :

Il n'y a pas d'informations disponibles sur l'involution PP des parties caudales du tractus génital: la vulve, le vestibule et le vagin. Il serait pourtant intéressant de connaître le processus d'involution et de reconstruction de ces parties anatomiques qui sont soumises à des étirements et des traumatismes importants lors de la parturition.

Des lésions traumatiques à ces parties anatomiques du tractus génital lors de la parturition pourraient induire une réponse inflammatoire locale et potentiellement, sur tout le reste de l'appareil génital. En effet, la vascularisation du vagin et de l'utérus a pour origine l'artère iliaque interne. Les vaisseaux utérins et vaginaux partagent des anastomoses artérielles et veineuses. Il existe aussi des anastomoses entre les vaisseaux utérins et les vaisseaux ovariens (Barone, 1990).

L'épithélium vaginal est principalement formé de cellules cylindriques à vocation sécrétrice. Le nombre de couches cellulaires et l'activité de sécrétion est dépendante de l'environnement hormonal (Cole, 1930; Miroud et al. 1991). La muqueuse vaginale peut être infiltrée par des leucocytes en fonction du cycle oestral (Cole, 1930; Miroud et Noakes, 1991; Wrobel et al., 1986), du stade de reproduction comme la parturition (Wehrend et al., 2004) et lors de contamination microbienne comme la vaginite. (Husted, 2003) La muqueuse vaginale est une voie potentielle d'administration de progestagènes chez la vache. En médecine humaine, il y a un intérêt à développer la voie vaginale comme voie d'administration médicamenteuse (Srikrishna et al., 2013). Compte tenu que le tractus génital caudal pourrait représenter une source potentielle d'infection ou d'inflammation ou une voie de traitement pour les affections utérines, des études plus exhaustives de la vulve, du vestibule et du vagin en période PP pourraient faire avancer la compréhension de l'endométrite clinique chez la vache.

2. Col de l'utérus :

Pendant la parturition, sous l'influence d'une haute imprégnation oestrogénique, le col de l'utérus se dilate et est abondamment infiltré par les leucocytes éosinophiles (Wehrend et al., 2004) et des leucocytes polymorphonucléaires neutrophiles (PMN) (van Engelen et al., 2009).

Les leucocytes éosinophiles et les **PMN** permettraient une dilatation optimale en participant à la dégradation du collagène (Hibbs et al. 1982). Les éosinophiles pourraient aussi limiter l'inflammation due au vêlage grâce à leur propriété anti-inflammatoire (Wehrend et al., 2004). Selon Wehrend et al. (2003), l'involution du col pendant les **10** premiers jours PP se déroule en 4 étapes : la première journée, il y a une réduction rapide du diamètre cervical (de **25** à **5** cm avec une réduction moyenne de **19.2±1.6** cm) accompagnée d'une réorganisation structurelle réduisant les risques d'infections ascendantes. Le deuxième jour, la réorganisation et la diminution du diamètre du col de l'utérus se poursuit mais plus lentement et dans un sens cranio-caudal. Les replis du col ne sont pas encore apparents. Le col reste ouvert pour permettre l'élimination du liquide et des déchets cellulaires et tissulaires de la cavité utérine.

Entre le troisième et le septième jour **PP**, l'involution cranio-caudale du col se poursuit (ouverture du col : **3** à **5 cm**) avec la formation des replis du col de l'utérus. La dernière phase correspond à un agrandissement de l'ouverture cervicale aux alentours du dixième jour PP (**6 cm** vers Jour **10**). Cette phase est spécifique à l'espèce bovine et est en lien avec la phase finale d'élimination de caroncules utérines. Cette réouverture correspond aussi à l'apparition d'un premier pic d'oestrogènes en PP (Zhang et al, 2010). Les oestrogènes vont provoquer un relâchement du col de l'utérus et son ouverture tout en favorisant les contractions du myomètre (Wehrend et al, 2004) et facilitent l'expulsion des lochies. Le diamètre extérieur du col montre une involution macroscopique constante et rapide jusqu'à environ la quatrième semaine PP pour ensuite se stabiliser jusqu'à la septième semaine indépendamment de la parité ou du rétablissement du cycle oestral (Heppelmann et al, 2013; Senosy et al., 2009). Toutefois, les animaux présentant des écoulements vaginaux fétides ou contenant du matériel purulent entre 8 et 21 jours PP (Oltenacu et al. 1983) ou des animaux avec une rétention placentaire et/ou une métrite entre 4 et 21 jours PP montrent une involution macroscopique cervicale moins rapide. À 26 jours PP, les vaches avec des écoulements vaginaux purulents avaient significativement un diamètre cervical moyen plus gros que les vaches sans écoulement purulent (**>4.2 vs 3.6, p=0.02**) (Brick et al., 2012). Selon Wehrend et Bostedt (2003), un vêlage difficile dû à un col de l'utérus pas assez dilaté entraîne, dans environ **20%** des cas, un retard de l'involution de l'ouverture du col dans les **10** premiers jours **PP**, surtout si une foetotomie a été réalisée.

Il serait intéressant de suivre l'évolution sur la totalité de la période d'attente volontaire et aussi de les mettre en relation avec les performances en reproduction futures de ces vaches.

L'épithélium du col de l'utérus, formé par des cellules cylindriques, certaines ciliées, d'autres à vocation sécrétrice de mucus, est infiltré par les leucocytes en période pré et PP. Selon, (Stephens et al.,1986) il y a une corrélation très forte entre la présence de bactéries aérobies et anaérobies lors d'un écouvillonnage du col utérin et la présence de plus de **5%** de **PMN** cervicaux. Ce seuil de **5%** a été également validé par (Deguillaume et al. 2012) pour les vaches entre **21** et **35** jours **PP**. Il est considéré comme néfaste sur les performances en reproduction des vaches laitières si la proportion de **PMN** dépasse ce seuil.

3. Corps utérin et cornes utérines :

Dans la première semaine PP, l'utérus est gros, difficile à palper et impossible à rétracter manuellement. On peut toutefois sentir un fort tonus de la paroi de l'utérus amenant la formation de gros sillons. L'involution utérine macroscopique se termine vers la quatrième semaine PP. (Heppelmann et al., 2013; Zhang et al., 2010)

La corne utérine de la gestation mesure environ **40, 10** et **3 cm** de diamètre au moment du vêlage, vers le dixième jour PP et vers la quatrième semaine PP, respectivement « **Gier et al., 1968** ». Deux semaines après le vêlage, l'utérus entier est palpable et possible à circonscrire. Chez ces mêmes vaches l'utérus passe d'un poids de **10 kg** au vêlage à **0.8 kg** en l'espace de **4** à **5** semaines (Gier et Marion, 1968).

Alors que l'involution macroscopique du col de l'utérus ne varie pas avec la parité, il en est autrement pour l'utérus. Les primipares ont une involution de la corne utérine gestante plus lente que les pluripares (Mateus et al., 2002).

Le corps utérin montre aussi une involution rapide tôt en **PP**, il est de l'ordre de **5 cm** dès la première semaine **PP** et il termine son involution macroscopique entre la quatrième et la cinquième semaine PP avec une taille d'environ **2.2 cm** (Mateus et al., 2002). Toutefois, les vaches présentant des lochies fétides et purulentes avec ou sans symptômes systémiques au cours des **6** premières semaines **PP** ont montré une involution macroscopique du corps utérin plus lente que les vaches ayant eu des lochies normales. Le diamètre du corps utérin était significativement augmenté la troisième et quatrième semaine PP . Au fur et à mesure de la progression de l'involution utérine, les barrières mécaniques (col, ligament vestibulo-

vaginal et la vulve) reprennent leur condition et fonction en bloquant l'invasion ascendante par des agents opportunistes ou pathogènes.

Au niveau tissulaire, l'involution utérine s'accompagne par une obturation quasi complète des vaisseaux sanguins caroncules dans les 2 premiers jours PP et amène à une nécrose progressive des caroncules (Archbald et al., 1972). À la fin de la première semaine PP, une ligne de démarcation évidente apparaît entre la partie viable des caroncules et la partie nécrosée qui sera éliminée. Vers la fin de la 2ème semaine, la partie nécrotique se détache et s'additionne au sang et autres fluides utérins pour former les lochies qui seront rejetés. À ce moment, l'épithélialisation de l'endomètre commence (Wagner et al., 1969). Ce processus de reconstruction de l'endomètre prend fin selon les auteurs vers le 30ème jour PP (Archbald et al., 1972; Wagner et Hansel, 1969) ou plus tard, entre **45ème** et le **50ème** jour (Morrow, 1986).

L'épithélium de l'ensemble du tractus génital (vestibule vaginal, cavité vaginale, col de l'utérus et cavité utérine) est formé principalement de cellules cylindriques dont certaines sont à vocation sécrétrice (Cole, 1930; Miroud et Noakes, 1991; Wrobel et al., 1986). Cet épithélium est infiltré par des leucocytes dépendamment de l'environnement hormonal (cycle oestral, gestation) (Cole, 1930; Miroud et Noakes, 1991; Wrobel et al., 1986), de l'évolution PP et aussi de la contamination microbienne (Prunner, Pothmann, et al., 2014). Cette infiltration ne se fait pas de façon uniforme ni synchrone au sein de l'ensemble du tractus génital (Cole, 1930; Deguillaume, 2010; Deguillaume et al., 2012; Miroud et Noakes, 1991).

L'involution du tractus génital de la vache se déroule majoritairement dans les **4 à 5** premières semaines PP que ce soit au niveau macroscopique ou microscopique. Toutefois, la présence d'écoulements purulents témoigne généralement d'un retard de l'involution.

4. Contenu utérin :

4. a- Lochies (débris-liquide) :

Suite au vêlage, les liquides placentaires, le sang, les débris cellulaires et l'exsudat de l'endomètre qui se sont accumulés dans la cavité utérine vont être expulsés en grande partie par les contractions du myomètre utérin Vaillancourt, (1987). La nécrose des caroncules et l'accumulation de débris cellulaires, de sang et d'exsudat endométrial (Wagner et Hansel, 1969) vont former les lochies. Ces lochies seront en partie expulsées vers la deuxième

semaine PP, au moment du premier pic d'oestrogène qui conduit à la réouverture du canal du col de l'utérus et à la contraction du myomètre utérin (Wehrend, Failing, et al., 2003). La dégénérescence des caroncules produit une décharge blanchâtre qui se mélange aux pertes brunâtres (Olson, 1986). Ce matériel blanchâtre peut être difficile à distinguer des écoulements purulents pathologiques. Les lochies sont un milieu favorable à la croissance bactérienne.

Avant l'expulsion complète du contenu utérin, le milieu utérin est donc favorable à la croissance bactérienne. Vers le vingt-cinquième jour PP, l'utérus a vidangé la grande partie de son liquide et les pertes génitales deviennent plus épaisses et brunâtres. Cette observation n'est pas constante. Dans l'étude de (Senosy et al. (2009)), à 18 ± 2 jours PP, environ 2 tiers des vaches présentent un écoulement mucopurulent ou purulent à la vaginoscopie, et à 24 ± 2 jours PP, elles ne sont plus que **30%**. Dans cette étude, les vaches ayant présenté des signes de métrite, de rétention placentaire, ou ayant présenté une dystocie ont été exclues. Dans une autre étude (Williams et al., 2005), où il n'y avait pas ces critères d'exclusion, les mêmes observations ont, quand même, été faites : **31%** d'écoulements muco-purulents et purulents à 21 ± 1 jours PP et **17%** à 28 jours PP. On peut donc estimer que dans des conditions d'élevage normales, environ un quart des vaches présentent des écoulements vaginaux muco-purulents à purulents entre la troisième et la quatrième semaine PP.

4. b-Contamination et élimination des bactéries de l'utérus en post-partum :

Durant la gestation, la cavité utérine est stérile (Foldi et al., 2006) et sauf rare exception, l'infection de l'utérus durant la gestation entraîne la mort du fœtus. Avec le part, l'utérus perd ses barrières anatomiques protectrices naturelles (col utérin, sphincter vestibulo-vaginal et vulve) et se contamine de bactéries de façon quasi systématique avec 90% des vaches présentant une flore bactérienne importante (diversifiée mais équilibrée) dès la première semaine PP (Sheldon et Dobson, 2004). La contamination bactérienne immédiatement après le part est donc considérée comme physiologique (le vocabulaire normal serait plus adapté) tant qu'elle ne persiste pas dans le temps (plus de quelques semaines PP) et qu'elle n'entraîne pas de signes systémiques chez l'animal (Bonnett, Martin, et al., 1991; Mateus et al., 2002b; Sheldon et Dobson, 2004; Sheldon, Noakes, et al., 2004).

Dans un processus d'involution utérine physiologique, la prévalence de vaches avec la présence de bactéries utérines diminue avec le temps pour être pratiquement inexistante à la fin de la période d'attente volontaire (Griffin et al., 1974; McDougall et al., 2011; Sheldon et al., 2002). Le temps représente donc une variable importante dans l'involution utérine et le développement des pathologies utérines.

L'équilibre de la population bactérienne peut être brisée, et certaines bactéries dont des souches pathogènes perdurent durant l'involution utérine et deviennent associées aux différentes conditions pathologiques utérines. Les vaches dont les cultures bactériennes de l'utérus mettent en évidence des bactéries pathogènes jusqu'à 5 semaines PP présentent un retard plus ou moins grand d'involution utérine (Mateus et al., 2002). La prévalence de vaches ayant une culture bactérienne positive était de 40% à 28 jours PP dans une étude effectuée en Nouvelle-Zélande (McDougall et al., 2011). Le type de bactérie est un facteur important dans l'étiologie des conditions pathologiques utérines. Un lien étroit existe entre la persistance de certaines bactéries et l'inflammation du tissu utérin (Williams et al., 2005). Ce lien peut aussi s'étendre à la détérioration des paramètres de la reproduction de la vache en PP (LeBlanc et al., 2011). La corrélation entre la présence de bactéries dans l'utérus et la présence d'inflammation (mesurée en terme de % de PMN) n'est pas parfaite (McDougall et al., 2011; Prunner, Pothmann, et al., 2014; Westermann et al., 2010). L'un peut être présent sans l'autre. Les bactéries pathogènes plus fréquemment rencontrées dans les conditions utérines pathologiques sont *Trueperella pyogenes* (précédemment nommée *Arcanobacterium pyogenes*), *Escherichia coli*, *Fusobacterium necrophorum*, *Bacteroides* spp, *Prevotella* spp (Bonnett, Martin, et al., spp (Bonnett, Martin, et al., 1991; Mateus et al., 2002b; Sheldon et Dobson, 2004; Sheldon et al., 2002; Williams et al., 2005). Il n'est pas encore bien établi que certains groupes ou clones particuliers de ces bactéries entraînent une pathologie du système reproducteur (Silva et al., 2008; Silva et al., 2009). Dans le cas d'*E. coli*, un groupe clonal récemment caractérisée et appelée *Escherichia coli* pathogène endométrial (En PEC) semble plus pathogène par sa capacité d'adhérer et d'envahir plus facilement les cellules de l'endomètre (Sheldon et al., 2010). Cette étude a été effectuée sur une seule ferme. D'autres études sont nécessaires afin de déterminer la prévalence et la pathogénicité réelle de cette bactérie. Cette panoplie de bactéries potentiellement pathogènes se retrouvant en même temps au sein de l'utérus et peuvent agir de façon synergique pour déjouer les défenses immunitaires (Bonnett, Martin, et al. 1991; Gier et Marion, 1968; Herath et al. 2009; Mateus et al. 2002). Cette présence prolongée de bactéries après le vêlage a aussi des conséquences néfastes sur la

cyclicité fonctionnelle des ovaires. En effet, il a été rapporté des anoestrus, des anovulations et une production faible de progestérone par le corps jaune (Mateus et al. 2002b; Sheldon, Cronin, et al., 2009; Sheldon et al., 2002).

4. c- Virus :

L'Herpes virus bovin de type 4(**BOHV4**) est un gamma-herpesvirus, répandu dans les troupeaux du monde entier. Il se diffère de l'Herpès virus bovin de type 1 qui, lui est un alpha-herpesvirus. La vaccination à l'aide des vaccins commerciaux contre le virus de type 1 ne permet pas de développer une protection contre le type 4. Ce virus a un attrait pour les cellules épithéliales et il a été isolé sur l'ensemble du tractus génital (Chastant-Maillard, 2013; Donofrio et al., 2007; Monge et al., 2006; Sheldon, Price, et al., 2009). Son rôle dans le développement de maladie génitale est encore incertain. Mais les conditions du **PP**, propices aux réactivations des herpesvirus, font qu'il a potentiellement un rôle sous-estimé dans certains processus pathologiques (Donofrio et al., 200).

II- Réponse immunitaire utérine en post-partum :

1. Immunité et gestation :

Le système immunitaire a un rôle important durant toutes les étapes physiologiques de la vie reproductive de la vache, mais particulièrement durant la gestation et la période **PP** qui est sensée conduire au retour de la fertilité initiale. Durant la gestation, le fœtus et ses membranes sont perçus comme une allogreffe à cause, entre autres, de la différence des gènes foetaux du complexe majeur d'histocompatibilité (**CMH**) qui sont reconnus comme un corps étranger par la mère. Il est donc important d'inhiber le système immunitaire de la mère durant toute la gestation. L'accumulation de macrophages au sein du tissu endométrial est un bel exemple de l'importance du système immunitaire inné parce que ces cellules immunitaires jouent un rôle dans le remodelage tissulaire, l'apoptose cellulaire et la régulation générale du système immunitaire (Oliveira et al., 2012). Après **9** mois d'inhibition du système immunitaire durant toute la gestation, il faut assumer que l'immunité innée est réactivée pour rencontrer les besoins de défense utérine nécessaire durant la période **PP**. Le système

immunitaire joue également un rôle important dans l'involution (remodelage) utérine PP (Chapwanya et al., 2009).

2. Les Polymorphonucléaires neutrophiles en période post-partum :

Après la mise-bas, les bactéries présentes dans le passage vestibulo-vaginal et la région périnéale envahissent rapidement la cavité utérine. À partir de ce moment, le système de défense immunitaire inné doit reconnaître l'envahisseur, articuler et activer la première ligne de défense pour assurer la prise en charge des bactéries envahissantes et les expulser du tractus (Stossel, 1975). Le système immunitaire inné inclut les cellules polymorphonucléaires dont le principal joueur est le **PMN**. Les **PMN** représentent de loin la population de cellules inflammatoires la plus importante en terme de nombre.

La parturition est caractérisée par une leucocytose et une différenciation des globules blancs (Kim et al., 2005) associée à l'élévation du cortisol produit par le fœtus (Preisler et al., 2000). Cette leucocytose se transforme en leucopénie dans la première semaine **PP** à cause de la migration des **PMN** de la circulation sanguine au site d'inflammation et d'infection de l'utérus et de la glande mammaire (Guidry et al., 1976). Une accumulation de **PMN** dans l'utérus a été mesurée dans les 12 heures qui ont suivi la parturition (Prunner, Pothmann, et al., 2014). Les **PMN** dans la circulation sanguine ont une demi-vie très courte (6 à 12 heures). Leur passage du système circulatoire au site inflammatoire utérin augmente leur demi-vie de façon considérable (à quelques jours) (Goldsby, 2003). Une fois l'infection ou l'inflammation utérine sous contrôle, le nombre de **PMN** utérins retourne à des valeurs normales. Durant l'involution utérine normale, les **PMN** utérins disparaissent presque complètement vers la quatrième semaine **PP** (Gabler et al., 2010). Toutefois, un utérus en bonne santé ne devrait pas être exempt complètement de **PMN** mais en contenir un nombre restreint (Klucinski, Targowski, Winnicka et Miernik-Degorska, 1990). La grande majorité des vaches auront donc éliminées la contamination utérine bactérienne entre 4 ou 5 semaines **PP** (Griffin et al., 1974; Hussain et al., 1990; Sheldon et al., 2002). Toutefois, pour un certain nombre de vaches, la contamination bactérienne et/ou l'inflammation persisteront. Environ **40%** des vaches qui présentent des écoulements vaginaux à **28** ou à **42** jours **PP**, et **50%** de celles présentant une inflammation de l'utérus, ont une culture bactérienne positive pour les 5 bactéries considérées communément comme pathogènes (McDougall et al., 2011).

3. Fonctionnement des polymorphonucléaires neutrophiles :

L'efficacité des PMN repose sur 4 fonctions importantes : 1) migration / chemotaxis, 2) adhérence / agrégation, 3) phagocytose, et 4) action cytocyde / dégranulation / production de peroxyde. La migration des neutrophiles de la circulation sanguine vers le tissu ou la cavité utérine est rendue possible grâce à une cascade d'évènements amenant la synthèse de cytokines pro-inflammatoires. Les dommages tissulaires et cellulaires de l'utérus et tout particulièrement de l'endomètre (Moller, 1970) lors de la mise-bas neutralisent des barrières physiques importantes comme la mucine (Davies et al., 2008) qui est responsable de prévenir l'attachement des bactéries sur l'endomètre. La perte d'épithélium endométrial implique aussi une perte de production de peptides antibactériens et de d'autres protéines (Tekin et al., 2003). Avec la perte d'épithélium utérin vient également la perte de récepteurs de type 'toll-like' (TLRs) présents à la surface des cellules endométriales. Les récepteurs TLRs reconnaissent les ligands bactériens comme les peptidoglycanes et les lipopolysaccharides (LPS) à la surface des bactéries (Kim et al., 2005; Sheldon et Dobson, 2004) et sont une partie importante du système immunitaire inné. Les substances chimiotactiques produites par les bactéries elles-mêmes jouent également un rôle important dans l'appel de cellules inflammatoires. L'inflammation et/ou l'infection induisent la production importante de protéines de la phase aiguë par les hépatocytes (Baumann et al., 1994) qui reviennent à des niveaux normaux deux semaines plus tard (Sheldon et al., 2001). D'autres molécules comme le plasminogène (Moraitis et al., 2004), l'orosomucoïde 1 glycoprotéine acide, (Cairolì et al., 2006), et l'haptoglobine (Skinner et al., 1991) ont également un rôle dans la cascade de l'inflammation.

4. Dysfonctionnement des polymorphonucléaires neutrophiles :

L'activité des PMN est essentielle à l'élimination des bactéries utérines (Hussain, 1989; Beutler, 2004). Chez les vaches développant des infections utérines en période **PP**, le mécanisme de défense des **PMN**, et tout particulièrement leur fonction de phagocytose, est perturbé (Kimura et al., 2002). Les vaches avec une endométrite en période **PP** ont des **PMN** sanguins avec une capacité de phagocytose en période pré-partum réduite comparativement à celles qui restent saines (Kim et al., 2005). Une fonction réduite des **PMN** prédispose également les vaches à des infections utérines plus graves comme la métrite puerpérale. Les

vaches avec des **PMN** sanguins contenant moins de glycogène sont plus à risque de développer une métrite aiguë après le vêlage (Galvao et al., 2010). Une capacité réduite d'oxydation des **PMN** (réduction de l'activité du cytochrome C et de la myéloperoxydase) et un chimiotactisme déficient sont également associés à une plus grande incidence d'infections utérines PP et de rétention placentaire (Cai et al., 1994; Hammon et al., 2006; Kimura et al., 2002). L'utilisation d'antioxydants semble améliorer l'activité des neutrophiles et réduit l'incidence de métrite et d'endométrite (Hanzen, 2012).

L'association entre l'infection utérine **PP** et le dysfonctionnement du système immunitaire n'est pas seulement reliée exclusivement aux **PMN**, mais également aux mécanismes en amont de ces derniers. Les vaches qui présentent ultérieurement des pathologies utérines sécrètent moins de cytokines pro-inflammatoires pendant la première semaine **PP** (Ghasemi et al., 2012). Le rapport cytokines pro/anti-inflammatoires est augmenté suite à une contamination utérine chez les vaches qui ultérieurement auront des performances reproductives altérées (Herath et al., 2009).

5. Immunité complémentaire aux polymorphonucléaires neutrophiles :

Des opsonines, dont certaines globulines, et des protéines du complément, est essentielle dans le mécanisme de reconnaissance et de phagocytose de l'agent envahisseur. L'activité des lymphocytes B est également importante à travers la production d'anticorps locaux dirigés contre des bactéries présentes dans l'utérus (Dhaliwal et al., 1996; Watson et al., 1990).

Les anticorps naturels, anticorps présents en absence d'une immunisation, semblent être un bon indicateur de la sensibilité d'animaux à développer une pathologie utérine en PP. Dans l'étude de (Machado et al. 2014), les animaux qui ont développé une métrite PP avaient significativement moins d'anticorps naturels circulants. Ce déficit était mesurable déjà un mois avant le vêlage.

Le système immunitaire est donc un agent important dans la fonction reproductrice de la vache. Lors de la gestation, il est freiné pour ne pas rejeter l'allogreffe qu'est le fœtus et ses membranes. Ensuite, il participe, de manière très active, à la reconstruction du tractus génital et au contrôle des infections dans cette zone qui a perdu toutes ses défenses physiques pendant et juste après le vêlage. Plus tard, il participe aussi au cycle oestral (Shirasuna et al.,

2013) et enfin au moment de l'insémination la présence de **PMN** en faible quantité favoriserait le risque de gestation.(Kaufmann, Drillich, et al., 2009)

La difficulté dans la compréhension du rôle bénéfique ou néfaste de la réaction inflammatoire réside dans la balance entre les processus physiologiques et ceux pathologiques. Les outils diagnostics disponibles pour le clinicien restent à améliorer dans cette optique de mieux discerner et contrôler le processus pathologique.

CHAPITRE IV

Examen Cytologique

I. les différentes Méthodes de diagnostic des endométrites :

1. L'examen général :

Au nombre des paramètres classiques de l'examen général (fréquences respiratoire et cardiaque, examen des muqueuses, évaluation du comportement, appétit, présence de boiteries, santé mammaire, état corporel, présence d'écoulements anormaux ...)(Urton et al. 2005, Huzzey et al. 2000), la prise de la température corporelle semblerait revêtir un intérêt particulier (Scott et al. 2006). En effet, la présence de fièvre dans les deux semaines qui suivent le vêlage peut faire suite à une infection intra-utérine mais ne constitue pas un indicateur suffisant de cette dernière en l'absence d'autres signes cliniques. L'enregistrement des températures pendant **10** jours consécutifs après le vêlage n'a pas permis de mettre en évidence une association entre la présence de fièvre (température **>39.7°C**) et la charge bactérienne intra-utérine, ou la présence de pathogènes spécifiques, excepté peut-être *Prevotella* spp. (Sledon et al. 2004). De même, en présence de sécrétions utérines caractéristiques d'une métrite aiguë, la présence de fièvre n'est pas un élément fréquent. Lors d'enquêtes terrain (Carlos de Sa Intervet communication personnelle 2004), sur des vaches avec endométrite aiguë, seules 12% des vaches (n=206) présentant des signes cliniques (pertes liquides sanieuses et malodorantes) avaient une température supérieure ou égale à 39.5°C. D'un suivi de la température corporelle de 1042 vaches laitières durant le post-partum mis en place pour identifier les animaux à problèmes, il résulte les recommandations suivantes (1) prise de température journalière pendant au moins 7 jours, (2) en cas de dépassement du seuil de 39.1°C par une primipare ou une multipare, faire procéder à l'examen clinique de l'animal, (3) ne recourir à une antibiothérapie systématique que si une hyperthermie supérieure à 39,4°C voire 39,7°C est observée pendant deux jours consécutifs (Kristula et al. 2001).

2. l'examen vaginal :

Classiquement, l'examen vaginal sera réalisé au moyen d'un spéculum en plastique ou en carton en cas d'usage unique ou d'un vaginoscope constitué de deux ou trois valves en métal. Il conviendra d'utiliser un spéculum de longueur adéquate pour visualiser le col utérin. Leur utilisation implique le respect d'une hygiène adéquate et d'une manipulation douce mais ferme en vue d'éviter toute contamination complémentaire ou lésion du tractus génital postérieur. L'intérêt majeur de ces systèmes est leur faible coût et la facilité de leur mise en

place. Par ailleurs, ils permettent de caractériser la nature physiologique (muqueuse, muco-sanguinolente) ou pathologique (flocons de pus, mucopurulente, purulente, sanieuse) des écoulements présents dans le vagin. Enfin, il est possible ainsi de confirmer la présence éventuelle d'un pneumo ou uro-vagin ou de lésions cervicales ou vaginales. L'examen manuel au moyen du bras revêtu d'un gant lubrifié est encore largement utilisé par les praticiens. Il a pour but de recueillir au moyen de la main d'éventuels écoulements présents dans la cavité vaginale. Il ne dispense son utilisateur de respecter les règles d'hygiène minimales. Il est sans effet sur le risque de contamination de l'utérus (pour autant qu'une hygiène vulvaire soit respectée). Il peut se traduire par une augmentation de la concentration des protéines aïgues de l'inflammation et retarder l'involution utérine (Sheldon et al. 2002).

Il est également possible d'utiliser le système Metricheck (ND). Appelé aussi « bâton à mucus » en Allemagne ou encore « racleur à yaourt » en Hollande, il a été mis au point en 2002 par la firme Simcro, Nouvelle Zélande : (www.simcrotech.co.nz) pour permettre aux éleveurs de détecter plus aisément les endométrites. Il consiste en un système métallique d'une longueur de 50 cm doté en son extrémité d'une sphère en caoutchouc (40 mm) permettant de retirer de la cavité vaginale le contenu éventuellement présent (**Figure 13**).

Le système ne nécessite aucune source lumineuse et permet un examen « à distance » de l'animal. Son prix (**75 Euros**) est abordable. Son emploi implique cependant une utilisation hygiénique et souple pour éviter contaminations et lésions vaginales. La capacité diagnostique de la méthode n'est pas significativement différente de celle offerte par la vaginoscopie. (Mee 2007)

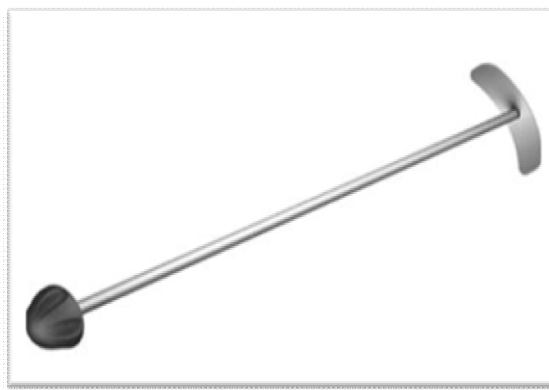


Figure N°13 : Metricheck

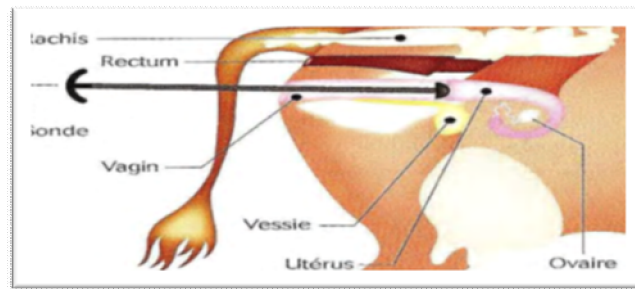


Figure N°14 : Principe de la mise en place de la sonde intravaginale Métrichéck®

« Mee, 2007 »

3. La palpation rectale :

Economique d'emploi, la palpation rectale est une des méthodes les plus utilisées en pratique. Néanmoins sa capacité diagnostique est étroitement liée à son usage régulier (Lewis 1997). Etant donné les variations individuelles liées à l'involution utérine, la détermination précise de la taille, symétrie et consistance des cornes utérines, paramètres classiquement identifiés lors de la palpation du tractus génital n'est pas chose aisée. En ce qui concerne le diamètre des cornes, nous avons pour habitude de distinguer trois classes de diamètre distinguées (< 5 cm, 5 à 10 cm et > 10 cm). En ce qui concerne la consistance des cornes, nous distinguons une consistance, flaccide, ferme et tonique. La consistance des cornes peut dépendre de la présence ou non d'un contenu liquidien, d'un état inflammatoire mais bien entendu également de la présence de l'une ou l'autre structure ovarienne normale ou pathologique. Ainsi, en cas de pyomètre l'utérus est distendu et un corps jaune serait palpé dans 96 % des cas (Fazeli et al. 1980, Jackson 1977). La palpation des cornes utérines offre l'avantage outre de sa capacité à, juger de l'involution anatomique de l'utérus, de pouvoir induire l'apparition d'un écoulement vaginal voire vulvaire un écoulement. Certains auteurs ont décrit une consistance tubulaire palpable ou la paroi interne de la corne serait identifiable par palpation : ils parlent de lumière utérine palpable (Stevens et al. 1995). La palpation manuelle des cornes utérines en vue d'évaluer leur diamètre ou leur consistance n'est pas suffisante pour poser avec certitude un diagnostic d'endométrite chronique (Foldi et al. 2006 Sheldon et al. 2006). Cette méthode manque d'exactitude quand il s'agit d'identifier les vaches présentant de l'infertilité due à une endométrite (Miller et al. 1980, Kristula et Bartholomew 1998).

Très pratique au demeurant, elle s'avère la moins sensible et la moins spécifique des méthodes possibles (Bretzlaff 1987, Gilbert 1992, Youngquist et Shore 1997, Deguillaume 2007).

Ainsi, la corrélation entre le diamètre des cornes utérines et l'identification bactériologique serait comprise entre **0,17** pour la corne gauche et **0,22** pour la corne droite (Studer et Morrow 1978). De même, sur la base de **157** diagnostics d'endométrite chronique posés par palpation manuelle, un isolement bactérien n'a été posé que dans 22 % des cas dans le liquide de lavage utérin (Youngquist et Shore 1997). Référence faite au statut de gestation identifié à **120** jours post-partum, il s'avère que le diagnostic manuel d'une endométrite sur base d'un col de diamètre supérieur à **7,5 cm** ou d'une augmentation du diamètre des cornes déterminés respectivement **20 à 33** jours et **26 à 40** jours post-partum, est une méthode peu sensible (0,17 à 0,21) mais très spécifique (0,88 à 1). Dans une étude plus récente arrive aux mêmes conclusions (Deguillaume 2007). Son association à la vaginoscopie ne contribue pas à améliorer les résultats (Leblanc et al. 2002, Bonnett et al. 1993).

D'autres auteurs ont proposé d'autres méthodes de caractérisation des infections utérines. Deux publications ont fait état d'évaluations plus précises.

Ainsi, (Scholten et al. (1991) caractérisent l'endométrite aiguë par la présence de l'un ou de plusieurs symptômes généraux suivants : température rectale > **39.5°C**, fréquence cardiaque > **90 / min**, contractions du rumen < **5/5'** et diminution d'appétit. Par ailleurs, ces auteurs définissent un score utérin (0 à 4) en se basant sur la présence (1) ou l'absence (0) des 4 symptômes locaux suivants : taille de l'utérus (normal ou anormal), consistance utérine (normale ou augmentée), absence d'air ou de gaz, présence ou absence d'un écoulement anormal. En cas d'endométrite chronique, Murray et al. (1990) combine l'évaluation de l'état corporel (bon : 0, faible : 1), la présence et la nature d'un écoulement vaginal (malodorant : 3, sans odeur : 0, sanguinolent : 3, purulent: 2, floconneux: 1) et la taille et la position du tractus génital (élargi, à paroi épaisse, plongeant dans la cavité abdominale ou non palpable: 3, large, épaissi mais palpable: 2, présent entièrement dans la cavité pelvienne avec une légère asymétrie des cornes : 0). Selon la valeur du score ainsi établi, trois catégories sont distinguées : endométrite sévère (7 à 10), moyenne (3 à 6) ou légère (0 à 2). Ce genre d'évaluations contribuerait à réduire la part de subjectivité du diagnostic et faciliterait la comparaison entre animaux ou entre examens chez le même animal.

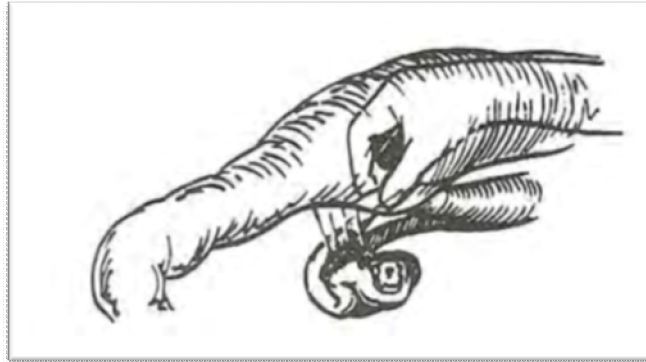


Figure N°15 : Palpation des cornes utérines à travers la paroi du rectum

« Stevens et al., 1995 »

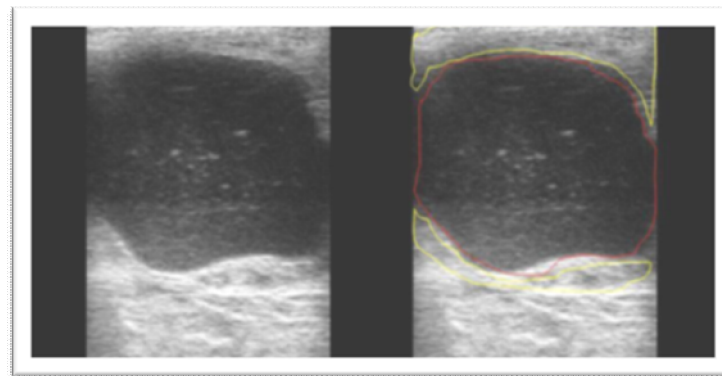
4. L'examen échographique :

L'endométrite est habituellement diagnostiquée par échographie au travers de la mise en évidence de liquides utérins avec des particules échogènes en suspension. La facilité du diagnostic dépend de la quantité de liquides présente et donc du degré de l'endométrite. L'image la plus caractéristique est donc celle du pyomètre (Figure 45). Lors de pyomètre, le contenu utérin est hétérogène et d'aspect floconneux (Foldi et al. 2006, Shledon et al. 2006). Les amas de pus en suspension peuvent être mobilisés en exerçant une succussion de l'utérus au moyen de la sonde. La quantité de ces amas est variable. Il conviendra donc de faire un diagnostic différentiel avec un éventuel mucomètre, un hydromètre ou encore une gestation. Un examen vaginal ou bactériologique permettra le cas échéant de confirmer ce diagnostic différentiel. Lors de pyomètre, on peut observer un épaissement de la paroi utérine et la présence simultanée d'un corps jaune (**Figure 16**). Lors de gestation, l'image échographique est anéchogène. On peut identifier la présence de membranes foetales et d'un embryon plus échogènes. La gestation s'accompagne systématiquement de la présence d'un corps jaune (Hanzen et al. 1993).

En cas d'endométrite chronique, l'accumulation de pus est moins importante que lors de pyomètre. On peut néanmoins dans certains cas observer une zone anéchogène en partie crâniale et déclive de l'utérus qui revêt le plus souvent une forme en étoile (**Figure 17**). Le pus apparaît non homogène et floconneux. Cependant, il semblerait que les images échographiques anormales identifiées (images en éponge, en cocarde, en ligne, en étoile) ne

sont que peu associées à la présence d'une infection. Leur interprétation devrait davantage tenir compte des structures ovariennes associées (Deguillaume 2007).

La corrélation entre un examen échographique et le résultat d'un examen cytologique d'un prélèvement réalisé au moyen d'une cytobrosse est relativement faible (Kasimanickam et al. 2004, Drillich et al. 2004). Récemment cependant, se basant sur une distension de la lumière utérine supérieure à 3 mm et une épaisseur de la paroi utérine supérieure à 8 mm, certains auteurs identifient une fréquence d'endométrites comparable à celle déterminée sur base de l'examen cytologique au moyen d'une cytobrosse (**10 vs 11,8 %**). Cependant ces critères de diagnostic sont beaucoup moins sensibles (respectivement 30,8 et 3,9 de sensibilité) que spécifiques (respectivement 92,8 et 89,2) comparés à l'examen cytologique d'un prélèvement réalisé au moyen d'une cytobrosse. Sans doute faut-il y voir les différences induites par le positionnement de la sonde échographique et les erreurs possibles des mesures effectuées. Il est possible également de penser qu'il puisse exister deux types de populations de vaches : l'une ayant une réponse inflammatoire élevée mais peu de liquides utérins et l'autre se caractérisant par une distension liquidienne plus importante et donc indirectement par une concentration cellulaire moindre. Il semblerait que l'identification échographique de la présence de liquides utérins doive être combinée à celle d'une analyse cytologique pour augmenter la sensibilité du diagnostic des endométrites (Barlund et al. 2008).



FigureN°16 : Image échographique d'un pyomètre (la ligne jaune identifie les contours de la paroi utérine et la ligne rouge le contour de la cavité utérine distendue)

(Hanzen FMV Liège).

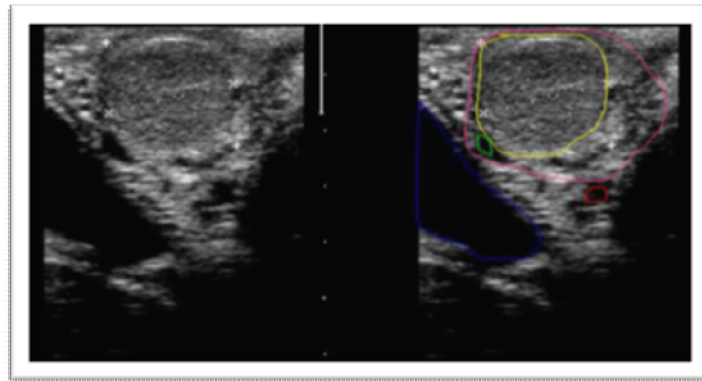


Figure N°17 Image échographique d'un corps jaune (le corps jaune est délimité par la ligne jaune, l'ovaire est délimité par la ligne rose, la ligne bleue délimité la vessie)

(Hanzen FMV Liège).

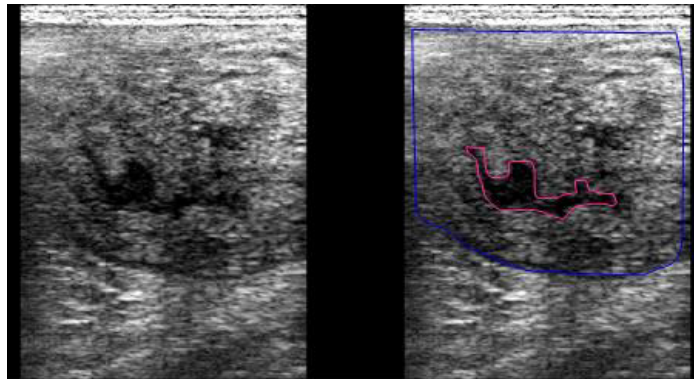


Figure n°18 : Image echographique d'une endometrite chronique

(la ligne bleue identifie les contours de la paroi uterine et la ligne rouge le contour de la cavite uterine en etoile)

5. Biopsie :

La biopsie est une technique qui permet de mettre en évidence un statut inflammatoire de la muqueuse en se basant sur l'infiltration de celle-ci par des leucocytes. Son interprétation en observant les coupes histologiques est subjective (Bonnett, Miller, Etherington, et al., 1991 . Meira et al. (2012) a essayé d'en améliorer l'interprétation en développant un système de score plus détaillé. Mais la détermination du seuil n'a pas été basée sur les performances ultérieures en reproduction des animaux, ce qui le rend donc difficilement utilisable pour prédire l'infertilité. Toutefois, en lien avec le développement des technologies « -omiques », la biopsie devient un outil très intéressant et objectif dans l'analyse des mécanismes

moléculaires (Chapwanya et al., 2010). De plus, cette technique ne montre pas d'effets néfastes ni sur la muqueuse utérine, même avec des prélèvements répétés dans une zone précise (Chapwanya et al., 2010), ni sur les performances en reproduction chez la vache (Chapwanya et al., 2010; Goshen et al., 2012).

Cependant les prélèvements ne sont pas toujours d'assez bonne qualité pour être exploitables. Deux études rapportent entre 60 et 70% de biopsies amenant à une lecture de bonne à très bonne qualité (Bonnett, Miller, Martin, et al., 1991; Meira et al., 2012). Par contre, pour ce qui est de l'extraction d'ADN ou d'ARN dans le but d'analyse avec les technologies « -omiques », a obtenu une moyenne de 7.6 sur une échelle de qualité de 10. L'utilisation de la biopsie pour mettre en évidence la présence de bactéries, a démontré une capacité d'isoler 33% de plus de bactéries au sein de l'utérus que si le prélèvement avait été fait par écouvillonnage (Messier et al., 1984).

Mais dans cette étude, il n'avait pas été possible d'associer des lésions histologiques à un type de bactérie ou bien à une quantité de bactéries. Un modèle prenant compte la biopsie, l'examen clinique et la bactériologie entre 26 et 40 jours PP, proposé par Bonnett et al. (1993), a démontré une bonne sensibilité (92%) et une bonne spécificité (77%) en vue de prédire le statut de gestation à 120 jours PP. Avec la charte développée par Meira et al. (2012), la biopsie entre 21 et 47 jours PP est une technique faiblement sensible (44%) mais spécifique (92%) pour détecter l'inflammation endométriale diagnostiquée par la cytologie. La biopsie comme technique de diagnostic basée sur l'observation histologique reste difficilement utilisable sur la ferme, mais avec les nouvelles technologies moléculaires, la biopsie s'avère être un outil avec un grand potentiel.



FigureN°19 : Matériel de biopsie Année 2008-2009 Prof. Ch. Hanzen

6. Cytologie :

La cytologie est basée sur l'analyse d'échantillons prélevés soit à l'aide d'un écouvillon ou d'une cytobrosse sur la muqueuse du col utérin ou niveau de l'endomètre utérin, soit en faisant un lavage utérin (dans ce cas, c'est l'endomètre utérin qui est analysé). La technique de cytobrosse a été comparée à la technique de lavage utérin par (Kasimanickam et al. (2004), elle a montré des avantages suivants : la proportion de **PMN** était plus élevée, il n'y avait donc pas l'effet de dilution du lavage qui, étant plus irritant, détache plus de cellules de la muqueuse. Contrairement au lavage, où il y a eu 17% de non échantillonnage dû à l'impossibilité de ré-aspirer assez de liquide, la cytobrosse permet d'avoir du matériel à chaque fois avec des cellules moins déformées. Il faut cependant préciser que même si du matériel est présent sur la cytobrosse, la lecture cytologique peut ne pas être réalisable. Il a été rapporté dans certaines études 7 à 8% de lames cytologiques non utilisables (Prunner, Pothmann, et al., 2014; Westermann et al., 2010). Sur ces échantillons, un comptage de cellules **PMN** et de cellules épithéliales est réalisé afin d'exprimer une proportion de **PMN**. Il est aussi possible d'utiliser un test d'estérase leucocytaire (Cheong et al., 2012; Couto et al., 2012; Santos et al., 2006) sur ces échantillons. Ce test se réalise en mettant en contact le prélèvement avec le réactif qui se trouve sur une bandelette de tests urinaires. Il permet d'avoir une évaluation essentiellement semi-quantitative de la présence de ces **PMN**.

La cytologie n'a pas été utilisée pour évaluer l'inflammation de la muqueuse vaginale.

En ce qui concerne le col utérin, deux études ont utilisé la méthode d'écouvillonnage. Le seuil de **PMN** qui montre un effet négatif sur les performances en reproduction s'avère être 5% « Deguillaume et al., 2012; Stephens et al., 1986 ». Dans l'étude de Stephens et al. (1986), il n'a été possible de mettre en évidence une culture bactérienne positive que dans 37% des cas de vaches ayant plus de 5% de **PMN**. Deguillaume et al. (2012) a montré que 20% des animaux entre 21 et 35 jours PP avaient une cytologie supérieure au seuil de 5% et cette proportion se maintient jusqu'à 60 jours PP. Il n'y a pas une forte corrélation entre les vaches présentant une inflammation au niveau du col de l'utérus et celles présentant une inflammation au niveau de l'endomètre : environ 70% des animaux positifs à un test était positif aussi à l'autre. Dans l'étude de (Stephens et al., 1986), 60% des vaches de la catégorie repeat breeders présentaient une cervicite sans endométrite mais tous les animaux avec une endométrite présentaient aussi une inflammation du col. Dans l'étude de

« Deguillaume et al. (2012) », l'inflammation physiologique côtoie l'inflammation pathologique entre 21 et 35 jours **PP**, ce qui est différent de l'étude de (Stephens et al. (1986), où les observations ont été faites sur des animaux avec de l'infertilité avérée. (Couto et al. (2012) a trouvé une forte corrélation entre l'utilisation du test d'estérase leucocytaire au niveau du col entre 20 et 35 jours **PP** et la proportion de PMN au niveau de l'endomètre utérin sans toutefois pouvoir faire un lien avec un processus pathologique affectant le statut de reproduction à 90 jours **PP**. (Stephens et al. (1986) ont dans leur étude 90% des vaches avec une inflammation du col qui présentaient aussi des écoulements vaginaux. La cytologie de l'endomètre utérin a été utilisée chez des animaux tôt en **PP** afin de la mettre en relation avec l'involution utérine. (Prunner et al. (2014) a respectivement regardé l'évolution moyenne de la proportion de PMN du vêlage jusqu'à 28 jours **PP** de 3 groupes de vaches réparties selon leur statut d'inflammation utérine au vingt-et-unième jour **PP**. L'évolution de la proportion de **PMN** est très variable au sein d'un même groupe de vaches et aussi dans le temps. La diminution de la proportion de PMN au fil du temps, ne se fait pas de façon progressive. Il a été observé une fluctuation rendant les groupes non significativement différents jusqu'au vingt-et-unième jour **PP**. Cette variabilité a été aussi rapportée au niveau individuel avec des profils variés dont certains montraient des pics de réactivation de l'inflammation de l'endomètre au cours du temps (Deguillaume, 2010; Gabler et al., 2010). Étant donné que la période de ré-épithélialisation de l'endomètre utérin s'étend jusqu'à environ 30 jours **PP** (Archbald et al., 1972; Wagner et Hansel, 1969), les fluctuations de la proportion de **PMN** au sein de cette période pourraient-elles permettre de faire la distinction entre un phénomène physiologique et un phénomène pathologique ? Les vaches ayant des écoulements vaginaux purulents au vingt-et-unième jour **PP** n'avaient pas un profil de la proportion de **PMN** au fil du temps, significativement différent des vaches considérées comme normales entre le vêlage et le vingt-et-unième jour **PP**.

La cytologie a été étudiée pour prédire les performances en reproduction des vaches. Selon les études, le moment du prélèvement était entre 21 et 60 jours **PP** (Barlund et al., 2008; Couto et al., 2012; Deguillaume et al., 2012; Dubuc et al., 2010a; Galvao, Frajblat, et al., 2009; Ghasemi, 2011; Kasimanickam et al., 2004; McDougall et al., 2011), et les objectifs étaient le statut de gestation à un moment donné (de 90 jours **PP** à 150 jours **PP**), le jour **PP** médian de la gestation ou la vitesse à laquelle les vaches sont devenues gestantes sur une période allant de 200 à 300 jours **PP**. Les seuils ont donc été déterminés en fonction du

moment du prélèvement, ils variaient entre 4 et 18% de PMN. Etant donné le laps de temps écoulé entre le moment du diagnostic et la constatation de la gestation, la sensibilité de ces tests est généralement faible (moins de 50%) mais la spécificité est généralement bonne (supérieure à 80%). En ce qui concerne la concordance entre la cytologie utérine et les écoulements vaginaux, elle est généralement faible (Dubuc et al., 2010a; McDougall et al., 2011; Peter et al., 2011; Westermann et al., 2010). La cytologie est donc un instrument intéressant qui met en évidence la présence de signe d'inflammation. Toutefois, son utilisation actuelle ne permet pas de faire la différence entre une inflammation physiologique et une inflammation pathologique.

7. Vaginoscopie, MetrichekR et palpation vaginale :

Les écoulements vaginaux peuvent être de différentes natures. Tot en PP, les vaches présentent des écoulements physiologiques correspondant aux lochies vers la 2^e semaine PP. Par la suite, les vaches ne présenteront plus d'écoulement, ou un écoulement mucoïde contenant plus ou moins de matériel purulent.

En utilisant la charte de (Williams et al. (2005), complétée par celle de (Knutti et al. (2000) et Mari et al. (2012), les écoulements vaginaux peuvent être décrits comme suit : score 0 pour les vaches ne présentant pas d'écoulement, score de 1 pour un mucus clair, score de 2 pour un mucus trouble avec ou sans flocons de pus, score 3 pour des écoulements muco-purulents, un score de 4 pour des écoulements purulents. Williams proposait de donner un score à l'odeur : score de 1 si fétide sinon, 0. La présence d'écoulements vaginaux est mise en évidence de 3 façons différentes : la palpation vaginale, la vaginoscopie et le MetrichekR.

La palpation vaginale présente le gros inconvénient de devoir utiliser un gant lubrifié, ce qui amène à ne pas pouvoir mettre en évidence les animaux sans écoulements. Toutefois, l'avantage de cette technique est de pouvoir évaluer la quantité de liquide présent dans le vagin et de l'échantillonner de façon représentative (Williams et al., 2005).

Le MetrichekR est un outil formé d'une tige en acier terminée par une cupule de silicone. Il est destiné à prélever un échantillon des sécrétions présentes dans le vagin. Il permet de faire rapidement un prélèvement vaginal mais la difficulté résulte dans la manipulation et la visualisation de cet échantillon dans la cupule. Lors du prélèvement, des petites bulles d'air se forment dans le mucus, ces bulles pourraient entraîner une erreur de

lecture en masquant la présence de flocons de pus mais aussi, dans l'autre sens, en laissant penser que ceux sont des flocons de pus. De plus, le mucus trouble est plus difficilement visualisable. Pour cette raison, dans les études où cet instrument est utilisé, le mucus trouble n'est jamais mentionné (Dubuc et al., 2010a; McDougall et al., 2011; McDougall et al., 2007; Runciman et al., 2009; Senosy et al., 2009).

La vaginoscopie permet de bien visualiser la paroi vaginale et la présence d'écoulement. Elle demande un peu plus de temps que le MetricheckR. Pour le MetricheckR et les vaginoscopes réutilisables, le risque de propager des pathogènes entre les vaches est important. Il est donc nécessaire de pratiquer une désinfection adéquate entre les vaches pour des raisons de bio-sécurité. La présence d'écoulements au niveau du vagin peut avoir comme origine le vagin, le col de l'utérus et l'utérus. Selon (McDougall et al. 2007), 50% des animaux présentent des écoulements vaginaux contenant du matériel purulent lors de la première semaine PP, 40% la seconde, 35% la troisième et 20% la quatrième semaine **PP**.

La mise en évidence d'écoulements vaginaux est une méthode, qui comme la cytologie, est peu sensible (environ 20%) mais bien spécifique (90%) en lien avec les performances en reproduction futures des vaches (Dubuc et al., 2010a; LeBlanc et al., 2002a; McDougall et al., 2007).

Dans la définition proposée en 2006 par (Sheldon et al. (2006), les écoulements vaginaux considérés comme pathologiques étaient muco-purulents et purulents à partir de 26 jours PP. Toutefois le stade flocons de pus a un impact négatif sur les performances en reproduction. À 28 jours PP, les vaches diagnostiquées avec des flocons de pus avaient un jour médian à la première insemination et un jour médian à la gestation significativement augmentés (Williams et al., 2005). Dans l'étude de (McDougall et al. (2007), l'examen réalisé à 35 jours PP, un effet significatif du grade flocons de pus était aussi observé.

L'observation des écoulements vaginaux a le même point faible que les techniques précédentes: une sensibilité faible pour prédire le risque de gestation et une spécificité relativement bonne. Une explication de la faible sensibilité des tests provient du fait que la gestation est dépendante d'un grand nombre de facteurs autres que la santé utérine. Il y a aussi le facteur temps entre le moment du diagnostic et la constatation du statut de gestation, qui est souvent long (supérieur à 30 jours) (Barlund et al., 2008; Kasimanickam et al., 2004; Leutert et al., 2012). Le manque de spécificité est lui-même relié possiblement au facteur temps avec les

guérisons spontanées [70% de guérisons cliniques ont été observées dans l'espace de 2 à 3 semaines pour les vaches ayant des écoulements muco-purulents à purulents vers 30 jours PP. (Dubuc et al., 2010a; LeBlanc et al., 2002) On peut aussi remettre en question la façon usuelle de catégoriser les animaux à l'aide d'un seuil et le moment où le diagnostic est posé. Les valeurs actuelles de spécificité entraînent l'utilisation de traitement sur des animaux qui n'en avaient pas besoin. Cette remarque est importante dans le cadre de l'usage raisonné des antibiotiques.

8. Palpation transrectale :

La palpation transrectale du col de l'utérus en PP ne donne qu'un accord modéré avec la mesure effectuée par échographie, et cet accord diminue avec l'augmentation du diamètre du col (Leutert et al., 2013). En référence à la définition proposée par Sheldon et al. (2006), les cols mesurés à l'échographie de la taille de 6 cm étaient classés lors de la palpation transrectale dans la catégorie 7.5 cm et plus, ce qui donne donc des faux positifs à l'endométrite clinique (Leutert et al., 2013). La palpation transrectale de l'utérus n'a pas pu être associée avec le risque de gestation « LeBlanc et al., 2002a ».

9. Bactériologie :

La bactériologie est réalisée sur des prélèvements effectués par biopsie ou par écouvillonnage. L'échantillon peut alors être mis en culture dans des conditions aérobies ou anaérobies. Un classement a été proposé pour les bactéries en fonction de leur pathogénicité en lien avec 1) la présence de lésions endométriales observées, 2) la présence de bactéries lors de cas d'endométrite sans être forcément associée à des lésions endométriales et 3) des contaminants opportunistes isolés dans l'utérus (Sheldon et al., 2002; Williams et al., 2005). Ainsi les bactéries considérées comme pathogènes sont *Trueperella pyogenes*, *E. coli*, *Fusobacterium necrophorum* et *Prevotella melaninogenica*. À cette liste, (McDougall et al., 2011) a ajouté *Proteus* spp. . De plus, *Bacterioides* spp. a aussi été proposé comme bactérie pathogène (Bonnett, Martin, et al., 1991; Mateus et al., 2002).

Parmi ces bactéries, dans plusieurs études, *T. pyogenes* est la seule bactérie à avoir été associée à des lésions endométriales, à la présence d'écoulements vaginaux purulents et à des

performances en reproduction diminuées (Werner et al., 2012; Wagener et al., 2014; Williams et al., 2005 ; Bonnett, Martin, et al., 1991; Petit et al., 2009; Prunner, Pothmann, et al., 2014). Lors d'échantillonnage réalisé à la fois au niveau vaginal et cervical, *T. pyogenes* a plus souvent été mise en évidence dans les écouvillons du col de l'utérus que dans ceux du vagin (Petit et al., 2009 ». « Jeremejeva et al. 2010) soulève dans son étude le fait que certaines des biopsies étaient négatives à la culture bactérienne alors que sur les lames cytologiques, il y avait des bactéries phagocytées et la présence d'inflammation. Il émet l'hypothèse de contamination possible de l'utérus par des mycobactéries ou des levures. Des levures ont aussi été rapportées en très faible proportion (< 2%) dans des écouvillons vaginaux, cervicaux et utérins (Petit et al., 2009). D'autres facteurs, comme le milieu de transport, les conditions de transport, l'intervalle de temps entre le prélèvement et la mise en culture, et aussi l'interaction entre les cellules et les bactéries de l'échantillon peuvent influencer la croissance bactérienne lors de la mise en culture. La gravité des conséquences d'une infection utérine dépend non seulement de la nature ou de la concentration du ou des germes en cause mais également du statut métabolique de l'animal concerné (Peter et al. 1990).

II- Définition de l'examen cytologique :

Analyse à l'aide de différents microscopes des cellules présentes dans les substances provenant du corps d'un malade (crachats, pus, urine, sang, etc), pour rechercher une maladie. Les frottis effectués notamment en gynécologie font aussi l'objet d'un examen cytologique (voir frottis cervico vaginal et Papanicolaou).

Souvent cette analyse est associée à la recherche de microbes. C'est le cas notamment de l'analyse des urines qui se nomme "examen cyto bactériologique des urines" (ECBU). Les médecins emploient familièrement l'expression "la cytologie" ou "la cyto" à la place de "l'examen cytologique".

III. Méthode de prélèvement :

1. Matériel et méthodes de l'examen cytologique :

Les cellules présentes dans la muqueuse endométriale peuvent être recueillies par drainage de la cavité utérine ou au moyen d'une cytobrosse. Le drainage s'effectue au moyen

d'une pipette de **50 à 60** cm de long reliée à une seringue de 20 ou 60 ml selon le volume d'une solution stérile de chlorure de sodium à 9 % utilisée (Gilbert et al. 2005, Kasimanickam et al. 2005, Barlund et al. 2008). Les cornes utérines sont soigneusement massées avant de réaspirer le liquide dans un tube stérile. Cette aspiration permet de récolter quelques millilitres. Le prélèvement sera transféré au laboratoire dans les 6 heures pour y être centrifugé (600 g pendant 15 minutes, 766 g pendant 5 min ou 1000 rpm pendant 7 min selon les auteurs ; (Barlund et al. 2008, Kasimanickam et al. 2005, Gilbert et al. 2005).

Le surnageant sera éliminé et le culot de centrifugation étalé sur une lame après sa remise en suspension dans un peu de liquide. Les cellules endométriales peuvent également être récoltées au moyen d'une cytobrosse « **CML, Nemours, France 20 Euros pour 100 cytobrosses** ». Celle-ci, coupée à 8 cm est fixée sur un pistolet d'insémination de 50 à 65 cm de long et 3 mm de diamètre interne. L'ensemble est placé dans une gaine plastique d'insémination pour rigidifier l'ensemble et protéger la cytobrosse puis dans une chemise sanitaire pour éviter la contamination vaginale lors du passage vaginal et transcervical. Cette chemise sera perforée lors du passage cervical du pistolet d'insémination. La chemise sanitaire est percée, puis la gaine plastique est rétractée afin d'exposer la cytobrosse à la muqueuse utérine. Un mouvement de rotation est ensuite appliqué à la brosse, au contact de l'endomètre utérin. La cytobrosse est alors roulée sur une lame et le frottis ainsi obtenu est fixé ou non au moyen d'une bombe fixatrice (**Cytoprep, Fishers scientific <http://www.be.fishersci.com/>**).

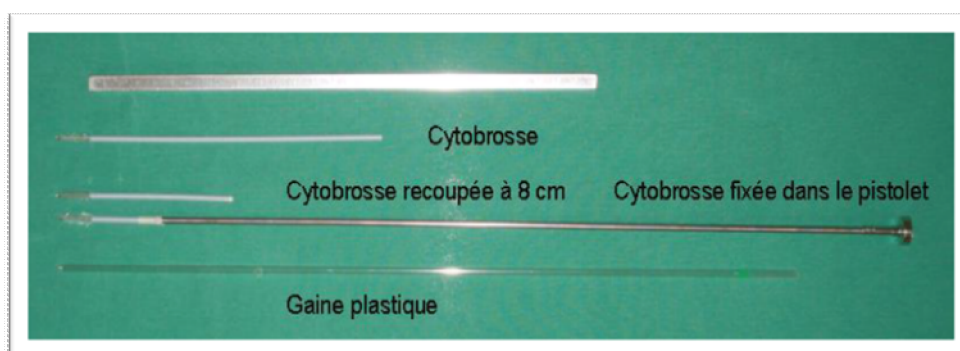
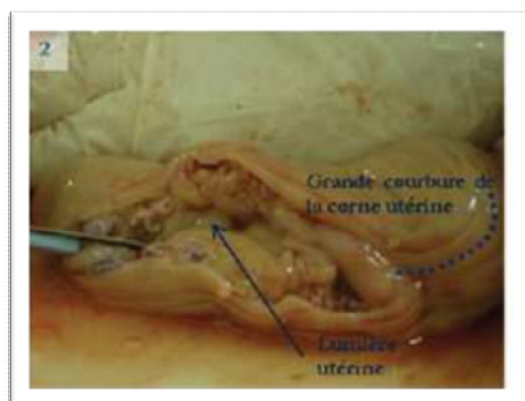
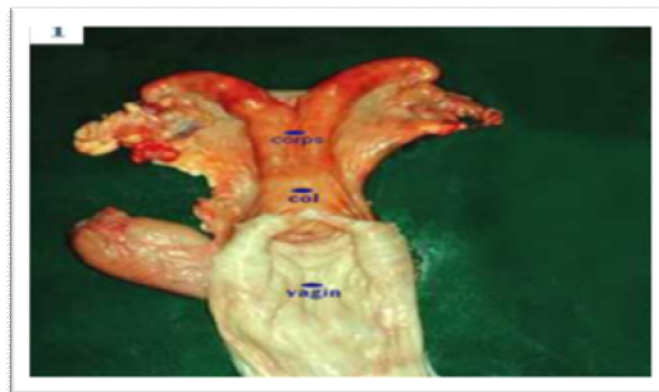
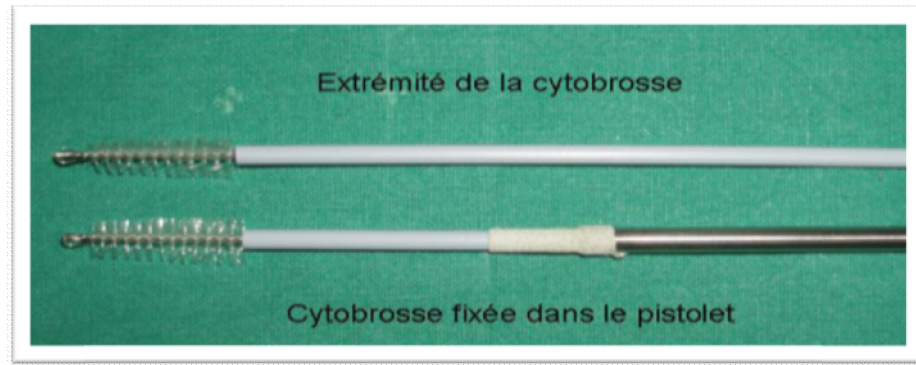


Figure N°20 : Matériel d'utilisation de la cytobrosse (L. Deguillaume, ENVA)



FigureN°21 : Prélèvements cytologiques sur matrice de vache.

1. Sites des trois 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 « **Deguillaume., 2010** ».



Figure N°22 : Réalisation du frottis.

2. Préparation des lames cytologiques :

a. Coloration et lecture des frottis :

Toutes les lames ont été colorées (4h après la collecte) par la coloration de **May-Grünwald-Giemsa** (pendant 30 mn). La lecture des lames a été faite sur plusieurs temps : d'abord au plus faible grossissement (10×) pour attester de son homogénéité et rechercher une zone de lecture correcte, puis au grossissement intermédiaire pour le comptage cellulaire et finalement le plus fort grossissement (400×), (1000×) pour confirmer le type cellulaire (Ahmadi et al., 2006b ; Betsch., 1992). L'examen microscopique nous a permis la mise en évidence des cellules suivantes : polynucléaires neutrophiles (PNN), cellules épithéliales (CE) et cellules épithéliales à larges vacuoles (CELV) et les lymphocytes. Cent cellules ont été comptées par frottis. Pour être prise en compte une cellule devait avoir un contour nucléaire et cytoplasmique visible et intègre. Les cellules anuclées (hématies squames) ne sont pas

comptées. Lors d'impossibilité de lecture de la lame (nombre de cellules insuffisantes, contamination trop importante, etc...), on fait recours à la lame jumelle.

b. Analyses statistiques :

L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel Graphpad prism 5. La comparaison des pourcentages de cellules dans des frottis du col utérin et l'utérus a été faite par le test T (Student). La procédure ANOVA a été utilisée pour détecter la différence entre les moyennes des pourcentages des cellules du col et de l'utérus dans les différentes phases de l'oestrus. Les résultats sont exprimés en (moyenne \pm SEM). La différence statistique a été considérée significative quand $P < 0,05$.

c. L'étude histologique :

Les appareils reproducteurs ont été prélevés immédiatement après l'abattage et placés dans une glacière pour être transportés au laboratoire dans 2 à 3 heures. Les caractères physiques de l'utérus, des ovaires, du vagin et du col utérin ont été enregistrés. Nous avons utilisé la technique classique :

d. Fixation :

La fixation tissulaire est un temps essentiel qui conditionne toutes les étapes ultérieures. Elle a pour fonction principale de conserver les différents éléments structuraux des tissus pour l'étude morphologique. Elle a été faite au formol 10% pendant une période allant de 2 à 8 jours.

À partir de chaque partie des appareils reproducteurs (l'oviducte, les cornes de l'utérus, le corps de l'utérus, le col, le vagin) on découpe des échantillons.

Les échantillons sont placés dans des cassettes perforées en plastique afin de faciliter la circulation des liquides et assurer un drainage correcte au cours des étapes d'imprégnation dans un automate. Il faut identifier précisément chaque prélèvement et chaque cassette pour éviter toute confusion.



FigureN°23 : Cassette d'inclusion.

e. Imprégnation :

Le tissu lui-même est trop malléable pour que l'on puisse en tirer des coupes de l'épaisseur désirée. Pour durcir un tissu, son imprégnation par une matière rigide lui donne la résistance mécanique voulue. L'imprégnation repose sur la substitution de l'eau qui est dans les tissus par une substance et otalement hydrophobe et chimiquement inactive, telle que la paraffine. C'est la substance la plus représentative des milieux d'inclusions fondus et la plus couramment utilisée. Par conséquent, plusieurs étapes doivent être réalisées.

La post-fixation permet le passage des fixateurs aqueux aux alcools. Elle correspond à un bain de fixateur formolé (formol tamponné).

La déshydratation consiste à débarrasser le tissu de l'eau qu'il contient. Elle se fait par le passage dans des bains d'éthanol de concentration croissante jusqu'à l'éthanol absolu

La substitution consiste à remplacer l'éthanol qui n'est pas miscible à la paraffine par un solvant xylène. Ce solvant est miscible à la fois au déshydratant et à l'agent d'inclusion, on parle d'agent « éclaircissants » (car ils ont la propriété de rendre translucides les tissus qu'ils imrègnent)

L'imprégnation correspond à la substitution du solvant par la paraffine. Cette étape terminale est relativement agressive car la paraffine n'est liquide qu'à partir de 58°C et à cette température les protéines sont altérées. Une imprégnation trop longue peut provoquer une rétroaction importante de toutes les structures et un durcissement excessif des pièces.

À la fin du cycle, les paniers contenant les cassettes se trouvent dans un bain de paraffine chaude (liquide). Ils sont égouttés avant d'être transférés dans le bac d'attente du poste d'inclusion.



Figure N°24 : Automate d'imprégnation.

f. Inclusion :

Le principe de l'inclusion consiste en un enrobage de la pièce par de la paraffine liquide qui est rigidifiée permettant ainsi de conserver les rapports architecturaux des structures les unes par rapport aux autres et de lui fournir un support externe à la fois pendant et après la coupe. Il est nécessaire que la paraffine utilisée pour l'enrobage des pièces ait les mêmes caractéristiques que celle qui a servi à l'imprégnation. L'inclusion ne se fait de façon satisfaisante que si la pièce ne contient ni eau, (éthanol) après l'imprégnation.

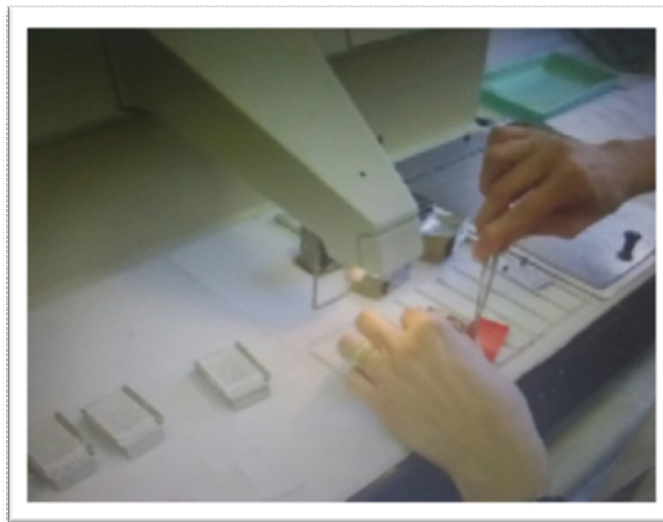


Figure N°25: Inclusion du tissu dans un moule de paraffine

i. Coupe :

La microtomie a pour but d'obtenir des rubans de qualité très fins de 2 à 5µm (micron ou millième de millimètre). Cette épaisseur permet aux rayons lumineux du microscope de traverser la préparation et d'éviter les super positions tissulaires. Les tissus inclus en paraffine sont très comprimés pendant la coupe. Afin d'atténuer cette compression et d'enlever du tissu les plis, il faut procéder au ramollissement de la paraffine sous l'action de la chaleur. C'est la face de la coupe (qui est dirigée vers l'arrière) qui doit être apposée sur une lame de verre car sa régularité facilite son adhérence. Le facteur essentiel d'une bonne adhérence des coupes est la propreté des lames de verre ainsi que la qualité des coupes. L'étalement des coupes est effectué sur une platine chauffante. La gélatine permet une meilleure adhérence des coupes sur les lames de verre. Il est important de contrôler la qualité de chaque coupe. S'assurer qu'il n'y a pas de plis ni de destries, que l'intégrité du prélèvement a été coupée et que le centrage du ruban sur la lame est parfait.

3. Étapes préparatoires à la coloration :

a. Séchage des lames :

Pour faciliter l'adhérence des coupes sur la lame de verre avant l'étape de déparaffinage, les lames doivent être « cuites ». Cette cuisson permet d'éliminer (par évaporation) la pellicule d'eau qui se trouve entre la coupe et la lame. Elle est réalisée dans une étuve dont la température doit être légèrement inférieure au point de fusion de la paraffine utilisée. Les portoirs de lames sont placés (de préférence en position horizontale) dans une étuve ventilée à **58°C** pendant 1 heure.

b. Déparaffinage :

La première étape de toute coloration d'une coupe histologique est d'éliminer la paraffine du tissu pour que les colorants puissent pénétrer. À la sortie de l'étuve, les lames subissent un déparaffinage afin d'éliminer la paraffine à l'aide d'un solvant (xylène), puis une réhydratation qui consiste à substituer progressivement le solvant du tissu par des bains d'éthanol décroissants pour amener à l'eau.

c. Coloration :

La coloration utilisée est la coloration hématoxyline éosine. L'hématoxyline (coloration du noyau) et éosine (coloration du cytoplasme).

4. Étapes préparatoires au montage :**a. Déshydratation :**

Cette étape permet de préparer les lames après une coloration afin de réaliser un montage enrésine.

Les préparations subissent une déshydratation qui consiste à retirer l'eau des coupes par des bains successifs d'éthanol absolu puis à un éclaircissement dans des bains de toluène (solvant), celui-ci étant miscible avec le milieu de montage. Cette étape doit être rapide car l'éthanol (surtout en faible concentration) est susceptible d'extraire plusieurs colorants des coupes.

b. Montage :

Cette opération consiste à fixer à l'aide d'une résine synthétique une lamelle couvre-objet sur la coupe afin de la protéger de la dégradation chimique des colorants qui s'oxydent à l'air et des bris mécaniques.

En fin les coupes sont observées par la suite à l'aide d'un microscope optique. Les photographies ont été réalisées à l'aide d'un appareil photo numérique.

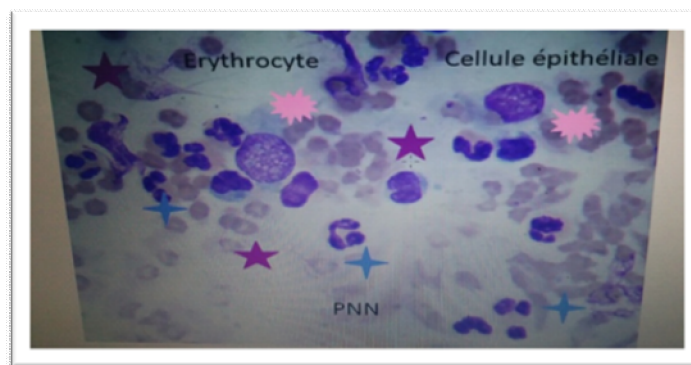


Figure N°26: Frottis cytotologique. Coloration Giemsa (L. Deguillaume ENVA)

5. Résultats et discussion :

Au cours de l'expérimentation, plusieurs matrices de vaches ont été exclues de l'étude en raison de la présence de différentes anomalies comme la métrite, la vaginite, la cervicite, le kyste folliculaire.

6. Étude cytologique :

La première partie de notre travail a été consacrée à caractériser les frottis cytologiques. Il s'agissait tout d'abord d'évaluer, qualitativement puis quantitativement, la population cellulaire présente sur les frottis génitaux. Nous avons ensuite étudié les variabilités de la population cellulaire entre les phases d'un cycle oestral (la phase folliculaire et la phase lutéale).

a. Cytologie comparée :

L'examen cytologique du corps utérin est devenu la technique de référence pour l'évaluation de la santé génitale chez la vache depuis 2004 (Kasimanickam et al., 2004).

Cet examen est pour l'instant réservé aux études expérimentales et ne fait pas partie de l'arsenal diagnostique sur le terrain. Les éléments observables sont identiques sur les frottis endométriaux et cervicaux.

b. Cellules épithéliales :

Celles-ci ont un diamètre de 20 à 50 µm, un noyau à chromatine réticulée, et sont rencontrées isolées ou en amas. Certaines sont nettement polarisées, avec la présence de grains de mucus au pôle apical.

Elles représentent la population majoritaire sur les frottis ou l'infiltration leucocytaire est faible ou absente.

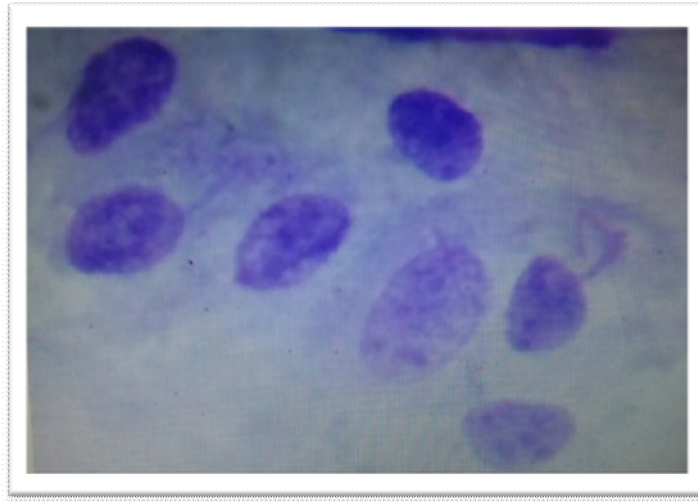


Figure N°27 : Cellules epitheliales de l'endometre (grossissement 1000x)

c. Cellules immunitaires :

Lorsque les frottis présentaient une infiltration leucocytaire plus importante, les granulocytes neutrophiles en constituant la population prédominante.

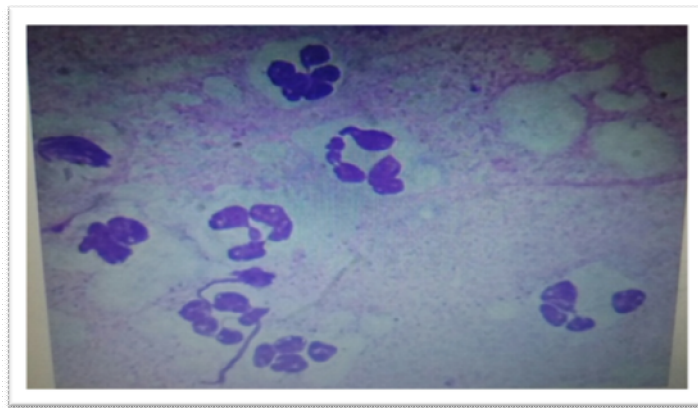


Figure N°28 : Granulocytes neutrophiles (grossissement 1000x)

En cas d'inflammation sévère on pouvait observer des formes immatures non segmentées (noyau non segmenté, de contenu chromatinien moins dense et généralement en forme de fer à cheval) ou des neutrophiles dégénères (perte de la lobulation nucléaire, gonflement du cytoplasme).

D'autres types de cellules immunitaires ont pu être rencontrés :

Granulocyte éosinophile : granules cytoplasmiques éosinophiles, noyau bilobe

granulocyte basophile : granules cytoplasmiques de coloration bleutée intense, masquant parfois le noyau
lymphocyte-plasmocyte : diamètre de **8 a 15 dm**, noyau rond, chromatine dense, rapport nucléo-cytoplasmique élevé
monocyte-macrophage : diamètre de **13 a 19 dm**, vacuoles intra cytoplasmiques, noyau de grande taille, chromatine diffuse
Ces types cellulaires ne sont que rarement présents sur les frottis endométriaux ou cervicaux.

La proportion de neutrophiles était fortement associée à celle des leucocytes totaux, ce qui suggère que les taux de neutrophiles ou de leucocytes totaux peuvent être utilisés indifféremment pour caractériser le statut inflammatoire des compartiments utérins

Autres :

d. Bactéries :

Il était aussi possible d'identifier des bactéries libres ou phagocytées.

e. Hématies :

Occasionnellement on peut observer des érythrocytes, en quantité variable allant parfois jusqu'à gêner la lecture de la lame.

VI- Description qualitative des populations cellulaires présentes sur les frottis Génitaux :

L'examen microscopique des frottis que nous avons réalisé, nous a permis la mise en évidence : des cellules épithéliales à larges vacuoles (CELV), des polynucléaires neutrophiles (PNN), des lymphocytes (rarement) et les cellules épithéliales (CE). Ces dernières étaient les plus couramment observées dans tous les groupes, elles correspondent à une exfoliation de l'épithélium superficiel.

Il a été rapporté que la présence d'un grand nombre de ces cellules dans un frottis utérin ou cervicale, associée rarement à des cellules inflammatoires, témoigne d'un prélèvement cytologique normal (Couto et Hughes., 1984 ; Ahmadi et al., 2006a

;Kasimanickam et al., 2004). Par contre, la mise en évidence des lymphocytes rares dans quelques frottis, nous a incités à éliminer ces cellules de l'étude.

Le rôle des cellules épithéliales à larges vacuoles (CELV) est mal connu, mais d'après (Yavari et al. (2009), elles peuvent être utilisées comme un indicateur de l'environnement utérin. Les neutrophiles constituent la première ligne de défense contre les agents pathogènes. La population de polymorphonucléaires (PMN) au niveau de l'endomètre utérin augmente lors de la présence d'infection (Leblanc et al., 2007).

L'examen cytologique endocervical étant d'utilisation récente et jusqu'à présent très peu d'étude l'ont abordé (Ahmadi et al., 2005), 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 oeuvre depuis 2004.

1. Cytologie endométriale :

L'observation microscopique nous a permis de distinguer les différentes lignées cellulaires: Les cellules épithéliales (CE), rondes ou elliptiques, de noyau à chromatine réticulée, présentes sous forme isolées, ou au contraire en amas ou nid d'abeille (**Figure 27**).

Elles apparaissaient alors de contour cytoplasmique polyédrique. Les cellules épithéliales à larges vacuoles (CELV). Les polynucléaires neutrophiles (PNN) à noyaux segmentés (**Figure 28**). Les lymphocytes (**Figure 29**). Il était également possible d'identifier des bactéries libres ou phagocytées, des débris cellulaires. Le fond de la lame pouvait alors prendre une coloration foncée qui altérerait la lecture du frottis.

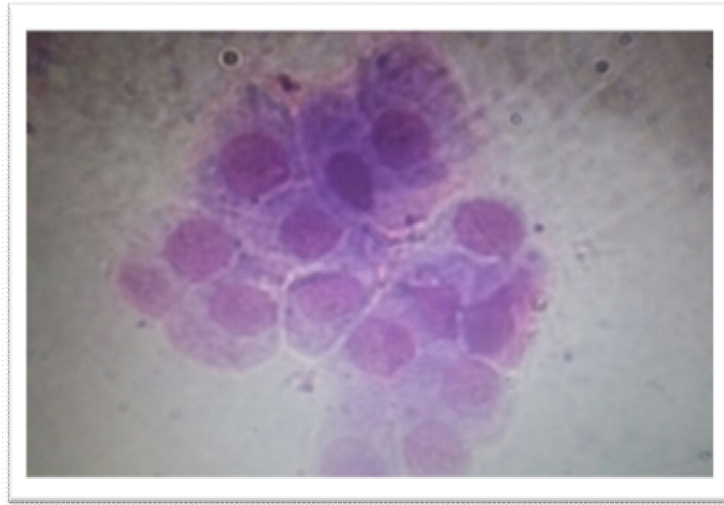


Figure N°29 : Les cellules épithéliales dans le frottis utérin (amas de cellules épithéliales) (grossissement.x 100, coloration May-Grünwald-Giemsa)

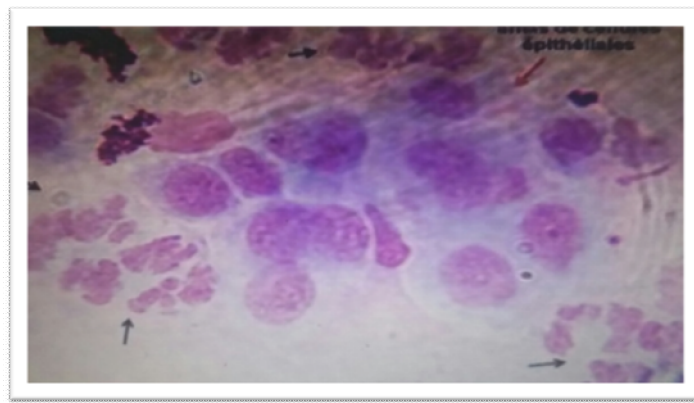
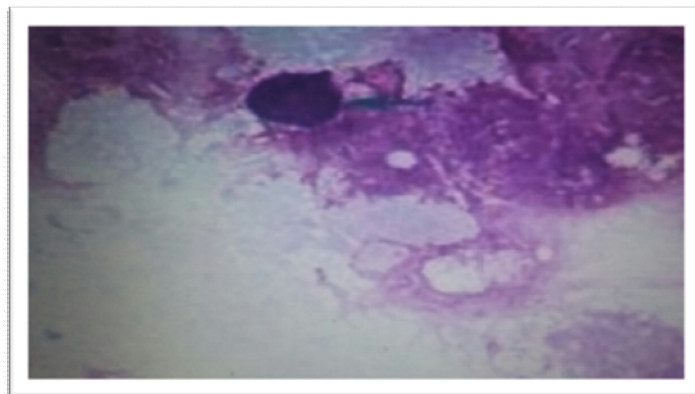


Figure N°30: Frottis cytologique endométrial montre les PNN (flèche noire) avec un amas de cellule épithéliales



FigureN°31 : Lymphocyte dans le frottis utérin

2. Cytologie endocervicale :

Les frottis endocervicaux étaient constitués des mêmes composants cellulaires et acellulaires que les frottis endométriaux (Figure38). Les cellules épithéliales de l'endomètre utérin n'étaient pas distinguables de celles de la muqueuse endocervicale. Les cellules épithéliales recueillies sont squameuses si elles proviennent de l'orifice externe et de la partie caudale du col, cylindriques si elles proviennent du reste du col et de l'orifice interne (Couto et Hughes., 1984).

La composition cellulaire des frottis (cellules épithéliales, cellules épithéliales à larges vacuoles (CELV), des polynucléaires neutrophiles (PNN), des lymphocytes) semblait également identique. Chez la plupart des mammifères, seule la partie externe du col (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 (Couto et al., 1984).

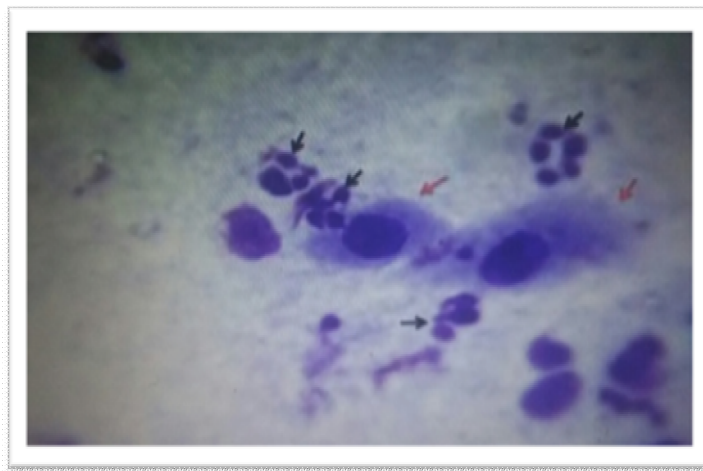


Figure N° 32 : Les cellules épithéliales (flèche orange) et de neutrophiles (flèche noire) dans les frottis de La muqueuse cervicale

(grossissement. x 100, coloration May-Grünwald-Giemsa).

3. Cytologie vaginale :

Nous avons observé différentes types cellulaires.

a. Cellules parabasales :

Ce sont les plus petites cellules épithéliales présentes sur les frottis vaginaux, Leur forme est généralement ronde et uniforme (Schutte., 1967). Leur noyau est rond et volumineux, et leur cytoplasme peu abondant ; le rapport nucléo-cytoplasmique est donc plus élevé (figure 39). On peut les observer en colonne (le cytoplasme est étiré et que le noyau est excentré) (Neveux., 1999).

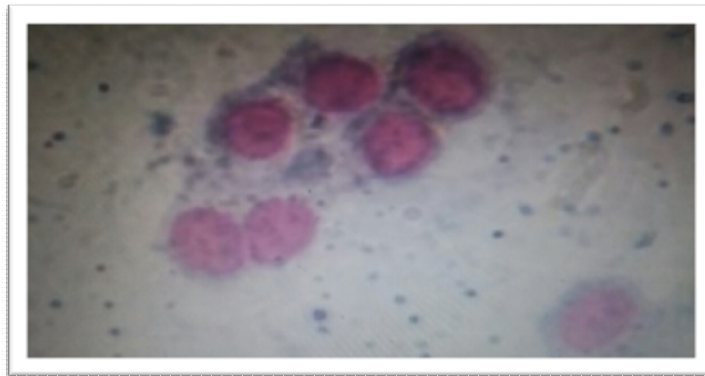


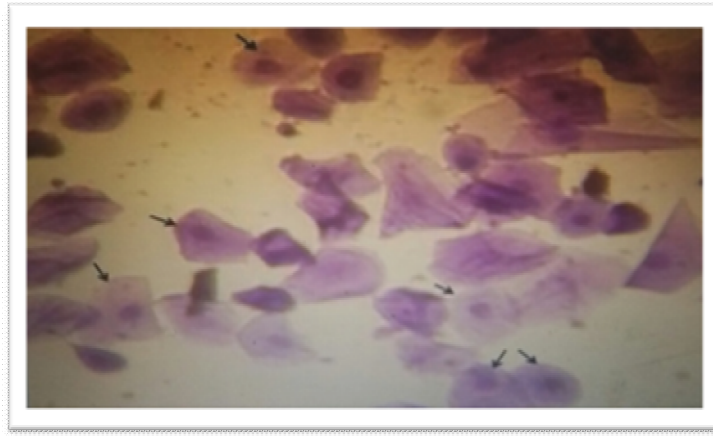
Figure N°33 : Les cellules parabasales dans un frottis vaginal
(grossissement. x 100, coloration May-Grünwald-Giemsa)

b. Cellules intermédiaires :

Deux types de cellules intermédiaires ont été définis.

- Les petites cellules intermédiaires :

Leur forme est ronde, ovale ou angulaire. La plupart sont ellipsoïdes (Johnston et al., 2001). Leur noyau est rond (**Figure 32**). Leur taille est variable, elle est plus grande que les cellules parabasales.



FigureN° 34 : Frottis cytologique vaginal montre les petites cellules intermédiaires (flèche noire)

(grossissement. x 100, coloration May-Grunwald-Giemsa)

- Les grandes cellules intermédiaires :

Elles sont plates. Leur contour est anguleux.

Leur noyau est rond (figure 34). Leur taille est variable, elle est plus grande que les cellules parabasales et les petites cellules intermédiaires.

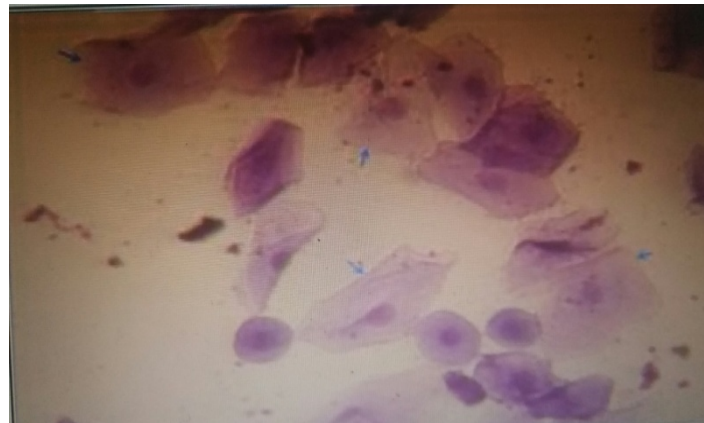


Figure N°35 : Frottis cytologique vaginal montre les grandes cellules intermédiaires

(Flèche bleu)(grossissement. x 100, coloration May-Grunwald-Giemsa)

- Cellules superficielles :

Ce sont les plus grandes cellules épithéliales présentes sur les frottis vaginaux. Les bords cellulaires sont irréguliers, et plissés. Leur noyau est pycnotique, absent, ou on ne peut distinguer que sa silhouette (Figure 34) (Johnston et al. 2001).

Elles sont également appelées cellules kératinisées. En effet, le phénomène de kératinisation est lié à la dégénérescence qui transforme les cellules d'un épithélium malpighien en cellules mortes. Ceci est reflété par la pycnose nucléaire (Guyant., 1988. Johnston et al., 2001). Les cellules qui ne possèdent pas de noyau sont également appelées squames.

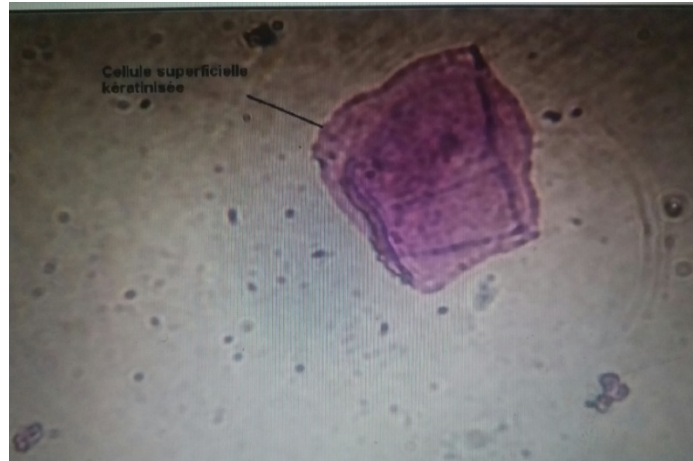


Figure N°35 : Cellule superficielle kératinisée anucléée dans un frottis vaginal

(grossissement. x 100, coloration May-Grünwald-Giemsa).

- Autres cellules :

Il y a plusieurs autres cellules présentes dans les frottis vaginaux, par exemple : les cellules spumeuses, les érythrocytes, les polynucléaires neutrophiles (PNN), lymphocytes (sont très rarement rencontrés) (**Figure 35**)..

Référence Bibliographique

Référence bibliographique :

- [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.

[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.

[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.

[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 highproducing 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.

[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.
- [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 hydroxybutyrate 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.
- [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-PGF2alpha (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, Furll 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.

[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.

[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, Spengler 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.

[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 F₂α 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.

[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.